

Tesis doctoral

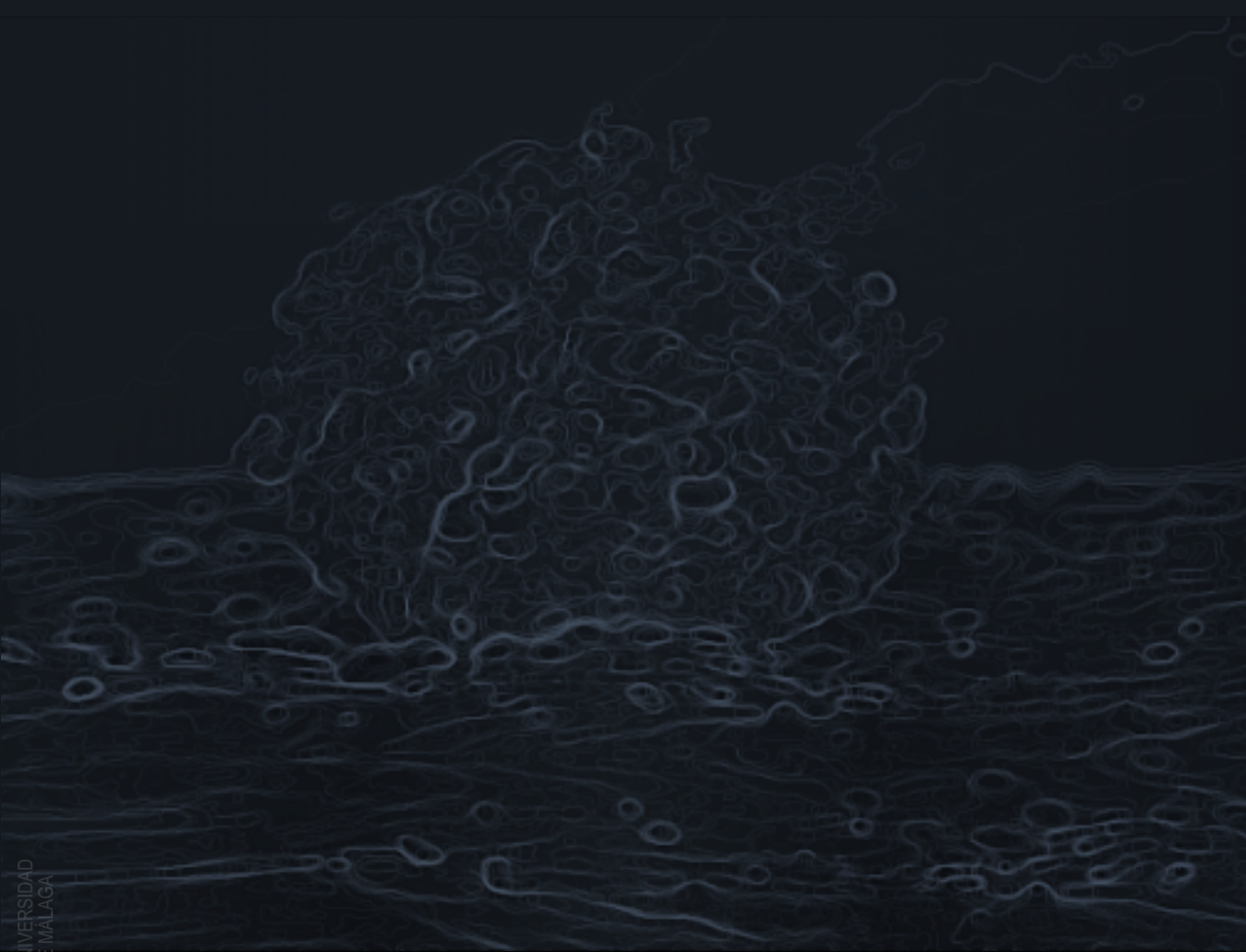
INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y LA RUTA DE LA P53 EN LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Arturo Reyes Palomares

Tesis dirigida por:

Armando Reyes Engel

Nicolás Garrido Puchalt



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada
Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.
2017




UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Arturo Lázaro Reyes Palomares

 <http://orcid.org/0000-0001-5820-3490>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Tesis doctoral

INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL
SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y LA RUTA DE LA P53 EN
LA IMPLANTACION EMBRIONARIA

Arturo Reyes Palomares

Málaga, 2017

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología

Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INFLUENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y LA RUTA DE LA P53 EN LA IMPLANTACION EMBRIONARIA

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Málaga

Arturo Reyes Palomares

Málaga, 2017

Directores:

Armando Reyes Engel
Catedrático de Bioquímica, Biología
Molecular e Inmunología
Universidad de Málaga

Nicolás Garrido Puchalt
Director de la Fundación IVI



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Armando Reyes Engel, Catedrático de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Málaga, Nicolás Garrido Puchalt, Director de la Fundación IVI

CERTIFICAN

Que D. Arturo Reyes Palomares, Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo nuestra dirección conjunta el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral que lleva por título "Influencia de las variantes genéticas del sistema serotoninérgico y la ruta de la p53 en la implantación embrionaria".

Este trabajo reúne a nuestro juicio, contenido científico suficiente y las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Málaga, Enero de 2017

Armando Reyes Engel

Nicolás Garrido Puchalt

El presente proyecto contó con la financiación aportada por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i) a través de la gestión del anterior Ministerio de Educación y Ciencia y actual Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) bajo el programa financiado (SAF2008-03314/). El doctorando Arturo Reyes Palomares fue el investigador responsable de desarrollar el proyecto financiado por el Subprograma Torres Quevedo del Ministerio de Ciencia e Innovación, actual MINECO, y el Fondo Social Europeo en la concesión PTQ-09-01-00496 al Instituto de Fertilidad Clínica Rincón.

El trabajo ha sido realizado en el Instituto de Fertilidad Clínica Rincón bajo la dirección coordinada desde el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y con la colaboración de la Fundación IVI.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se ha desarrollado en el entorno académico y en mi ámbito profesional; lo que me lleva recordar a las personas que me han apoyado, incentivado o inspirado en algún momento durante la elaboración del mismo.

En primer lugar, quiero agradecer a mi mentor, el director principal del trabajo y a quien tengo el orgullo de llamar padre. Tanto la dedicación profesional como la formación académica que hemos adquirido, tanto mi hermano Armando como yo, se debe mayoritariamente a tu virtuosa pasión con la que profesas tus conocimientos. Tengo la fortuna de poder contagiarme de tu actitud perfeccionista que, aunque quizás pase algo desapercibida por tus habilidades innatas, supone un revulsivo para conseguir ese plus de calidad que te deja satisfecho. Te debo un 47,5 por ciento de mi "predeterminación" genética y eso habrá contribuido como bien te gusta decir determinadamente en el éxito; sin embargo, en este contexto me gustaría resaltar aquellas cualidades que he aprendido de ti y que me han permitido validar mi vocación como investigador durante el desarrollo de esta tesis. Entre estas cualidades destaco la elemental curiosidad, la intuición para saber formular preguntas correctas, el valor de dudar y de saber errar, pero sobretudo el preservar los principios de forma altruista por y para la ciencia. Durante el desarrollo no están exentos los momentos de alegría, de incertidumbre y de tensión en las sesiones de revisión, pero se que todos y cada uno de esos momentos que incluso cuestionaban quizás otros matices externos al trabajo en sí, han sido necesarios para que ambos estemos satisfechos. Eres un gran maestro y me alegro de que hayas sido tú mi director de tesis.

Agradezco al co-director de la tesis Nicolás Garrido, todo un referente en el plano profesional y buen amigo. Tu avezado pragmatismo, tus críticas verdaderamente constructivas y refuerzos positivos me han ayudado a empaquetar la calidad del trabajo. Me ha dado mucha seguridad contar contigo a la hora de difundir los resultados en

el ámbito profesional de la medicina reproductiva, gracias por estar ahí. Ahora se que estás inmerso en una nueva etapa, un reto del que seguro vas a salir más grande si cabe.

Maxi gracias por tus aportaciones en infinidad de cuestiones importantes del trabajo. Has coordinado al equipo de doctorandos de forma generosa y facilitando la ejecución del trabajo en grupo. Tienes esa chispa que hace todo más fácil y ameno, contar con tu experiencia es un lujo.

Manolo Rincón promotor de mi carrera profesional, pero sobretodo gran amigo. Eres un mecenas por vocación, del arte, del deporte y ahora también te consagras en la ciencia, algo que estoy seguro te hacía especial ilusión. Parte del reto personal que conlleva este trabajo se ha impulsado para hacer valer tu intuición y confianza que depositaste en mí. Por ello hemos conseguido logros que nos han hecho creer en nosotros mismos, personalmente el mayor orgullo ha sido percibir tu alegría, tengo tu cara de emoción en Estocolmo grabada en mis retinas. Me siento muy afortunado por tenerte cerca y escucharte decir de forma natural "niño esto es un aprendizaje".

A mi hermano Armando, me condiciona el no poder expresar todo lo que te agradezco. A fin de cuentas, hemos aprendido juntos prácticamente todo y no me cabe duda, de que puedes sentir este trabajo también como propio. Irremplazable confidente (quien mejor que mi clon), bien sea por un conflicto, una duda, un chiste, una borrachera y su resaca claro..., eres la mejor persona que conozco. Estoy muy contento de sentir la fortaleza e independencia de tu proyección, sin duda dejas huella y tu estilo personal hasta en esos ámbitos de muy alta competitividad, ahora por por tierras bávaras. Estoy seguro de que lograrás todos tus propósitos y cuenta con mu ayuda para ello.

A mi madre por su incondicionalidad, reconforta sentir tu amor y apoyo en cualquier situación que pueda imaginar, es una deuda que asumo nunca te podré devolver. Es

casi mágico notar como alguien te reconforta simplemente sabiendo que siempre está ahí. Nos lo has dado todo y mucho más te mereces.

A María, aunque pronto será oficial, ya te considero como una hermana, hay poco que ya no sepamos el uno del otro, con gran cariño agradezco tu apoyo durante este tiempo.

A mis compañeros en el departamento; Ana, Bea y Miriam siempre grata compañía en esas largas sesiones de laboratorio. A Irene por su inestimable apoyo y soporte, eres el alma del departamento. A Dani por su disposición y eficiencia. A los hermanos Porta por su apoyo logístico y técnico, deseo un fructífero progreso de vuestra iniciativa cuya cuna se mecía al mismo tiempo que se desarrollaba este trabajo y a Tamara con quien compartí muchas inquietudes, eres una gran persona.

A mis compañeros de batalla diaria en el Instituto de Fertilidad Clínica Rincón; Ana, Eva, Adri, Maca, Lola, María, Esther, M^a Ángeles, Miguel Ángel, Fany, Carmen, Reme, Bea y en especial a Paco a quien le debo parte de mi maduración profesional y mostrarme el valor de ser competitivo y perseverar en la rutina de la superación, es una satisfacción trabajar en equipo.

A mis compañeros de máster del IVI con los que empecé un mundo nuevo, muy en especial a Nasser, Nacho, Alberto, Irene y a Javi. Al equipo del Hospital General de Valencia, a Carla muchas gracias por proponerme, siempre lo tendré presente y muy en especial a Irene Cuevas quien me inyectó las referencias esenciales para desarrollar la actitud de un embriólogo con la responsabilidad que conlleva y saber como tratar a los pacientes.

A la "Tata" encarnas la máxima expresión de la nobleza y del amor, genuina y única, te quiero. A José por esas escapadas para cabalgar olas y compartir momentos necesarios de evasión y ocio. A Almudena por su compañía y comprensión. A mis

abuelos, a Rocío, a todos mis primos y primas, así como al resto de la familia os agradezco profundamente vuestro cariño y el apoyo recibido.

Lista de contenidos

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 La reproducción asistida como recurso para combatir la infertilidad en nuestra sociedad	7
1.2 La implantación embrionaria, principal limitación de los tratamientos de FIV	8
1.3 El dialogo materno-embriionario durante la implantación	11
1.3.1 -Fases de la implantación embrionaria	12
1.4 Transición del embrión hasta adquirir el soporte endometrial en la etapa peri-implantatoria	13
1.5. La donación de ovocitos como modelo clásico de estudio de la receptividad endometrial	15
1.6 La tolerancia materno-embrionaria	16
1.6.1 -La cooperación intercelular y el sistema inmune como mediador durante la implantación	17
1.7 La ruta de la p53 y la influencia sobre LIF durante la implantación embrionaria	21
1.8 Influencia del sistema serotoninérgico en el establecimiento y mantenimiento del embarazo	24
1.8.1 Regulación asimétrica del sistema serotoninérgico en el endometrio como posible mecanismo de prevención de la respuesta inmune	29
1.9 Utilidad de las variantes genéticas para explorar la influencia de sistemas biológicos relacionados con la implantación embrionaria	31
1.9.1 Variantes genéticas relacionadas con la tolerancia embrio-materna: LIF y p53 como candidatas para el estudio de la implantación	32
✓ <i>Tumor protein P53 (TP53) rs1042522 (Arg72Pro)</i>	33
✓ <i>Murine doble minute 4 (Mdm4) rs1563828</i>	33
✓ <i>Ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP-7) rs1529916</i>	33
✓ <i>Leukemya inhibitory factor (LIF) rs929271</i>	34
1.9.2 Variantes genéticas del sistema serotoninérgico candidatas para el estudio de la implantación	35
✓ <i>Solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4), Serotonin transporter (SERT) (5-HTT) Insertion/deletion 5-HT Transporter linked polymorphism region (5-HTTLPR)</i>	35
✓ <i>Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) rs1800532</i>	36
✓ <i>5-Hydroxytryptamine Receptor 1A (5-HT1A) rs6295</i>	36
✓ <i>5-Hydroxytryptamine Receptor 2A (5-HT2A) rs6313</i>	36
✓ <i>5-Hydroxytryptamine Receptor 2C (5-HTR2C) rs3813929</i>	37

✓ 5-Hydroxytryptamine Receptor 3B (5-HT3B) rs1176744	37
✓ Monoamine oxidase A (MAO-A) rs3788862 y rs979605; Monoamine oxidase B (MAO-B) rs3027452	37
✓ Vesicular Monoamine Transporter 1 (VMAT1) rs1390938 y rs2270641	38
2. OBJETIVOS	42
2.1 Justificación del estudio	43
2.2 Planteamiento e hipótesis	43
2.3 Objetivo general	44
2.4 Objetivos específicos	44
3. MATERIAL Y MÉTODOS	48
3.1 Diseño del estudio	49
3.2 Población de estudio	49
3.2.1 Receptoras de óvulos donados	49
✓ Criterios de inclusión	50
✓ Criterios de exclusión	50
3.2.2 Donantes de óvulos	50
✓ Criterios de inclusión	50
✓ Criterios de exclusión	51
3.3 Preparación endometrial de las receptoras de óvulos donados	51
3.4 Hiperestimulación ovárica controlada, punción ovárica y recuperación de folículos. Inseminación intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) y cultivo embrionario	52
3.5 Evaluación de la fecundación y desarrollo embrionario	53
3.6 Evaluación clínica de los resultados y la progresión de los tratamientos	54
3.7 Toma de muestras y extracción de ADN	56
3.8 Técnicas de genotipado	57
3.8.1 Análisis de Fragmentos	57
3.8.2 Minisequenciación	58
3.8.3 Taqman® Open Array	59
3.9 -Análisis estadístico de los datos	59
4. RESULTADOS	64
4.1 Características demográficas y clínicas de la población de estudio	65
4.2 Análisis de distribución de frecuencias	67
4.2.1 Distribución de genotipos en el equilibrio Hardy-Weinberg	67
4.2.2 Distribución de frecuencias alélicas entre poblaciones mayoritarias HCG (+) y HCG (-)	67
4.2.3 Análisis poblacional y tendencia en los resultados en el grupo de estudio	70

4.2.4 Distribución de frecuencias genotípicas en función de los resultados clínicos de los tratamientos y su evolución	72
4.3 Resultados para las variantes con significación clínica de la ruta P53	74
4.3.1 TP53-Arg72Pro (rs1042522)	74
4.4 Resultados para variantes con significación clínica influyentes en el sistema serotoninérgico	75
4.4.1 SLC6A4 - Ins/del 5-HTTLPR	75
4.4.2 HT1A - C1019G (rs6295)	76
4.4.3 VMAT1 - Thr136Ile (rs1390938)	76
4.5 Análisis de las combinaciones e interacciones entre alelos del sistema serotoninérgico	78
4.5.1 Combinaciones alélicas entre las variantes ins/del 5-HTTLPR y C1019G (5-HT1A)	78
4.5.2 Combinaciones alélicas entre las variantes C1019G (5-HT1A) y Thr136Ile VMAT1	79
4.5.3 Combinaciones alélicas entre las variantes ins/del 5-HTTLPR y Thr136Ile VMAT1	79
4.6 Análisis de combinado de genotipos	83
5. RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS QUE AVALAN LOS RESULTADOS	86
6. DISCUSION	108
6.1 Las variaciones genéticas en la ruta de la P53 influyen en la implantación embrionaria	109
6.2 Las variaciones genéticas del sistema serotoninérgico influyen en el éxito de los tratamientos de recepción de óvulos de donante	114
6.2.1 Las variantes 5-HTTLPR (SERT) y Thr136Ile (VMAT1) pueden influir en la disponibilidad de 5-HT en la interfase materno-embionaria	116
6.2.2 La interacción de las variantes 5-HTTLPR (SERT), Thr136Ile (VMAT1) y C1019G (5-HTR1A) pueden influir en la inmunomodulación serotoninérgica de la tolerancia materno-embionaria	120
7. CONCLUSION	126
8. BIBLIOGRAFIA	130

-
- 5 *Influencia de las variaciones genéticas del sistema serotoninérgico y la ruta de la p53 en la implantación embrionaria*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La reproducción asistida como recurso para combatir la infertilidad en nuestra sociedad

La probabilidad de obtener un embarazo de forma espontánea en una pareja que carece de problemas de fertilidad y mantiene relaciones sexuales regulares y desprotegidas, oscila entre un 22 y un 25 por ciento en cada ciclo ovulatorio (1). La dificultad de concebir puede surgir por múltiples factores y el concepto de infertilidad emerge cuando el proyecto reproductivo se retrasa un tiempo más extenso del deseado. La definición del término "infertilidad" frecuentemente crea confusión por la variedad de acepciones que se han acogido en distintos idiomas, así la Organización Mundial de la Salud unificó el término definiéndolo como una enfermedad del sistema reproductor que impide la consecución del embarazo tras un año de exposición regular al coito (2). Se distingue entre infertilidad primaria, cuando no se logra el embarazo o este no llega a término con un recién nacido vivo, e infertilidad secundaria cuando habiendo tenido lugar un embarazo previo con el nacimiento de un recién nacido vivo, la gestación no vuelve a obtenerse o si se consigue no llega a término.

La eficacia de los tratamientos de reproducción asistida ha aumentado considerablemente gracias a la mejora de la tecnología que permite la aplicación de los conocimientos de forma directa sobre la práctica clínica. Así tal y como se reflejan en las tasas de éxito que pueden ofrecerse en las unidades de reproducción, hoy en día las parejas con dificultades para concebir pueden tener mayores expectativas que hace una década, recibiendo, además, los tratamientos son cada vez más personalizados para que puedan cumplir su propósito reproductivo con mayor rapidez y eficiencia. Las técnicas de reproducción asistida (TRA) basadas en la Inseminación Artificial (IA) y la Fecundación In Vitro (FIV) pretenden superar aquellas barreras que impiden obtener descendencia sana mediante el coito de la pareja. Aunque mayoritariamente la primera opción es el empleo de los gametos propios de la pareja, existen muchas situaciones en las que la única alternativa pasará por utilizar

gametos de donante. Entre estas situaciones pueden destacarse aquellas situaciones en las que no haya pareja masculina, exista un riesgo elevado de transmitir una patología de carácter genético u otras condiciones que puedan comprometer el resultado de los tratamientos y por ello ofrecer un bajo rendimiento de las técnicas que se puedan aplicar.

El estudio de la pareja infértil consiste en explorar aquellos factores relacionados con la salud de los individuos que forman la pareja y que pueden condicionar potencialmente el éxito reproductivo; para ello se evalúa de forma general la disposición y el estado de los gametos masculinos y femeninos, la condición del útero, la accesibilidad de las trompas y la aptitud genética de ambos miembros de la pareja que pueda condicionar la obtención del embarazo de un recién nacido vivo sano. La incidencia de las causas de infertilidad se reparte equitativamente entre ambos géneros de forma que aproximadamente del 25-35 por ciento se debe a causas derivadas de un factor masculino, el 17-20 por ciento por un factor tubárico y un 25 por ciento puede deberse a un factor ovulatorio; hasta en más de un 20 por ciento de las situaciones puede encontrarse más de un diagnóstico condicionante e incluso en un 5-15 por ciento de los casos aún no se identifica ninguna causa y por lo tanto se trata como una infertilidad de origen desconocido (3).

1.2 La implantación embrionaria, principal limitación de los tratamientos de FIV

Los centros que desarrollan TRAs de forma general realizan periódicamente una exhaustiva evaluación interna de los resultados para controlar el rendimiento de los procesos y el impacto de cualquier variación a la que puedan estar expuestos. Así recientemente en los países de la Unión europea (UE) como España, las autoridades regionales recaban información de los centros a través de sociedades científicas especializadas en medicina reproductiva. Este registro sistemático y cuantificable de evaluación interna que llevan a cabo las unidades especializadas en medicina reproductiva ha generado una actitud exigente y responsable que ha acelerado el

perfeccionamiento de las estrategias que se llevan a la práctica durante el manejo clínico de la pareja infértil, lo que se refleja gradualmente en las tasas de éxito con unos resultados mucho más esperanzadores que hace un par de décadas. Así por ejemplo, se han producido mejoras en la tasa de reclutamiento folicular y la aplicación de protocolos más seguros durante la hiperestimulación ovárica controlada, se ha minimizado el impacto de la punción ovárica durante la extracción de los óvulos reduciendo considerablemente sus riesgos, durante la manipulación del espermatozoide es posible seleccionar espermatozoides con mayor viabilidad, los criterios establecidos para la valoración de gametos y embriones son más precisos y las técnicas de cultivo embrionario y de criopreservación han mejorado sustancialmente la tasa de supervivencia lo que facilita la toma de decisiones en la planificación de los tratamientos. A pesar de todos estos avances, aun, se desconocen muchos detalles en torno a la implantación embrionaria, el punto más crítico del establecimiento del embarazo, lo que limita su manejo clínico. El embarazo se diagnostica clínicamente por la visualización de un saco gestacional durante un período de amenorrea. Aproximadamente un 15 por ciento de los embarazos clínicos sufren una pérdida gestacional espontánea, si se tiene en cuenta la incidencia de pérdida gestacional en las etapas más tempranas, se estima que esta cifra puede aumentar hasta un 25 por ciento del total de gestaciones que se inician con un test de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) positivo (4). Se sospecha que la mayor parte de estas pérdidas de la gestación se deben a defectos en la respuesta del útero durante la invasión del embrión y a la alta tasa de anomalías cromosómicas detectadas en los embriones durante la etapa preimplantacional. La falta de herramientas para monitorizar este proceso genera una gran incertidumbre hasta la confirmación del embarazo clínico por ultrasonidos.

Una implantación exitosa requiere un endometrio receptivo, un embrión funcional en la etapa de blastocisto y sincronía funcional entre ambos para que finalmente habilite el establecimiento del diálogo molecular entre los tejidos maternos y embrionarios permitiendo la progresión de la implantación. El fallo de implantación es el paso más

limitante en la consecución del embarazo y a pesar de que se descubren cada vez un mayor número de factores influyentes, sigue siendo la “caja negra” desconocida e inaccesible durante al manejo clínico en medicina reproductiva (5). Descifrar los procesos biológicos que intervienen en la implantación, es el primer paso para proponer potenciales marcadores clínicos en la mujer receptora de los embriones que pueden predecir el estado de receptividad del útero.

Hasta hace pocos años una medida, relativamente generalizada, para aumentar el éxito de los tratamientos de FIV ha consistido en aumentar el número de embriones que se seleccionan para transferir al útero materno. Esta estrategia compensaba las deficiencias de las técnicas, entonces menos garantistas, y la limitación, aun presente, de desconocer los factores que intervienen en la interacción embrión-endometrio. La incidencia de gestación múltiple está directamente relacionada con el número de embriones transferidos y alcanza valores elevados en mujeres sometidas a TRAs, en UE y EEUU, siendo del 26,4 y un 35,4 por ciento, respectivamente. La mejora de las técnicas en el cultivo y la criopreservación de embriones y de gametos ha promovido, prácticamente de forma consensuada, una tendencia responsable para desaconsejar esta medida y reducir el número de embriones seleccionados por cada ciclo de transferencia; de esta forma se está disminuyendo la tasa de embarazo múltiple y las complicaciones obstétricas derivadas de la aplicación de TRAs.

Si alguna condición puede comprometer la receptividad endometrial en un determinado ciclo, no existe beneficio transfiriendo un mayor número de embriones para aumentar las probabilidades de embarazo. Además, transferir embriones viables en un ciclo, en el que, hipotéticamente, el endometrio no está preparado, supondría una pérdida del potencial reproductivo de la pareja que ya está sometida a un tratamiento para solventar un problema de fertilidad.

1.3 El diálogo materno-embriionario durante la implantación

La implantación embrionaria tiene lugar entre 7 y 10 días después de la ovulación, es un proceso crítico en el proceso reproductivo, un fenómeno biológico único en el que células de distinta morfología y distinto origen genético (células del endometrio en el útero de la receptora y células del trofoblasto del embrión) se acoplan funcionalmente para que tenga lugar la gestación. En un ciclo menstrual de 28 días, el estado de mayor receptividad endometrial corresponde al período comprendido entre los días 21 y 24 (6). Durante este tiempo tanto el blastocisto como la mucosa uterina desarrollan la capacidad de interactuar a través del establecimiento de un diálogo materno-embriionario bidireccional que permite la progresión de la gestación (7).

El embarazo es una sucesión de eventos fisiológicamente coreografiados que permiten el diálogo materno-embriionario en distintos niveles como el hormonal, el genético, el epigenético e involucra tejidos y células de distinto origen como el trofoblasto, el endometrio, la decidua y el sistema inmunitario. Las glándulas del endometrio y las células que conforman la decidua secretarán factores de crecimiento, proteasas, inhibidores, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión (integrinas y cadherinas) que establecerán una interacción compleja que habilita la aceptación del tejido materno para que tenga lugar la implantación embrionaria.

Hasta la fecha, el aumento de la hCG es el único biomarcador clínico que puede manifestar el progreso en la implantación en la fase más temprana. Esta glicoproteína es sintetizada por las células del citotrofoblasto y es detectable en orina y sangre a los pocos días después de que haya comenzado la implantación, e irá aumentando progresivamente a la vez que evoluciona el embarazo (8). Actualmente no se dispone de otros marcadores alternativos para valorar la

progresión del embarazo hasta la valoración ecográfica a partir de la 6ª semana de gestación.

1.3.1 -Fases de la implantación embrionaria

El proceso de la implantación se postula que acontece en tres fases sucesivas; aposición, adhesión e invasión (9).

La aposición comprende el momento en el que el blastocisto, que ha eclosionado tras desprenderse de la zona pelúcida, se desplaza rodando por la cavidad endometrial en un fenómeno conocido como "rolling" y contacta con la superficie endometrial. Desde el epitelio endometrial y glandular se proyectan hacia el lumen unas protrusiones apicales denominadas pinópodos y microvellosidades endometriales (10), que además de la función secretora, parece que absorben el fluido de la superficie facilitando la aproximación del blastocisto para un contacto más estrecho con la capa celular más externa del epitelio del endometrio. Durante la aproximación, el trofoblasto establece contactos inestables con la mucosa uterina hasta quedar inmovilizado en un punto concreto que se convierte en el sitio de implantación (11).

El influjo hormonal que ejercen los esteroides sexuales secretados por el ovario influyen sobre la expresión génica de diversos factores como citoquinas de señalización, factores de crecimiento y moléculas específicas que promueven la adhesión embrionaria (10,12,13). La adhesión del blastocisto al endometrio se produce a través de glicoproteínas de superficie en la membrana, cuyos mecanismos específicos aún no se conocen con exactitud, siendo una de las más conocidas es el *Leukemya inhibitory factor* (LIF) del que ampliaremos más detalles a continuación.

Las protrusiones trofoblásticas ya adheridas a la superficie del endometrio amplían la superficie de contacto con el endometrio e incluso penetran en las criptas

glandulares. Este conjunto de células trofoblásticas fusiona sus membranas hasta formar una estructura denominada sincitiotrofoblasto que va ampliándose conforme se va estrechando su interacción con el endometrio. La secreción de lisoenzimas por parte del sincitiotrofoblasto degradarán las células del endometrio lo que a su vez facilitará más activamente la invasión del epitelio uterino; el desmantelamiento de la matriz extracelular y el tejido conectivo liberará compuestos como glucógeno y lípidos que servirán de soporte trófico al embrión. El endometrio reacciona transformándose en decidua cuyas características promueven un ambiente inmunológicamente favorable para permitir el avance del embrión en su invasión hacia el estroma sin rechazarlo (14). Después de atravesar la membrana basal, el sincitiotrofoblasto alcanza el estroma uterino e interacciona con las arterias espirales, aumentando la permeabilidad de elementos provenientes de la circulación materna y favoreciendo la consolidación de una red vascular que estabiliza la unión materno-embionaria y supone el inicio de la formación de la placenta.

1.4 Transición del embrión hasta adquirir el soporte endometrial en la etapa peri-implantatoria

Durante el período periconcepcional, el estatus nutricional y metabólico en ambos progenitores es importante para una correcta producción y maduración de los gametos, hasta el punto de que existan alteraciones epigenéticas en los gametos que pueden tener consecuencias sobre el fenotipo de la descendencia (15). En la mujer, algunos estados de desnutrición pueden influir sobre la expresión de genes reguladores de la foliculogénesis y consecuentemente pueden alterar el proceso de maduración de los óvulos (16). El embrión durante las etapas iniciales del desarrollo presenta unos requerimientos metabólicos que pueden ser determinantes para su correcta progresión (17). De esta forma los nutrientes disponibles en el tracto reproductor femenino, desde el oviducto hasta la superficie del endometrio en la cavidad uterina, serán los que interaccionan con el embrión y favorecerán la proliferación y diferenciación de las células hasta la formación del blastocisto (18).

En un ambiente adecuado, durante las primeras divisiones celulares, el embrión tiene capacidad de organizarse así mismo sin interactuar con el tejido materno en un proceso robusto e independiente, pudiendo ser incluso fuera de la cavidad uterina (19). Una vez el embrión alcanza la etapa de blastocisto, se inicia la invasión trofoblástica que promueve la decidualización y da comienzo a un proceso orquestado en el que intervienen; las células endometriales estromales que se transforman en decidua, las glándulas endometriales, las arterias espirales y también la población de células inmunológicas uterinas circundantes al nicho de la implantación. Este es un proceso con un alto costo metabólico y nutricional y por ello el ambiente uterino será determinante, la función del sincitiotrofoblasto quedará condicionada por la expresión de los genes embrionarios cuya configuración será un producto de la fecundación de los genomas de ambos progenitores. En este contexto hay que considerar que la implantación embrionaria es un proceso condicionado por el estado nutricional de los progenitores, por la expresión de aquellos factores genéticos y moleculares propios del útero materno, así como la constitución genética del embrión.

Los factores propios en el endometrio son los que determinan tanto la especificidad tisular como la idoneidad temporal para que tenga lugar la implantación y progrese con éxito. De forma extraordinaria el embrión puede iniciar la implantación en otros puntos fuera del útero en un fenómeno conocido como gestación extrauterina y/o ectópica, son procesos que cursan con test de embarazo positivos, que no suelen evolucionar y pueden generar graves trastornos de gran riesgo para la madre gestante.

Al evaluar aquellos elementos con una potencial influencia sobre la implantación embrionaria, es necesario valorar paralelamente la progresión del embarazo y datar los puntos de evolución y/o, en su caso, pérdida gestacional; de esta forma se puede discriminar cronológicamente los puntos de intervención de aquellos factores que influyen en la infertilidad de la pareja.

1.5 La donación de ovocitos modelo clásico de estudio de la receptividad endometrial y de la tolerancia materno embrionaria

Durante las últimas décadas se han producido grandes cambios socio-culturales que han propiciado un equilibrio en la igualdad de género a la hora de conciliar la actividad laboral y la vida familiar. Sin embargo, la inestabilidad económica y los cambios de rol en la pareja que devienen en mayor carga sobre la mujer, dificulta conciliar la estructura estable de un hogar y resta oportunidades y confianza a las parejas y a las mujeres que desean tener descendencia. Como consecuencia, en este contexto, se retrasa la maternidad hasta una edad en la que la mujer siente la seguridad suficiente para abordar el proyecto de tener descendencia, pero también hasta edades en las que la fertilidad de la mujer se ve comprometida y desciende sustancialmente las probabilidades de embarazo (20,21). Con el aumento de la edad de la mujer a la hora de concebir, se reduce la reserva ovárica, disminuye la calidad ovocitaria y en ocasiones se alcanza un punto límite cuando llega la menopausia o tiene lugar un fallo ovárico total e irreversible, en el que las soluciones reproductivas pasan por abordar otras alternativas. En estas circunstancias no es extraño que la donación de óvulos se haya convertido en el recurso alternativo más eficiente y que ofrece más oportunidades, en términos de probabilidad, a las mujeres que buscan tener descendencia, pero encuentran dificultades cuando desean utilizar sus propios óvulos.

Desde una perspectiva científica del estudio de la receptividad endometrial y la implantación embrionaria, la recepción de óvulos de donante crea una situación única, por la que pueden estudiarse los factores maternos que pueden influir sobre la implantación embrionaria, *in vivo*, de forma aislada y sin la influencia del óvulo. La recepción de óvulos donados abarca un conjunto de estrategias coordinadas para conseguir transferir aquellos embriones en desarrollo, obtenidos por FIV a partir del óvulo de una donante, en un endometrio receptivo de una paciente de forma sincronizada. Las constricciones éticas y legales que acarrearán el hecho de estudiar

directamente el proceso de la implantación embrionaria, *in vivo*, dificultan obtener una evidencia experimental del proceso. Una de las estrategias más frecuentes ha sido evaluar la respuesta en la receptora durante un ciclo de prueba, previo al tratamiento, y así estudiar aquellos factores presentes en el endometrio que puedan guardar alguna asociación con posteriores resultados clínicos. Sin embargo, este proceso obtiene la información a partir de un ciclo menstrual distinto al propio que culminará en la implantación embrionaria y puede ser poco representativo.

Una ventaja adicional de este modelo de receptividad endometrial basado en la recepción de óvulos de donante radica en que, a pesar del gran número de variables clínicas que pueden condicionar el éxito del tratamiento, la influencia del factor ovulatorio se reduce considerablemente cuando los criterios de selección clínica de la donante consideran la edad y el historial reproductivo previo.

1.6 La tolerancia materno-embionaria

Desde el inicio de la implantación hasta el embarazo una vez establecido y en último lugar el parto, las variaciones hormonales promueven el envío de señales y eventos de transformación celular y tisular que requieren un control inflamatorio para la correcta evolución del embarazo (22). Así algunos autores precisan que para que tenga lugar una reproducción exitosa con un recién nacido vivo y sano, son necesarios un control del estado inflamatorio durante la implantación, una tolerancia inmunológica durante el embarazo y también procesos de inflamación que faciliten el parto en el paso final del embarazo (23).

Desde el punto de vista inmunológico la implantación es un fenómeno extraordinario, en el que emerge el desarrollo de un mecanismo adaptativo que evita el rechazo del embrión cuyo un patrón fenotípico podría desencadenar una respuesta inmune en la gestante (24). En el cuerpo de la madre, el embrión constituye una identidad fenotípicamente semialogénica cuando se origina a partir

de sus propios óvulos como ocurre de forma natural y a lo largo del proceso que ha condicionado nuestra evolución. Sin embargo, el origen genético y la constitución antigénica del embrión no es un factor determinante para permitir el embarazo desde un punto de vista inmunológico. En los tratamientos de FIV con óvulos de donante, los embriones presentan un perfil proteico completamente alogénico para la receptora, producto del genoma conformado en la fecundación del óvulo de la donante y el espermatozoide del padre biológico. Curiosamente, y a pesar de esta aparente contradicción, son los tratamientos de FIV que presentan mayores tasas de éxito (25). Realmente los motivos subyacentes de que tengan mejores resultados pueden deberse a otros factores más decisivos como la edad o las causas de infertilidad propias de la pareja.

La gestación alogénica que tiene lugar durante la recepción de óvulos de donantes genera un gran interés por los mecanismos de tolerancia que se desarrollan (26). A pesar de la mayor disimilitud a nivel del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) durante la interacción materno-embionaria, se especula que durante la implantación embrionaria, más que una supresión inmunológica intensa, se produce una cooperación eventual entre el sistema inmune materno y las células trofoblásticas, favoreciendo un entorno privilegiado en el que se sostiene un balance de procesos inmunoestimuladores y supresores para que el embarazo pueda progresar (27–29).

1.6.1 -La cooperación intercelular y el sistema inmune como mediador durante la implantación

Durante la invasión trofoblástica de la pared uterina se produce una brecha tisular en la que se ha observado un alto índice de reclutamiento de células inmunes, de estas, se contabilizan que un 65-70% corresponden a células *Natural Killers* (NKs), 10-20% de Macrófagos y un 2-4% de células dendríticas, cuya presencia se mantienen durante todo el embarazo (28,30). El diálogo entre las células trofoblásticas y las células inmunológicas de la decidua es uno de los fenómenos claves para que se

establezca ese equilibrio que confiere tolerancia inmunológica y un control de la respuesta anti-inflamatoria como mecanismo esencial para permitir la supervivencia del embrión. Algunos trabajos muy conocidos sostienen que la inducción de una pequeña lesión a modo de biopsia en el endometrio, en un ciclo previo al del tratamiento FIV, promueve la aproximación de factores del sistema inmunitario y otorga un efecto beneficioso para la implantación, pudiendo por ello mejorar los resultados en pacientes con fallos repetidos de implantación tras tratamientos de FIV (31–33). Ante las sospechas de que pueda existir un beneficio al realizar una pequeña lesión que promueva y estimule la inflamación de forma local en la zona de implantación, se sugiere que se debe a un mayor reclutamiento de células del sistema inmune, lo que permite un balance de la respuesta inmunológica más eficiente. El número de evidencias que señalan la importancia de las células del sistema inmune durante la implantación va en aumento, algunas de estas células sufren transformaciones específicas para proporcionar funciones de soporte durante la implantación y el embarazo (30).

La secreción de citoquinas y su papel intercomunicador en la interfase embrio-materna es uno de los fenómenos más estudiados durante la implantación embrionaria, así la presencia de determinadas citoquinas desde las etapas iniciales se ha observado esencial para que tenga lugar la implantación de forma exitosa (34). Estas citoquinas puede ser secretadas tanto por el embrión como por las células del sistema inmunitario que se localizan en el útero y son las principales responsables de crear una comunicación bidireccional que induce cambios en el perfil de respuesta de las células inmunitarias, del endometrio y del propio embrión (35). Una de las más importantes es la Interleuquina-10 (IL-10), que tiene un potente efecto pleiotrópico y actúa como un inductor molecular relevante en la transición de las células del sistema inmune que se modifican hacia un estado más "amigable" en el entorno de la implantación embrionaria, inhibe a citoquinas pro-inflamatorias y bloquea la presentación de antígenos inhibiendo la expresión del MHC (36).

Las NKs son las células del sistema inmune más abundantes en la interfase embrio-materna, confinadas en la mucosa, en el endometrio y denominándose por ello NK uterinas (NKu). Las NKu presentan un marcado perfil citotóxico y en condiciones adversas se activan y promueven la reacción inflamatoria de forma intensa, pudiendo tener consecuencias negativas para el embarazo (23). Algunas de las funciones que se le atribuyen consisten en la regulación de la invasión trofoblástica, la remodelación de las arterias espirales y el reconocimiento alogénico del embrión (37). Durante la invasión trofoblástica existe un proceso crítico en el que las NK pueden activarse y reaccionar con efectos adversos para la implantación, dicha actividad citotóxica está controlada por los macrófagos en un proceso mediado por *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β_1) (38). La IL-10 también parece ejercer un papel modulador de la respuesta de las NKu a través del control de linfocitos Th17 cuyo papel proinflamatorio podría activar la respuesta citotóxica de las NKu (36).

Los linfocitos T reguladores (Treg) son esenciales para la implantación durante las fases más tempranas del desarrollo embrionario (39). Su función parece estar directamente relacionada con los mecanismos de tolerancia modulando la respuesta de los Linfocitos T activados y, como las NKu, también participan en el reconocimiento del perfil antigénico que expresa el embrión (40).

Las células dendríticas y los macrófagos crean un gradiente inflamatorio que modifica la expresión de la capa mucilaginosa en la superficie del epitelio endometrial y aumenta la expresión de ligandos específicos para las moléculas de adhesión expresados por los blastocistos. Este gradiente de señales inflamatorias permite la aposición y adhesión del blastocisto al epitelio endometrial y promueve la implantación (30) [Figura 1]. La ausencia de células dendríticas tiene consecuencias determinantes que alteran la formación de la decidua y también altera el propio desarrollo embrionario (41), evidenciando que estas células tienen un papel relevante durante la implantación y la consecución del embarazo (30).

Los macrófagos se perfilan como los principales responsables en el mantenimiento de la homeostasis, mediante la fagocitosis de patógenos, restos celulares degradados y derivados de la apoptosis celular (42). En la inter-fase materno-embionaria los macrófagos retiran restos de células apoptóticas del endometrio mediante fagocitosis y previenen la lisis y secreción de una gran cantidad de antígenos embrionarios de manera rápida y efectiva (43)

De forma singular la población de macrófagos en el endometrio, parece sufrir una

Figura 1

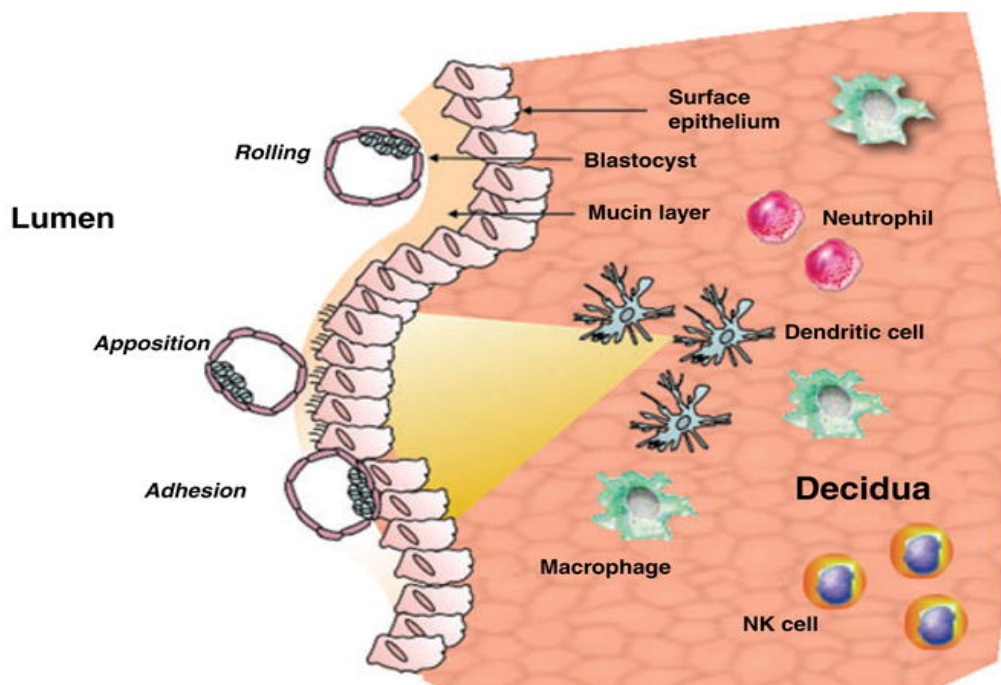


FIGURA 1. Células del sistema inmunitario durante el inicio de la implantación.

Al inicio de la implantación tiene lugar el reclutamiento de células del sistema inmune, la interacción del trofoblasto inducirá un gradiente de señal mediado por citoquinas (TGF- β e IL-6) que condicionará la respuesta y las células de la decidua se educan durante el proceso. (28).

transición por la que adquieren unas características fenotípicas que promueven el equilibrio del estado inflamatorio durante la invasión trofoblástica. De esta forma se consigue amortiguar posibles irrupciones exageradas del sistema inflamatorio que devengan en la resorción del embrión en desarrollo. Los macrófagos, además, ejercen un control sobre la activación de los linfocitos T mediante la inducción de las células Treg y también modulan la respuesta de las células NK durante la invasión de células trofoblásticas (44).

En esta situación se pueden diferenciar de forma general dos grandes tipos de macrófagos, los activados (M1) que presentan un fenotipo más pro-inflamatorio y están especializados en la presentación de antígenos y, por otro lado, aquellos con que responden a citoquinas circulantes durante la invasión trofoblástica y que se caracterizan por tener un perfil más inmunosupresor (M2). Esta transición de un estado a otro es lo que permite que los macrófagos puedan ejercer un control del estado inflamatorio durante la desorganización tisular de la decidua y la remodelación de las arterias espirales y así mantener la homeostasis que favorece el establecimiento del embarazo sin generar daños al embrión (45,46).

La IL-10 también es un regulador esencial de la actividad de los macrófagos deciduales y parece tener un papel clave en la transición de poblaciones M1 y M2. Existen evidencias experimentales que muestran una relación entre IL-10 y la transformación de los macrófagos durante todas las etapas del embarazo (44) [Figura 2].

1.7 La ruta de la p53 y la influencia sobre LIF durante la implantación embrionaria

La citoquina LIF, secretada por el tejido materno, desarrolla un papel decisivo durante la decidualización participando en la adhesión del blastocisto a la superficie del epitelio endometrial y posteriormente en la placentación (34,47,48).

Figura 2

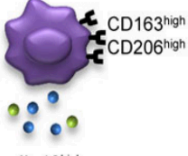
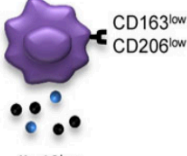
Healthy Pregnancy	Pregnancy Complications
<p>IL-10^{high} M-CSF^{high} GM-CSF^{low}</p> <p>↓</p> <p>CD163^{high} CD206^{high}</p>  <p>IL-10^{high} Low production of pro-inflammatory cytokines</p>	<p>IL-10^{low} M-CSF^{low} GM-CSF^{high}</p> <p>↓</p> <p>CD163^{low} CD206^{low}</p>  <p>IL-10^{low} Increased production of pro-inflammatory cytokines</p>
<p>Homeostasis Fetal tolerance Angiogenesis Control of infections</p>	<p>Recurrent miscarriage Preeclampsia IUGR Preterm birth</p>

Figura 2. Fenotipos del estado de transición entre un estado pro o anti-inflamatorio de los macrófagos y la evolución del embarazo.

Cambios en el fenotipo de los macrófagos durante el embarazo con evolución favorable y con complicaciones (44).

En ratones deficientes de la proteína LIF se ha observado una ausencia absoluta de decidua que por lo tanto da lugar a un fallo de implantación de los blastocistos que reciben, independientemente de que estos embriones expresen o no LIF. Sin embargo, esta situación se revierte cuando se les administra exógenamente LIF recombinante durante la etapa implantatoria (47). En humanos este fenómeno parece guardar similitudes, observándose que las pacientes sometidas a tratamientos de FIV con niveles de LIF aumentados durante la fase lútea tienen mayores tasas de embarazo (49,50).

La proteína LIF se secreta en el lumen del endometrio desde las células del epitelio glandular y se une al receptor de LIF (LIF-R) expresado en el blastocisto; como consecuencia, las células trofoblásticas expresarán LIF en un mecanismo de

respuesta paracrina/autocrina, ya que recíprocamente se unirá al LIF-R de las células endometriales (51) [Figura 3].

La actividad de LIF está a su vez mediada por LIF-R y la glucoproteína gp-130, que activa rutas selectivas JAK/STAT3, MAPK y PI3K/ATP (52,53). Por otro lado, LIF es un agente pro-inflamatorio que se expresa con intensidad en linfocitos de la decidua (54). En ratones Knock-out para el gen LIF se observan alteraciones tanto en la distribución como en la proporción de macrófagos y de NKs en el útero, que afecta a la implantación y al establecimiento del embarazo (55). En etapas posteriores se sospecha que LIF media entre los leucocitos de la decidua y las células trofoblásticas, facilitando la invasión y la remodelación de los tejidos (54).

Figura 3

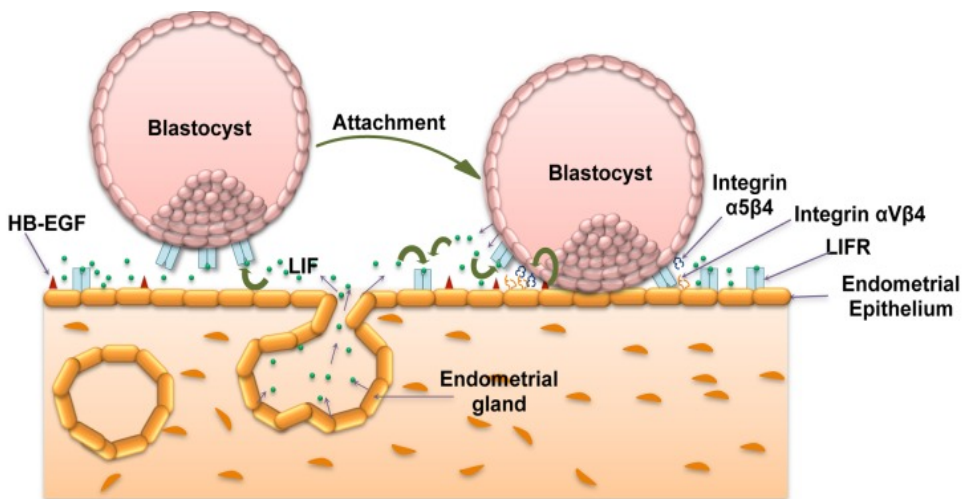


FIGURA 3. Señalización mediada por LIF y LIFR durante la adhesión del blastocisto.
Señalización mediada por LIF vía autocrina o paracrina entre células del trofoblasto y del endometrio durante la adhesión del blastocisto (51).

La expresión basal e inducible de los niveles de LIF en la etapa implantatoria parece estar regulado por la p53 y los estrógenos (56). La proteína p53 se une al primer intrón del gen de LIF modulando su actividad transcripcional e induce la expresión de LIF durante la ventana de implantación (57). Se ha observado que cambios en la secuencia del ADN del tipo *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) asociados a genes de la ruta p53 pueden influir sobre los niveles de LIF y su actividad, destacando las variantes del codón 72 de la TP53 (rs1042522), el (rs929271) en LIF, el (rs1563828) Mdm4 y el (rs1529916) en Hausp. Algunos genotipos de estas mismas variantes, que también pueden influir sobre la expresión de LIF, se han visto enriquecidas en pacientes con problemas a la hora de concebir (58).

1.8 Influencia del sistema serotoninérgico en el establecimiento y mantenimiento del embarazo

La serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT) forma parte de una gran familia de moléculas conocidas como monoaminas indolamidas que son sintetizadas a partir del triptófano y de la acción de las enzimas triptófano hidroxilasa (TPH) y triptófano descarboxilasa (TDC). El papel más conocido de la 5-HT es el de neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC); sin embargo, la 5-HT a lo largo de la evolución está presente en muy diversas formas de vida que incluso carecen de sistema nervioso, como las plantas y los hongos (59). En algunas plantas la 5-HT y algunas formas derivadas influyen en el desarrollo de la arquitectura radicular y participa en la intercomunicación de partes distales de la planta, promoviendo el fototropismo y el desarrollo de las raíces (60). Además de ser un neurotransmisor, en humanos, la 5-HT tiene muchas otras funciones; los receptores de 5-HT se distribuyen de forma heterogénea lo que implica que actúa como ligando en diversas localizaciones tisulares (61).

La mayor parte de la 5-HT se sintetiza en las células enterocromafines del intestino y participa activamente en diversos procesos biológicos fuera del SNC; tanto, que en

realidad sólo el 5% de la 5-HT se encuentra en el SNC y el 95% restante se distribuye en los tejidos periféricos (62). A la 5-HT se le atribuyen funciones relevantes en el sistema vascular, el aparato digestivo, el sistema endocrino, el sistema genitourinario y el sistema reproductor (63).

Existe cada vez un número más representativo de evidencias que sugieren un potencial papel inmunomodulador de la 5-HT presente en las mucosas. Recientemente se ha observado un amplio rango de receptores de 5-HT en células del sistema inmunitario como células NK, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos, estos 4 últimos tipos celulares también presentan el transportador de serotonina (SERT) (64).

De forma más generalizada la 5-HT parece actuar potencialmente en el reclutamiento de células inmunes en tejidos periféricos fuera del SNC (65,66). A bajas concentraciones participa en la proliferación de linfocitos, pero desempeña un papel inmunosupresor cuando se presenta a altas concentraciones (67). A la 5-HT se le atribuye una función de protección sobre las células NK ante el estrés oxidativo que tiene lugar durante los procesos inflamatorios, actúa reduciendo la tasas de apoptosis de las mismas (68). El papel de la 5-HT, lejos de ser conocido, es heterogéneo ya que también, parece actuar directamente sobre procesos de activación de la respuesta inmune innata como agente proinflamatorio y en el desarrollo del sistema inmune adaptativo (69).

Como se ha mencionado anteriormente, la 5-HT es una molécula altamente ubicua con presencia en una gran variedad de procesos fisiológicos en el ser humano, y el sistema reproductivo no es una excepción. Por ejemplo una de las funciones más conocidas es su influencia sobre el flujo vascular uterino, induciendo la vasoconstricción selectiva de las arterias uterinas y la contracción del miometrio en el útero (70–72). En algunos trabajos más recientes se han realizado hallazgos experimentales que han evidenciado como la disponibilidad de 5-HT es

determinante durante en las fases iniciales del desarrollo embrionario y la consecución del embarazo (73–75).

Algunos elementos del sistema serotoninérgico están presentes en el tejido endometrial y en el ovario, pero también en el propio óvulo y en el embrión. El agente de transporte SERT se detecta en el endometrio con una expresión leve pero consistente, tanto a nivel de proteína como de RNAseq (61). En el óvulo y en el embrión hasta la etapa de blastocisto, se detecta 5-HT y el transportador SERT que es funcionalmente activo durante la etapa preimplantatoria (76,77) [Figura 4]. La asimilación de 5-HT desde el espacio extracelular hasta el interior embrionario parece que se produce durante las etapas más tempranas y se han localizado puntos de mayor actividad alrededor de las membranas mitocondriales (76,78) [Figura 5].

Figura 4

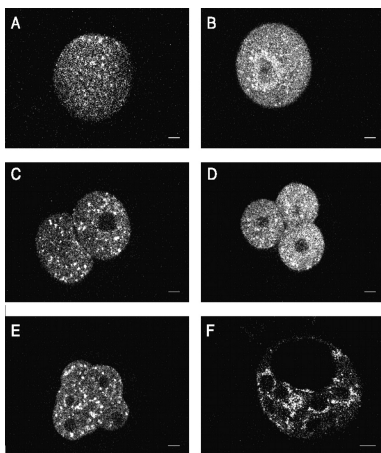


Figura 4. Distribución de serotonina en el embrión preimplantacional.

Punteado claro. (A) óvulo, (B) cigoto (B), (C) Embrión 2 células, (D) embrión 4 células, (E) embrión 8 células y (F) blastocisto (76).

Figura 5

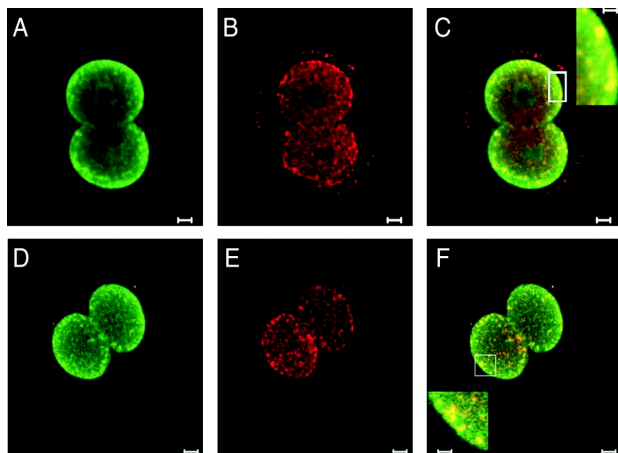


Figura 5. Colocalización de serotonina y mitocondrias en la etapa preimplantacional.

Distribución de serotonina (A) (D) y mitocondria (B) (E), en (G) y (F) se muestra la colocalización de ambas en embriones de 2 células (76).

Las monoaminas entre las que se incluye a la 5-HT, son potentes mediadores de diversos procesos fisiopatológicos en la práctica totalidad de los tejidos, por ello su concentración está muy estrechamente regulada a través de los transportadores específicos y de las vesículas de transporte en las que son almacenadas. Los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs), se expresan de forma leve/moderada en el epitelio glandular del endometrio (61) [Figura 6]. Las monoaminas, más que activarse o inactivarse enzimáticamente, son recambiadas y acumuladas para ser liberadas en los momentos en los que son necesarias; el transporte vesicular, por lo tanto, permite la acumulación de las monoaminas, como la 5-HT, a nivel citosólico para que después puedan ser liberadas a demanda (79).

Figura 6

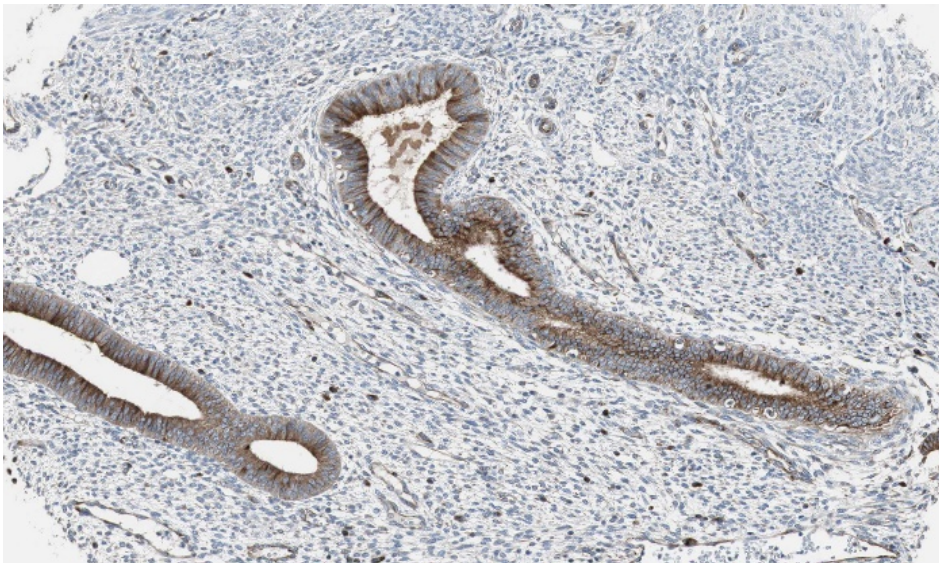


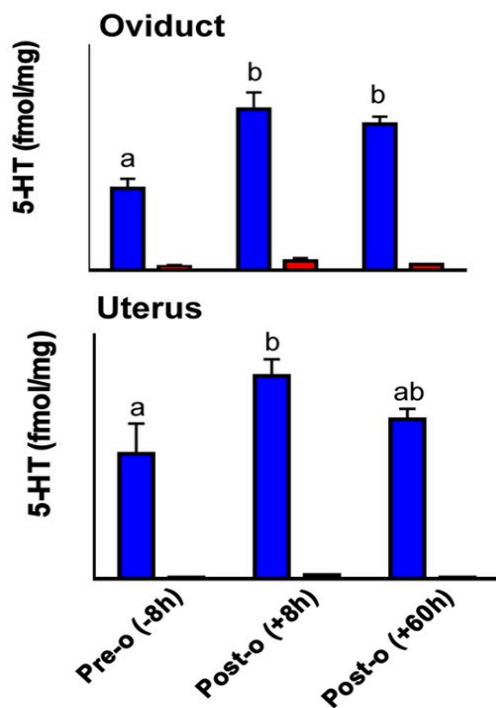
FIGURA 6. Presencia VMAT1 en el endometrio.

Detección inmunohistoquímica de la proteína VMAT1 en endometrio, se observó intensidad moderada en la zona glandular. Sin señal de hibridación en la región estromal. (61) Accedido en enero de 2014. (Patient ID: 3333 Mujer 35 años; Utero1:HPA007210, Endometrio:T-84000; Tejido: M-00100)

La actividad *Tryptophan hydroxylase 1* (TPH1) tiene efectos drásticos sobre el desarrollo embrionario temprano y su actividad enzimática es limitante en la biosíntesis de 5-HT periférica. La disrupción de esta actividad en ratones hembra pseudogestantes, conlleva un aumento del 80% en el número de embriones anormales que se recuperan(73).

La concentración de 5-HT en el oviducto y en la cavidad uterina aumenta significativamente después de la ovulación y se mantiene elevada hasta la ventana de implantación en un proceso independiente de TPH1 (77) [Figura 7]. Como ya se ha mostrado con anterioridad, se necesita un aporte materno de 5-HT durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, sin embargo, se desconoce a qué nivel tiene su efecto si es directo sobre el embrión o influye a través de la receptividad del endometrio.

Figura 7



Dinámica de la concentración de 5-HT en oviducto y cavidad uterina en función de TPH1.

Comparación de la [5-HT] en el oviducto y en la cavidad uterina con la actividad TPH1 suprimida por generación Knock-Out (KO) y ratonas salvajes (Azul). Se observa como aumenta la [5-HT] tanto en oviducto como en la cavidad uterina 8 horas (h) después de la ovulación y se mantiene elevada hasta 60 h después. Se observa como la depleción de TPH1 reduce considerablemente la [5-HT], pero el pico post-ovulatorio se produce tanto en ratonas con actividad TPH1 como las que la tienen suprimida, por lo que debe haber otros mecanismos independientes de TPH1 que permitan la secreción de 5-HT en el oviducto y la cavidad uterina.

1.8.1 -Regulación asimétrica del sistema serotoninérgico en el endometrio como posible mecanismo de prevención de la respuesta inmune

Los genes Homeobox (Hox) son factores de transcripción que durante la embriogénesis confieren la identidad celular en el eje antero-posterior de metazoos superiores. El gen Homeobox A10 (HOXA-10) interviene en el desarrollo endometrial bajo el influjo de esteroides sexuales y se ha observado que influye de forma directa en la implantación; tanto, que su delección desencadena defectos severos de implantación y reabsorción embrionaria en el período postimplantatorio (80). El efecto de HOXA 10 tiene especial relevancia a nivel funcional en el endometrio, influye directamente sobre la degradación del precursor metabólico de la síntesis de 5-HT, el Triptófano, induciendo la expresión de la enzima Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) (75).

Durante el ciclo menstrual la expresión de la enzima TDO presenta un patrón de expresión variable en el endometrio, siendo mayor durante la decidualización, lo que sugiere que la regulación de los niveles de triptófano puede que intervenga en la implantación embrionaria de forma directa o indirecta (81). La degradación del triptófano aumenta tanto en los tejidos propios del embrión en desarrollo como en los tejidos extraembrionarios que conforman la placenta, coincidente con el momento de máxima expresión de la enzima TDO en el endometrio (82,83).

A pesar de la gran ubicuidad de la TDO en un gran número de tejidos a lo largo de todo el cuerpo, su actividad se muestra con un patrón creciente en la pared del endometrio desde la superficie epitelial hacia el estroma (75). Esta asimetría conlleva a su vez diferencias en el gradiente de concentración de Triptófano, que se encuentra menos disponible en el estroma, y se sospecha que dicha disposición obedece un patrón desarrollado evolutivamente para limitar la proliferación de linfocitos T y así preveniendo el rechazo inmunológico del embrión durante la implantación (75).

La distribución del triptófano conlleva que la disposición de la 5-HT en el endometrio sea también asimétrica, y que aumente desde la región glandular hasta la región más alejada del estroma donde aumenta la actividad de degradación del triptófano [Figura 8]. Esto hace que la mayor concentración de 5-HT se localice justo en la zona de interacción materno-embionaria, aunque se desconoce qué tipo de implicación puede desempeñar esta distribución, se ha observado que los receptores 5-HT_{1D} y 5-HT₇ median en la respuesta a 5-HT y mejoran la viabilidad de los embriones en desarrollo (75).

Figura 8

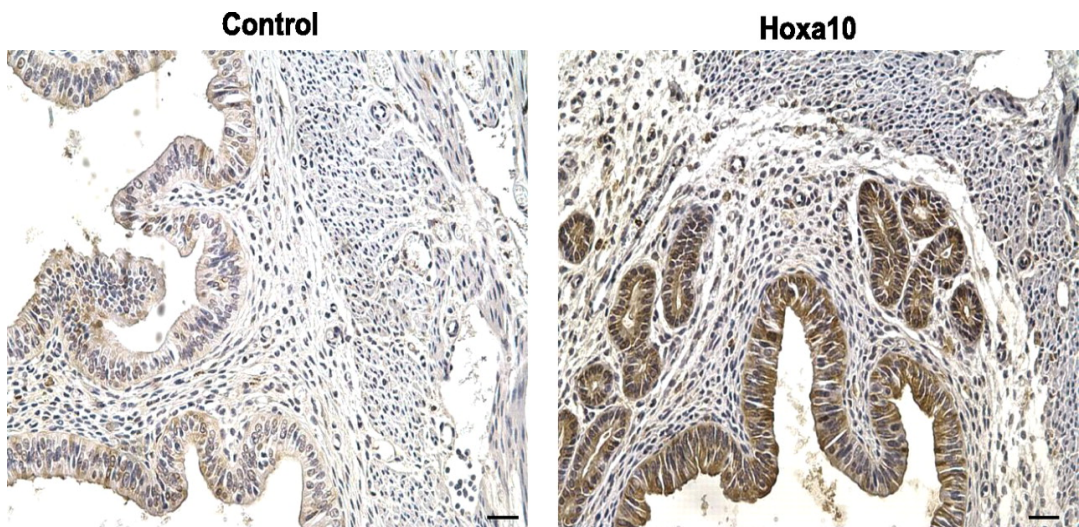


Figura 8. Distribución asimétrica de [5-HT] en el endometrio mediada por HOXA10.

Immunohistoquímica frente a 5-HT que revela su distribución asimétrica tras la activación de HOXA10. Se observa la mayor presencia de 5-HT en la región epitelial y glandular frente a los controles, que también presentan la mayor [5-HT] en la misma zona. HOXA10: transfección en ratones con vector pcDNA3.1(-)/HOXA10 cDNA y control (Vector vacío) (75)

1.9 Utilidad de las variantes genéticas para explorar la influencia de sistemas biológicos relacionados con la implantación embrionaria

Las variaciones genéticas que se encuentran entre dos seres humanos no emparentados se estima que oscilan entre el 0,1% y el 0,5% (84,85). La interacción entre las variantes genéticas y los factores ambientales son los que determinan la representatividad de los caracteres y el conjunto de fenotipos que hacen único a un individuo. Conocer el peso específico de cada variante genética permite profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos y es de gran utilidad en medicina para que se contemple la influencia de los factores genéticos y ambientales de forma conjunta para la práctica clínica orientada y personalizada (86).

El estudio mediante genes candidatos es una aproximación clásica en genética epidemiológica para evaluar la influencia de genes que puedan intervenir en un determinado proceso biológico e identificar alelos asociados a algún fenotipo o condición patológica o adversa. Esta estrategia ha sido poco utilizada para valorar la disfunción de procesos que determinan un estado de infertilidad o subfertilidad.

En cada ciclo menstrual suceden numerosas interacciones moleculares reguladas a nivel genético y cualquier variación en ellas puede manifestarse sobre el potencial de receptividad endometrial, esto hace que la elección de variaciones genéticas en genes candidatos pueda ser una buena estrategia para explorar que procesos moleculares puedan tener mayor influencia (87). Las variaciones genéticas pueden alterar la dinámica de estos genes o de otros funcionalmente relacionados con el desarrollo endometrial, a su receptividad y a la misma implantación embrionaria y por ello pueden ser representativas de sus consecuencias sobre el éxito de un tratamiento de FIV.

La recepción de ovocitos de donante, proporciona la ventaja de estudiar los grupos de receptoras clasificadas según su genotipo y que han sido sometidas a

tratamientos de FIV, a través de estos tratamientos se pueden controlar y minimizar el impacto de variables con gran peso en los resultados de los tratamientos, especialmente aquellas determinadas por la función ovárica. Por lo tanto, es una posibilidad para así evaluar la eficiencia de la implantación embrionaria conforme a la variabilidad genética del útero receptor.

Durante el desarrollo de un tratamiento de FIV se monitoriza la eficiencia de la implantación embrionaria de forma precisa; a partir del número de embriones que se transfieren se puede cuantificar la tasa de implantación cuando posteriormente se hace el recuento de sacos gestacionales observados mediante ecografía. Aun así, el estudio experimental de los procesos que acontecen durante la implantación embrionaria es inviable por motivos éticos y logísticos evidentes. Por esta razón el análisis de la influencia de variantes genéticas para el estudio de la implantación embrionaria sugiere una interesante aproximación de estudio para identificar los elementos o condiciones en la receptora que influyan a nivel uterino sobre el desarrollo embrionario y más concretamente sobre el éxito de la implantación.

La selección de genes candidatos, que puedan intervenir en procesos relacionados con la implantación, y el análisis de la distribución de las variantes genéticas en la población de pacientes, clasificadas según los resultados de TRAs; supone una oportunidad de valorar la representatividad de las variables genéticas en los resultados. Indirectamente esto informa sobre la actividad del gen y el proceso biológico en el que éste participa en el contexto de la interacción entre el endometrio y el embrión.

1.9.1 -Variantes genéticas relacionadas con la tolerancia embrio-materna: LIF y p53 como candidatas para el estudio de la implantación

La frecuencia de algunos polimorfismos relacionados con la ruta de la P53 se han visto aumentadas en la población de pacientes sometidas a tratamientos de FIV,

aunque sólo se han observado efectos predictivos sobre las pacientes menores de 35 años (58). En nuestro estudio hemos incluido algunas variantes relacionadas con la ruta p53 y LIF, para evaluar su influencia en los resultados de los tratamientos sobre nuestro grupo de receptoras [Tabla 1].

✓ *Tumor protein P53 (TP53) rs1042522 (Arg72Pro)*

La variante genética seleccionada en la p53 es un polimorfismo codificante, ampliamente estudiado, que consiste en el cambio de una C por una G en el transcrito y conlleva el cambio en el codón 72 de la secuencia de aminoácidos de una Prolina (P) por una Arginina (R) (Arg72Pro). La influencia de la variante genética Arg72Pro sobre la implantación embrionaria ya ha sido previamente descrita, inicialmente se observó un aumento de la frecuencia del alelo Pro en las pacientes que, tras someterse a FIV, sufrieron fallos repetidos de implantación (88). En la misma línea se ha observado un enriquecimiento del alelo Pro en pacientes de FIV; sin embargo, únicamente en mujeres menores de 35 años el genotipo Pro/Pro fue predictivo de peores tasas de éxito tras el tratamiento de FIV (58).

✓ *Murine doble minute 4 (Mdm4) rs1563828*

El gen Mdm4 expresa una proteína que se une al extremo amino terminal de la P53 y actúa inhibiendo su actividad. La variante rs1563828 en el gen Mdm4 se asocia con peores resultados en las pacientes que recurren a tratamientos de FIV, la influencia que puede ejercer este polimorfismo sobre la ruta P53 no está clara aunque se conoce que dicho gen interactúa e inhibe a la p53 y otros elementos de la ruta (58).

✓ *Ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP-7) rs1529916*

Esta proteasa desubiquitina a elementos reguladores como Mdm 2 y Mdm4 e influye directamente sobre los niveles de P53 y otros elementos de la misma familia que también actúan en la ruta. El polimorfismo rs1529916 se ha visto asociado con peores resultados en pacientes que reciben tratamientos de FIV (58).

✓ *Leukemya inhibitory factor (LIF) rs929271*

Como se ha mostrado previamente LIF tiene un papel esencial durante la implantación embrionaria. Un enriquecimiento de la variante G, de este SNP localizado en la región 3'UTR, ha sido observada en pacientes con problemas de fertilidad que recurren a tratamientos de FIV, aunque no se asociado con el éxito del tratamiento (58).

Tabla 1. Variantes genéticas de la ruta p53 seleccionadas

Gen	ID SNP	Alelo Genoma	Consecuencia	EUR MAF
TP53	rs1042522	C→G Pro→Arg	Cambio de sentido. La variación influye sobre los niveles de LIF.	Arg: 71% Pro: 29%
LIF	rs929271	T→G	Variante 3' UTR modifica transcripción	T: 66% G: 34%
MDM4	rs1563828	G→A	Variante intrónica modifica transcripción	G: 68% A: 32%
USP7	rs1529916	G→A	Variante intrónica modifica transcripción	G: 69% A: 31%

1.9.2 -Variantes genéticas del sistema serotoninérgico candidatas para el estudio de la implantación

Como se ha descrito con anterioridad la disponibilidad de 5-HT durante la interacción materno-embionaria parece ser esencial; la dinámica de transporte de 5-HT y la actividad del sistema serotoninérgico están ampliamente influenciados por un gran número de genes. Las fluctuaciones en el entorno pueden producirse de forma natural en cualquier nivel del sistema serotoninérgico por variación de los niveles de 5-HT, de Triptófano y/o a través de los mecanismos de regulación local en el endometrio. Son escasos los conocimientos sobre la influencia del sistema serotoninérgico en el establecimiento del embarazo y de las condiciones genéticas que puedan condicionar los mecanismos de regulación de dicho sistema. Con el propósito de dilucidar algunas incógnitas, en el presente estudio, se han seleccionado variantes genéticas del sistema serotoninérgico que permiten evaluar parcialmente la influencia de algunos genes en la receptividad endometrial [Tabla 2].

- ✓ *Solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4), Insertion/deletion 5-HT Transporter linked polymorphism region (5-HTTLPR)*

En la región promotora del gen SLC6A4 existe una zona de control transcripcional en el que se localizan varios polimorfismos denominada 5-HTTLPR. Uno de los polimorfismos más estudiados consiste en una inserción/delección en el número de repeticiones de una secuencia repetitiva de elementos ricos en GG de unos 20-23 nucleótidos. Entre los alelos se puede distinguir un alelo largo (L) con 16 repeticiones que se asocia a mayores tasas de expresión y un alelo corto (S) con 14 repeticiones asociado a un menor grado de transcripción génica. La tasa de expresión asociada a los alelos L y S es variable relacionándose L con mayor expresión y mayor tasa de recaptación y de forma contraria S con menor expresión e internalización de 5-HT desde el exterior celular. Puesto que 5-HTT está presente en el embrión y en el

endometrio (61,76,79), es una variante candidata para valorar su influencia en la receptividad endometrial.

✓ *Tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) rs1800532*

La TPH1 se expresa en el epitelio glandular del endometrio de forma consistente (61), su actividad influye sobre los niveles de 5-HT a través de la síntesis de su precursor el Triptófano que como se ha mencionado anteriormente adquiere una función esencial para garantizar el desarrollo embrionario durante las etapas más tempranas (75,77). Esta variante genética es una de las más estudiadas y se ha relacionado frecuentemente con variaciones en la función de este gen.

✓ *5-Hydroxytryptamine Receptor 1A (5-HT1A) rs6295*

La presencia de 5-HT1A se concentra en el sistema nervioso central, pero también se expresa en otros tipos celulares como las células del sistema inmune, cuyo papel en el sitio de implantación embrionaria puede ser relevante (89,90). La variante C1019G 5-HT1A modifica la secuencia de un palíndromo que hace más efectiva la unión de distintos factores de transcripción en la región promotora aumentando la afinidad de los represores Nuclear Deaf1 related (NUDR) / Deformed epithelial autoregulatory factor 1 (Deaf1). Algunos trabajos reportan que el alelo C aumenta la afinidad de los represores que bloquean más intensamente la transcripción y se asocian a una menor cantidad de receptor HTR1A, de forma contraria el alelo G induce una mayor densidad de receptor HTR1A. (91).

✓ *5-Hydroxytryptamine Receptor 2A (5-HT2A) rs6313*

El gen 5-HT2A se expresa levemente en el endometrio pero también se ha visto en células intermediarias del sistema inmunitario presentes en la implantación (90). La variante consiste en un cambio de nucleótido T102C e induce un cambio sinónimo del aminoácido en la posición 34, algunos trabajos han reportado diferencias en la

actividad del gen según la presencia de una u otra variante, presumiblemente por cambios en la expresión (92).

✓ *5-Hydroxytryptamine Receptor 2C (5-HTR2C) rs3813929*

El receptor 5-HT2C está presente también en células del sistema inmunitario y, en modelos animales, está envuelto en la activación de macrófagos (90,93). La variación -759T/C parece tener un efecto sobre el dominio de unión al ADN que afecta a la expresión génica del receptor (94). Por este motivo se ha seleccionado para evaluar su potencial influencia en la implantación embrionaria.

✓ *5-Hydroxytryptamine Receptor 3B (5-HT3B) rs1176744*

El receptor HT3B se expresa moderadamente en placenta con representación a nivel proteico, pero sólo se observa una leve expresión a nivel endometrial (61). La variante supone un cambio de base no sinónimo con la sustitución de una Tirosina (Tyr) por una Serina (Ser) en la posición 129 (Tyr129Ser). La variante Ser129 conlleva una ganancia de función y aumento de la respuesta a la unión de 5-HT (95).

✓ *Monoamine oxidase A (MAO-A) rs3788862 y rs979605; Monoamine oxidase B (MAO-B) rs3027452*

MAO es una enzima que degrada 5-HT y otras aminas a nivel citosólico y en la membrana mitocondrial externa; se ha visto que las dos formas MAO-A y MAO B se expresan de forma consistente en el epitelio glandular del endometrio (61). Recientemente se ha propuesto que MAO-A puede regular los procesos inflamatorios modulando la actividad de Macrófagos y monocitos a través de un proceso regulatorio mediado por la catalización de aminas como la serotonina (96).

MAO-B parece tener una presencia más generalizada en el útero durante todo el ciclo y no tan específica como la MAO-A que está confinada prácticamente en la región glandular durante la fase secretora (97). Se han seleccionado algunas de las

variantes genéticas más estudiadas en ambas isoformas con el fin de explorar la existencia de algún tipo de asociación entre estas y la implantación embrionaria.

✓ *Vesicular Monoamine Transporter 1 (VMAT1) rs1390938 y rs2270641*

La proteína VMAT1 se ha identificado con una expresión moderada en el endometrio glandular, aunque actualmente no se ha validado transcripcionalmente por RNAseq (61). Esta proteína es la principal encargada del transporte vesicular y tiene una gran afinidad por la 5-HT (98). Se han seleccionado dos variantes que inducen una sustitución no sinónima de aminoácido y que potencialmente pueden desenmascarar alguna asociación del VMAT1 con la implantación. La variante rs1390938 conlleva el cambio de una Treonina (Thr) por una Isoleucina (Ile) en el residuo 136, la forma Thr136 reduce la tasa de transporte vesicular un 35% con respecto a la proteína con el residuo Ile136 (99).

La variante rs2270641 modifica el residuo 4 con el cambio de una Thr por una Prolina (Thr4Pro), aunque su efecto funcional no ha sido caracterizado, se ha relacionado con algunas condiciones patológicas por lo que se sospecha de una influencia fenotípica aun no clarificada ya que potencialmente induce cambios en la proteína.

Tabla 2. Variantes genéticas del sistema serotoninérgico seleccionadas

Gen	ID SNP	Alelo Genoma	Consecuencia	EUR MAF
SLC6A4	5-HTTLPR	S→L	S induce menor tasa de expresión y L mayor tasa de expresión.	L: 51% S: 49%
TPH1	rs1800532	G→T	Variante intrónica. No se conoce efecto directo sobre la actividad del gen.	G: 61% T: 39%
HT1A	rs6295	C→G	Variante localizada en la región promotora que influye sobre la unión de los represores de la expresión del gen.	C: 54% G: 46%
HT2A	rs6313	G→A	Variante sinónima del exón 1. No se conoce efecto directo sobre la actividad del gen.	G: 56% A: 44%
HT2C	rs3813929	T→C	Modifica dominios de unión al ADN en la región 5' influyendo sobre la transcripción del gen HT2C.	T: 16% C: 84%
HT3B	rs1176744	A→C Tyr129Ser	Variación de cambio de sentido. Ser129 induce una ganancia de función aumentando la respuesta ante 5-HT con respecto a la variante Tyr129.	A (Tyr): 69% C (Ser): 31%
MAO-A	rs3788862	A→G	Variante de localización intrónica en una secuencia reguladora.	A: 29% G: 71%
MAO-A	rs979605	A→G	Variante de localización intrónica.	A: 29% G: 71%
MAO-B	rs3027452	G→A	Variante de localización intrónica.	G: 83% A: 17%
VMAT1	rs1390938	G→A Thr136Ile	Variación de cambio de sentido. La variante Thr136 confiere una menor tasa de transporte vesicular de 5-HT <i>in vitro</i> .	G (Thr): 75% A (Ile): 25%
VMAT1	rs2270641	T→G Thr4Pro	Variación de cambio de sentido. No se han descrito cambios en la función del gen.	T (Thr): 64% G (Pro): 36%

2. OBJETIVOS

2.1 Justificación del estudio

El fallo de implantación es considerado como uno de los principales factores limitantes de los tratamientos de FIV, con la dificultad de que exista un gran desconocimiento acerca del diálogo molecular que se establece entre el embrión y el endometrio. Por este motivo son escasos los recursos clínicos disponibles para abordar aspectos que puedan estar relacionados con un defecto de implantación, de receptividad endometrial o simplemente en parejas que han recibido reiterados tratamientos sin éxito a pesar de transferir embriones de buena calidad. La imposibilidad de abordar ensayos clínicos en humanos sin tener la certeza de comprometer la consecución y el progreso del embarazo hace muy difícil obtener datos sobre este fenómeno crucial de la medicina reproductiva. Las variantes genéticas representan una fuente de variación biológica objetiva, subordinadas a un entorno molecular específico, con un análisis accesible gracias a las tecnologías actualmente disponibles, que no genera impacto sobre la progresión del tratamiento y por lo tanto son una alternativa asumible desde el punto de vista experimental. Si la variante genética tuviera alguna influencia durante el proceso de la implantación embrionaria, bien a través de la función del propio gen en el que está o bien indirectamente a través de otro, puede reflejarse en los resultados y así arrojar información con potencial utilidad desde el punto de vista clínico. En este contexto, el desarrollo del trabajo queda justificado por aportar una forma alternativa de explorar aquellos procesos biológicos que pueden estar relacionados con la implantación embrionaria y el establecimiento y la progresión del embarazo.

2.2 Planteamiento e hipótesis

Uno de los grandes enigmas que se presentan en medicina reproductiva concierne a la tolerancia materno-embionaria que permite el desarrollo de un ambiente molecular y celular local, en el que se establece un equilibrio de interacción con el sistema inmunológico. Además de la influencia de las hormonas sexuales, Estradiol y

Progesterona, otros entes moleculares pueden influir en el control de la respuesta inmune como los elementos de la ruta de la p53 y los elementos del sistema serotoninérgico. Las variantes genéticas de la ruta de la p53 y del sistema serotoninérgico han sido ampliamente estudiadas y pueden ser una fuente de variación funcional de forma individual para ambos sistemas, por lo que, de haber alguna relación, pudieran ser representativas en la implantación.

2.3 Objetivo general

Explorar la influencia de las variaciones genéticas en la ruta de la p53 y en el sistema serotoninérgico sobre los resultados de los tratamientos de FIV en un modelo de receptividad endometrial basado en la recepción de óvulos de donantes.

2.4 Objetivos específicos

1. Comparar la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes polimórficas, seleccionadas para el estudio, en la población de receptoras con las de la población de referencia. Se pretende analizar si existen fluctuaciones en la distribución de frecuencias de las variantes estudiadas en el grupo de pacientes que acuden a recibir un tratamiento de fertilidad y, por lo tanto, si estas fluctuaciones puedan relacionarse con una causa de infertilidad subyacente.
2. Evaluar las diferencias en las tasas de implantación embrionaria, de embarazo clínico, de aborto bioquímico y de embarazo evolutivo entre grupos de pacientes categorizados por genotipo de cada variante individualizada. Se pretende determinar si existe una diferencia directa entre las receptoras agrupadas por su condición genética y la evolución y el resultado del tratamiento.
3. Analizar el grado de asociación de los polimorfismos que presenten alguna variación sobre los resultados de acuerdo al genotipo. Establecer la intensidad de las

asociaciones detectadas y valorar las diferencias entre éstas según el modelo de herencia aplicado.

4. Evaluar la interacción entre las variantes genéticas y el grado de asociación con los resultados de los tratamientos a nivel alélico y genotípico. Se pretende evaluar el tipo de interacción entre las variantes que puedan estar relacionadas funcionalmente por clústeres estudiados (p53 y sistema serotoninérgico).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

El conjunto de individuos reclutados como población de estudio son mujeres que, previa indicación médica, requirieron de un tratamiento de Fecundación In Vitro (FIV) mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) sobre óvulos de donante para con ello solventar un problema de infertilidad. Así mismo para el desarrollo del presente estudio, y aunque no fueron objeto del mismo, también participaron las parejas masculinas y los donantes de gametos (óvulos y espermatozoides).

Todos los pacientes y donantes que accedieron a participar dieron su consentimiento por escrito, tanto para el tratamiento como para el estudio, a través de un documento de consentimiento informado. En el caso de los tratamientos se les proporcionaron a los pacientes los documentos de consentimiento auspiciados por la sociedad española de fertilidad (SEF) y para donar la muestra de saliva y participar en el estudio fue un documento de consentimiento aprobado previamente por el comité ético del Instituto de Fertilidad Clínica Rincón.

El diseño del estudio atiende a un estudio caso-control anidado en el que los casos y los controles se toman de la población de estudio y se van agrupando como tal en función de los resultados clínicos del tratamiento. La ventaja de este modelo de estudio es que se reducen algunos sesgos derivados de la selección de los individuos.

3.2 Población de estudio

3.2.1 -Receptoras de óvulos donados

Un total de 249 mujeres fueron incluidas en el estudio, se seleccionaron a aquellas que se sometieron a su primer tratamiento de recepción de óvulos de donante en las

instalaciones del Instituto de Fertilidad Clínica Rincón entre julio de 2009 y febrero de 2011.

✓ *Criterios de inclusión*

Se seleccionaron a aquellas pacientes que iban a recibir por primera vez un ciclo de recepción de óvulos frescos de donante, de raza caucásica y con edades comprendidas entre los 18 y los 45 años de edad, que para la transferencia embrionaria recibieran al menos dos embriones clasificados con calidad A, siguiendo los criterios establecidos por las líneas guías de la ESHRE (100). Para ello los embriones valorados entre los días + 2 y +3 de desarrollo embrionario, debían presentar 4 y entre 7-8 células respectivamente, con un patrón simétrico entre el tamaño de las células y con menos de un 10% de fragmentación sobre el volumen total del embrión.

✓ *Criterios de exclusión*

Las pacientes receptoras fueron excluidas del estudio si presentaron alguna anomalía con respecto a la disposición morfológica del endometrio, alguna sospecha de patología tubárica, un índice de masa corporal mayor de 30 kg/m², alguna malformación uterina o factor endometrial con mal pronóstico y también se descartaron aquellas parejas que acudieron con un factor masculino severo del tipo azoospermia o criptoospermia.

3.2.2 -Donantes de óvulos

✓ *Criterios de inclusión*

Las donantes seleccionadas fueron mujeres jóvenes en buen estado de salud psicofísica con edades comprendidas entre los 18 los 35 años, con ciclos menstruales regulares, sin precedentes en el historial familiar de problemas hereditarios o anomalías cromosómicas en familiares directos, con cariotipo normal 46 XX, con un

índice de masa corporal de entre 18 y 29 kg/m² y serologías negativas de VIH, VHB, VHC, sífilis y citomegalovirus.

✓ *Criterios de exclusión*

Se excluyeron aquellas donantes que presentaron una respuesta anormal al tratamiento con gonadotropinas, un cuadro severo de síndrome de ovarios poliquísticos, endometriosis, más de un aborto espontáneo previo o algún problema médico o ginecológico que pudiera comprometer el éxito del procedimiento. Antes de proceder con el tratamiento, a todas las donantes se les explica el procedimiento de forma verbal aclarándole cualquier duda, además se les proporciona un documento de consentimiento informado que deben leer, completar y firmar para prestar su consentimiento

3.3 Preparación endometrial de las receptoras de óvulos donados

La preparación endometrial se desarrolló conforme a la sistemática descrita anteriormente por Soares y colaboradores (101). En las receptoras se procedió a inducir la supresión de la función ovárica mediante la administración de un análogo de la GnRH de depósito en una única dosis (Decapeptyl; Ipsen Pharm, UK o Gonapeptyl; Ferring, Madrid, España). La supresión ovárica se comprobó a través de monitorización de ultrasonidos y en caso afirmativo, se procedió a pautar una terapia hormonal sustitutiva con valerianato de estradiol (Progynova; Schering, Madrid, España) administrado con tomas diarias con una dosis creciente que aumentó desde 2mg diarios iniciales, hasta los 6 mg diarios en la etapa final. Para el soporte de la fase lútea se prescribió una aplicación de 600 mg diarios de progesterona natural micronizada, preferiblemente por vía vaginal (Progeffik, Effik Laboratories, Madrid, España); para ello, la primera aplicación se inició coincidiendo con el día de la punción ovárica de la donante. Se procedió a realizar la transferencia embrionaria

siempre que el endometrio presentara un patrón trilaminar con un grosor mínimo de 6 mm.

3.4 Hiperestimulación ovárica controlada, punción ovárica y recuperación de folículos. Inseminación intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) y cultivo embrionario

La hiperestimulación ovárica controlada (HOC) se llevó a cabo en donantes mediante un protocolo farmacológico con hormona foliculoestimulante humana recombinante (FSHr) y controlado mediante antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Se inició durante los primeros 2-5 días con dosis fija entre 150 y 300 unidades internacionales (UI) FSHr (Gonal-F®; Merck-Serono, Barcelona, España). Las dosis iniciales se fijaron en función de la edad, el índice de masa corporal y el contaje de folículos antrales y el volumen ovárico. Posteriormente se ajustó la dosis en función de la respuesta y los valores séricos de estradiol (E2). Cuando el folículo dominante alcanzó los 14 mm de tamaño se aplicó una dosis diaria de 0.25 mg de antagonistas de la GnRH (Orgalutran; Organon, Barcelona, España) hasta el día de la inducción de la ovulación y si en las subsiguientes monitorizaciones se detectaron al menos 3 folículos que superaron los 17 mm de diámetro mayor, se indujo la ovulación mediante la administración de un análogo de la GnRH de 0.4mg de Acetato de Leuprolide (Procrin; Abbot S.A., Madrid, España). La punción ovárica se fija en quirófano 35 horas después de la administración del análogo de la GnRH. En laboratorio, bajo lupa estereomicroscópica, se procedió a la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito obtenidos (CCO). Tras incubar los complejos CCO obtenidos durante 60-120 minutos en medio de cultivo pre-equilibrado Quinn's Advantage fertilization medium (SAGE, Trumbull, CT, USA), se procedió a la decumulación ovocitaria. Para ello se expusieron brevemente los CCOs a hialuronidasa a 40UI/mL en medio Quinn's Advantage® Medium tamponado con HEPES (SAGE, Trumbull, CT, USA) y suplementado con albúmina recombinante humana (SAGE, Trumbull, CT, USA), posteriormente se procedió a la disgregación

mecánica mediante pipetas con capilares de distintos calibres hasta la obtención de los óvulos libres de células de la granulosa. Aquellos óvulos maduros que presentaron un corpúsculo polar fueron catalogados como metafase II y fueron microinyectados mediante ICSI tras 2 horas de incubación después de la decumulación. Tras la microinyección, los óvulos inseminados se dejaron individualmente en gotas de cultivo con medio pre-equilibrado Quinn's Advantage cleavage medium (SAGE, Trumbull, CT, USA) cubiertos con aceite mineral (SAGE, Trumbull, CT, USA) hasta el día 2 ó 3 de desarrollo. Los embriones sobrantes que no se transfirieron fueron vitrificados o se dejaron en cultivo hasta día 5 y ó 6, habiendo previamente cambiado el medio de cultivo en día 3 en microgotas de Blastocyst (SAGE, Trumbull, CT, USA) cubiertas con aceite mineral (SAGE, Trumbull, CT, USA). El cultivo embrionario se llevó a cabo en incubadores Minigalaxy (RSBiotech) en atmósfera de anoxia con control de oxígeno 5% O₂ y 6% CO₂.

3.5 Evaluación de la fecundación y desarrollo embrionario

La fecundación fue evaluada 16-18 horas después de la ICSI. Los cigotos se consideraron adecuadamente fecundados cuando presentaron dos pronúcleos simétricos en la posición central. La asimetría entre los pronúcleos, una posición excéntrica o una gran distancia entre los mismos penalizaron la valoración de la fecundación para el pronóstico final de la evaluación de la calidad embrionaria (102). Posteriormente se valoró la calidad embrionaria en día +2 y día +3, para lo que se tuvo en cuenta la tasa de división celular, la simetría entre las blastómeras y la extensión y el tipo de fragmentación, así como, la presencia o ausencia de multinucleación. Los embriones se consideraron de buena calidad en día +2 cuando presentaron al menos 2-4 células simétricas y un índice menor de un 15% de fragmentación sin multinucleación. En día +3 se catalogaron como embriones de buena calidad a aquellos que presentaban entre 6-8 blastómeras simétricas y un índice de fragmentación menor del 20%. La transferencia por lo tanto se llevó a cabo en día +2 o día +3 seleccionando los dos embriones de mejor calidad y aquellos

embriones de buena calidad sobrantes fueron vitrificados cuando fueron catalogados de buena calidad en día +3 o en día +5 (103).

3.6 Evaluación clínica de los resultados y la progresión de los tratamientos

La transferencia embrionaria determina el momento en el que el resultado del tratamiento dejará de ser evaluado en el laboratorio. Para una correcta evaluación del resultado del tratamiento en Instituto de Fertilidad Clínica Rincón se sigue un protocolo clínico. A los 14 días después de la recuperación de los folículos por punción ovárica y la inseminación de los óvulos maduros en metafase II mediante FIV-ICSI, se determinan y/o cuantifican los niveles de hormona coriogonadotrópica humana (HCG) en orina o suero para establecer si existe embarazo bioquímico. En el caso de que el resultado sea negativo (HCG Negativa), significa que el tratamiento no ha conseguido el embarazo y se solicita a los pacientes reconfirmar el resultado negativo por precaución. Sí, por el contrario, el resultado del test de embarazo es positivo (HCG Positivo), significa que el primer paso del embarazo ha tenido lugar y el proceso de la implantación embrionaria se ha iniciado puesto que el embrión ha progresado hasta comenzar a secretar HCG. En el caso de que espontáneamente decaigan los niveles de HCG o se obtenga un resultado posterior negativo, antes de la evaluación ecográfica, se considerará que ha tenido lugar un aborto bioquímico, cuyas causas son difíciles de determinar y el hecho de que suceda refleja alguna disfunción durante el proceso de la implantación.

En la 5^o ó 6^o semana de gestación se programan a los pacientes para recibir una ecografía diagnóstica con la que evaluar el estado del embarazo. En el caso de que se observe un saco gestacional, en la cavidad uterina, con embrión viable en su interior significa que el embarazo se ha establecido y queda clínicamente diagnosticado, es la evidencia de que la implantación ha sido exitosa. Si, por el contrario, durante la evaluación ecográfica y a pesar de seguir aumentando el nivel de HCG, no se detecta saco gestacional dentro de la cavidad uterina se determinará

un embarazo de localización desconocida o ectópico. La presencia de un feto viable con latido cardíaco más allá de la semana 12º de gestación indica la consecución de un embarazo evolutivo. Si ocurriese una pérdida gestacional espontánea entre el momento de la detección del saco gestacional y la 20º semana de embarazo, se considerará que ha tenido lugar un aborto clínico (104).

El cálculo de las tasas de éxito de los resultados en las Unidades de Reproducción Asistida son la herramienta más útil para evaluar el progreso y la estandarización de los protocolos y procesos. Una vez obtenidos los parámetros clínicos que determinan la progresión de los tratamientos de FIV, se pueden calcular las tasas reproductivas por grupos de pacientes, lo que permite comparar e identificar cualquier variación con respecto a la generalidad de los resultados. En el presente estudio, el criterio para establecer los grupos vendrá determinado por los resultados y la condición genética de los pacientes para cada una de las variantes estudiadas, y esto permitirá valorar si la condición genética puede influir sobre los resultados.

La tasa de embarazo bioquímico se calcula como la razón entre el número de pacientes que obtuvieron un test positivo de embarazo 14 días después de la inseminación de los óvulos y el número total de pacientes que reciben una transferencia embrionaria.

La tasa de aborto bioquímico, se calcula como la razón entre el número de pacientes que sufren un aborto bioquímico y el número total de pacientes con un test positivo de embarazo.

La tasa de embarazo clínico, se calcula como la razón entre el número de pacientes a las que se les diagnostica un embarazo clínico y el número total de pacientes que recibe una transferencia embrionaria.

La tasa de implantación se calcula como el cociente entre el número de sacos gestacionales observados en los controles ecográficos de embarazo y el número de embriones transferidos a las pacientes.

La tasa de aborto clínico se determina a través del cociente entre el número de pacientes que malogran un embarazo clínico antes de la semana 20 de embarazo y aquellas pacientes cuya evaluación ecográfica identificó un saco gestacional viable y por lo tanto consiguen alcanzar un embarazo clínico.

Por último, la tasa de embarazo evolutivo se calcula como la razón entre el número de pacientes que presenta un embarazo viable con latido cardíaco más allá de la semana 12 de embarazo y el número de pacientes totales que reciben un ciclo de transferencia embrionaria.

Por descarte, aquellas pacientes que no evidenciaron ningún tipo de criterio compatible con el embarazo desde la evaluación inicial del test se clasificaron como no embarazadas.

3.7 Toma de muestras y extracción de ADN

Las muestras se obtuvieron de las pacientes por raspado de la mucosa oral mediante hisopos. Una vez colectadas las muestras se procesaron para su extracción siguiendo las instrucciones del proveedor del sistema de aislamiento de ADN, QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Para el genotipado se emplearon diversas técnicas según el número y la naturaleza de las variaciones genéticas que se pretenden determinar. En cada grupo de reacciones que se prepararon, se insertaron muestras replicadas y controles negativos y positivos que sirvieron como control de calidad y que debieron de estar en absoluta concordancia en todos los ensayos para la validación de los mismos.

3.8 Técnicas de genotipado

Se estableció un límite inferior de un 80% de eficiencia para garantizar la calidad del genotipado de las muestras. A continuación, se detallan las técnicas empleadas para el genotipado de cada variante polimórfica seleccionada [Figura 9].

PLATAFORMA GENOTIPADO	Gen (ID Variante)	SISTEMA BIOLÓGICO	
Análisis de Fragmentos	SLC6A4 (5-HTTLPR)	SISTEMA SEROTONINÉRGICO	
Minisequenciación	TPH1 (rs1800532)		
	HT1A (rs6295)		
	HT2A (rs6313)		
	HT2C (rs3813929)		
OpenArray	HTR3B (rs1176744)		
	MAOA (rs3788862)		
	MAOA (rs979605)		
	MAOB (rs3027452)		
	VMAT1 (rs1390938)		
	VMAT1 (rs2270641)		
	Tp53 (rs1042522)		RUTA P53
	LIF (rs929271)		
MDM4 (rs1563828)			
USP7 (rs1529916)			

Figura 9. Plataformas de genotipado empleadas para las distintas variantes genéticas

3.8.1 -Análisis de Fragmentos:

Para detectar el polimorfismo 5-HTTLPR se desarrolló un ensayo mediante PCR a través de la mezcla con polimerasa Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). La amplificación se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler® (Applied Biosystems, UK) bajo las condiciones de 5 minutos de incubación a 94°C, seguido de 25 ciclos cuya secuencia consistió en 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C, 1

minuto a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos marcados con fluorescencia se separaron por electroforesis capilar en un analizador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer y posteriormente se valoraron con GeneMapper™ ver. 4.1 software (Applied Biosystems, UK).

3.8.2 -Minisequenciación:

El procedimiento de genotipado de polimorfismos de base única (SNP) identificados como rs1800532, rs6295, rs6313, rs3813929 se realizó mediante amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior minisequenciación (105). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

1) Amplificación de las regiones flanqueantes al marcador mediante PCR multiplex en termocicladores 2720 Thermal Cycler® (Applied Biosystems, UK) programado bajo las condiciones de 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con la secuencia 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Con el fin de eliminar el exceso de primers y dideoxinucleótidos (dNTPs) los productos de PCR fueron sometidos a digestión enzimática mediante una mezcla de ExoCiAP con 2 UI de Exonucleasa I (E.Coli) (TAKARA BIO INC, Japón) y 5 UI de fosfatasa alcalina (TAKARA BIO INC, Japón) por cada 10 µL de producto de PCR. La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos y al finalizar se procedió a inactivar la actividad enzimática mediante calor incubando 20 minutos a 80°C.

2) La minisequenciación requiere de un cebador en el extremo 3' diseñado específicamente para unirse al producto de PCR obtenido de cada locus. La mezcla de la reacción de minisequenciación conteniendo el producto de PCR, los primers de minisequenciación y los reactivos del kit SNaPshot® multiplex kit (Applied Biosystems, UK) se sometieron a las siguientes condiciones: 40 ciclos con la secuencia de 10 segundos a 96°C, 7 segundos a 50°C y 30 segundos a 60°C.

Posteriormente la muestra se purificó mediante incubación a 37°C durante 1 hora mezclada con 1 UI de fosfatasa alcalina (TAKARA BIO INC, Japón) y posterior neutralización por calor a 80°C durante 20 minutos.

3) El análisis de los productos purificados de la minisequenciación se realizó mediante electroforesis capilar en un analizador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, UK) se utilizó un marcador de referencia estándar LIZ120® (Applied Biosystems, UK). Los datos resultantes fueron analizados mediante GeneMapper™ 4.1 Software (Applied Biosystems, UK).

3.8.3 - Taqman® Open Array:

Un ensayo mediante el sistema de Taqman® Open Array Genotyping System (Applied Biosystems, UK) se desarrolló para identificar las variantes alélicas HTR3B (rs1176744), MAOA (rs3788862 y rs979605), MAOB (rs3027452), VMAT1 (rs1390938 y rs2270641), Tp53 (rs1042522), LIF (rs929271), MDM4 (rs1563828) y HAUSP (rs1529916). La subsiguiente asignación alélica se llevó a cabo mediante el uso del software Taqman Genotyper® (Applied Biosystems, UK). En cada batería de reacción se insertaron muestras replicadas y controles negativos y positivos como control de calidad que debieron de estar en absoluta concordancia en todos los ensayos para la validación de los mismos. Se estipuló una tasa mínima de asignación genotípica del 80% para valorar el SNP. El proceso de genotipado fue desarrollado por el Servicio de Genética y Proteómica de la facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco (Bizkaia).

3.9 Análisis estadístico de los datos

El diseño del estudio sigue el patrón de un estudio caso-control anidado y por lo tanto la división de la cohorte poblacional se estableció a partir de los resultados de los test de embarazo en pacientes con resultado de test hCG Negativo (casos) y

aquellos con resultado hCG Positivo (Controles). Esta clasificación inicial se realiza para valorar que tras la transferencia embrionaria se haya iniciado la implantación, independientemente de que finalice exitosamente o no. El test exacto se empleó para valorar como se comportaban las frecuencias en el equilibrio de Hardy-Weinberg. A través del test de la Chi cuadrado (χ^2) se valoraron las diferencias entre las frecuencias alélicas de los grupos y con ello se pretendía detectar algún sesgo o asociación de alguna de las variantes con la selección de la población. Se consideraron diferencias significativas cuando los valores de p fueron inferiores a 0.05.

Para valorar las diferencias entre las frecuencias genotípicas de la población y las poblaciones generales de referencia se empleó también el test de χ^2 . En el caso de los polimorfismos de variación única (SNPs) se tomaron como referencia las frecuencias poblacionales referenciadas en el repositorio de 1000 Genome (85) y para la inserción/delección en 5-HTTLPR se valoró una población control de referencia caucásica y mediterránea que comparte un alto grado de similitud con la población de estudio (106). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para valores de p inferiores a 0.05.

Las diferencias entre las tasas de los tratamientos entre grupos de receptoras según su genotipo para cada variante se evaluaron mediante los test χ^2 y exacto de Fisher y se consideraron valores estadísticamente significativos cuando p fue inferior a 0.05.

El análisis de la varianza (ANOVA) se empleó para determinar las diferencias de edad entre los grupos de pacientes categorizadas por genotipos.

Para profundizar sobre la asociación que pudieran existir entre aquellas variantes en las que se observaron diferencias significativas en las tasas de éxito de los tratamientos según el genotipo de las pacientes, se desarrolló una valoración a través de regresión logística basada en los distintos modelos de herencia recesivo,

dominante, codominante y aditivo. De esta forma se computó el valor de *odd ratios* (OR) con un intervalo de confianza del 95% y con ello determinar el grado de asociación de cada genotipo con la población catalogada en función del resultado. Con la intención de seleccionar con mayor precisión el modelo de interacción de los genotipos, si se desconoce por completo la función biológica y no hay modelo de interacción previo, se consideró el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC) en cada polimorfismo mediante el cálculo a través de la plataforma bioinformática SNPstats (107).

Se analizaron las variantes que intervienen en la ruta p53 y las que intervienen en el sistema serotoninérgico de forma separada. Las variantes genéticas asociadas con alguno de los resultados de los tratamientos fueron seleccionadas para continuar el análisis de interacción entre genotipos y entre los alelos de forma separada comparándolo con los resultados de los tratamientos.

No se consideraron las poblaciones intermedias de embarazo y aborto bioquímico por la pérdida de representación poblacional que imposibilitó el cálculo con un mínimo nivel de confianza. Se consideraron valores de P inferior a 0.05 como diferencia significativa en el modelo de regresión logística realizado para evaluar la interacción entre genotipos y su influencia en la obtención del embarazo.

Para las combinaciones alélicas y debido a la imposibilidad de determinar experimentalmente la acción de un conjunto de alelos a nivel funcional, se estimaron las frecuencias relativas y a partir de ellas las posibles frecuencias de las combinaciones de interacción entre los alelos. Con los resultados de dichas estimaciones resultantes se procedió mediante un modelo de regresión logística a evaluar su posible asociación con los resultados. Para este análisis también se empleó la plataforma de SNPstats y se consideró significación estadística para valores de p inferior a 0.05.

4. RESULTADOS

4.1 Características demográficas y clínicas de la población de estudio

Un total de 249 pacientes que se sometieron a un tratamiento de recepción de óvulos procedentes de donantes accedieron a dar su consentimiento y proporcionar una muestra de saliva para la extracción de ADN. La población estuvo conformada por mujeres de origen caucásico y en su gran mayoría de la región mediterránea, la media de edad del conjunto de pacientes fue de 40.49 (\pm 4.31) años y los resultados clínicos de los tratamientos que recibieron y su evolución se muestran en la [Tabla 3].

Los diferentes motivos por los que las pacientes recibieron este tipo de tratamiento de FIV con óvulos donados fueron; edad avanzada (56.1%), fallo ovárico (23.4%), baja respuesta a las gonadotropinas en tratamientos previos (12.4 %) y endometriosis (4.1%).

Los óvulos obtenidos tras la punción folicular se prepararon para su inseminación mediante inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI), tras el cultivo de los embriones se seleccionaron aquellos de mayor calidad para su transferencia embrionaria y 14 días después de la inseminación de los ovocitos se les requirió a las pacientes un test inicial de embarazo a partir de muestras de orina o sangre periférica para la detección de HCG en sangre. En función de los resultados iniciales de las pruebas de embarazo las pacientes se dividieron en dos grupos según se hubiese considerado un resultado positivo HCG (+) N=165 o un resultado negativo de la prueba HCG (-) N=84 [Tabla 3]. A partir de esta clasificación inicial, las subsiguientes exploraciones se realizan para valorar la evolución del embarazo mediante exploración ecográfica a partir de la quinta semana de embarazo, la observación de un saco gestacional con presencia de embrión determina que la implantación ha sido exitosa y por lo tanto se trata de un embarazo clínico N=152 [Tabla 3].

Si las pacientes HCG (+) presentan una caída en los niveles de HCG y no presentaron saco gestacional de localización intrauterina o extrauterina, en la ecografía posterior, se consideró una pérdida gestacional temprana o aborto bioquímico (AbBq) (N=13) [Tabla 3]. Este fenómeno indica que el proceso de la implantación se inició, pero no pudo finalizar con la formación de un saco gestacional y por lo tanto con la consecución del embarazo.

Tabla 3. Resultados clínicos de las pacientes reclutadas en el estudio

Resultado	Nº	% (IC 95%)
Ciclos TE	249	-
hCG (+)	165	66.27 (60.39 –72.14)
Implantación (Nº sacos gestacionales/ Nº ET)	211/550	38.36 (34.30– 42.43)
Embarazo Clínico	152	61.04 (54.99 – 67.10)
Embarazo evolutivo	127	51.00 (44.80 – 57.21)
Aborto bioquímico	13	7.88 (3.77–11.99)
Aborto clínico	20	13.16 (7.78–18.53)
Embarazo ectópico	7	4.24 (1.17–7.32)

Nota: Los resultados muestran los datos de todas las pacientes reclutadas.
IC = intervalo de confianza

Si durante la exploración ecográfica no se observa un saco gestacional en la cavidad intrauterina se consideró como embarazo de localización desconocida o embarazo ectópico (EC) (N=7) [Tabla 3].

Si cuando se constata un saco gestacional viable en la cavidad intrauterina y este posteriormente detiene su evolución o desaparece, se considerará como pérdida de la gestación ya establecida y se conocerá como aborto clínico (AC) (N=20) [Tabla 3].

4.2 Análisis de distribución de frecuencias

El resultado de la prueba de embarazo determina las poblaciones de pacientes que conforman el estudio en dos, HCG (+) y HCG (-). La cohorte de pacientes HCG (+) se consideró como el grupo control y a partir de este se segregarán el resto de subgrupos a partir de los cuales se evaluará la influencia de las variantes genotípicas seleccionadas en la progresión del embarazo.

4.2.1 -Distribución de genotipos en el equilibrio Hardy-Weinberg

A partir de la distribución de frecuencias de los genotipos de cada variante individualmente en las poblaciones HCG (+) y HCG (-) se valoró el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Las pacientes hCG (+) presentaron una distribución de frecuencias genotípicas dentro del equilibrio de HW [Tabla 4]; sin embargo, se observaron diferencias significativas en algunas variantes del grupo de receptoras que no lograron el embarazo como fueron 5-HTTLPR ($p=0.018$), HTR3B (rs1176744) ($p=0.021$), MAOB (rs3027452) ($p=0.015$) y MDM4 (rs1563828) ($p=0.0022$) que por lo tanto mostraron una desviación con respecto al equilibrio de HW [Tabla 4]. Por otro lado, no se observó ligamiento en desequilibrio completo entre las variantes polimórficas seleccionadas para el estudio relacionadas con el metabolismo serotoninérgico.

4.2.2 -Distribución de frecuencias alélicas entre poblaciones mayoritarias HCG (+) y HCG (-)

El análisis comparativo de las frecuencias alélicas entre pacientes con resultados de los test de embarazo positivos HCG (+) y negativos HCG (-) mostró diferencias significativas para la variante Thr4Pro (rs2270641) asociada a la proteína VMAT1, estando enriquecido el alelo G en la población de pacientes receptoras que tras el

tratamiento no lograron el embarazo (P=0,016) [Tabla 5]. Así para la variante Arg72Pro, el alelo Pro72 aumentó un 12% en la población de mujeres que no lograron un test positivo (P=0,016) [Tabla 5].

Tabla 4. Valoración de frecuencias en el equilibrio de Hardy-Weinberg entre la población de mujeres HCG positiva (población control) y HCG negativa (población caso)

Variante genética		HCG(+)	HCG (-)
5-HTTLPR	S/S	0,09	1,8 x 10 ^{-3a}
	S/L		
	L/L		
TPH1 (rs1800532)	G/G	0,62	0,81
	G/T		
	T/T		
5-HTR1A (rs6295)	G/G	0,41	0,25
	C/G		
	C/C		
5-HTR2A (rs6313)	G/G	0,62	0,49
	A/G		
	A/A		
5-HTR2C (rs3813929)	C/C	0,08	1,00
	C/T		
	T/T		
HTR3B (rs1176744)	C/C	0,15	0,02 ^a
	A/C		
	A/A		
MAOA (rs3788862)	G/G	0,67	0,78
	A/G		
	A/A		

Variante genética		HCG(+)	HCG (-)
MAOA (rs979605)	G/G	0,54	1,00
	A/G		
	A/A		
MAOB (rs3027452)	G/G	1,00	0,02 ^a
	A/G		
	A/A		
VMAT1 (rs1390938)	G/G	0,35	0,07
	A/G		
	A/A		
VMAT1 (rs2270641)	G/G	0,60	0,82
	G/T		
	T/T		
TP53 (rs1042522)	G/G	1,00	0,19
	C/G		
	C/C		
LIF (rs929271)	G/G	0,37	0,81
	G/T		
	T/T		
MDM4 (rs1563828)	G/G	0,31	2,2 x 10 ^{-3a}
	A/G		
	A/A		
USP (rs1529916)	G/G	1,00	1,00
	A/G		
	A/A		

Nota: Valoración del equilibrio de Hardy-Weinberg. Test de la χ^2 (Pearson)

^a P < 0.05

Tabla 5. Análisis de las frecuencias alélicas entre los grupos determinados por el resultado del test de embarazo

Polimorfismo	Alelo	HCG (+)	HCG (-)	P valor
5-HTTLPR (ins/del)	S	139 (0.52)	72 (0.5)	0.718
	L	129 (0.48)	72 (0.5)	
TPH1 (rs1800532)	G	171 (0.6)	99 (0.63)	0.450
	T	115 (0.4)	57 (0.37)	
5-HTR1A (rs6295)	G	157 (0.54)	73 (0.47)	0.139
	C	133 (0.46)	83 (0.53)	
5-HTR2A (rs6313)	C	149 (0.52)	90 (0.58)	0.230
	T	139 (0.48)	66 (0.42)	
5-HTR2C (rs3813929)	C	240 (0.83)	134 (0.86)	0.480
	T	48 (0.17)	22 (0.14)	
HTR3B (rs1176744)	A	187 (0.7)	101 (0.71)	0.777
	C	81 (0.3)	41 (0.29)	
MAOA (rs3788862)	G	201 (0.72)	102 (0.72)	0.920
	A	77 (0.28)	40 (0.28)	
MAOA (rs979605)	G	183 (0.69)	103 (0.74)	0.371
	A	81 (0.31)	37 (0.26)	
MAOB (rs3027452)	G	238 (0.85)	128 (0.84)	0.823
	A	42 (0.15)	24 (0.16)	
VMAT1 (rs1390938)	G	221 (0.77)	119 (0.79)	0.538
	A	67 (0.23)	31 (0.21)	
VMAT1 (rs2270641)	T	158 (0.59)	70 (0.47)	0.016 ^a
	G	110 (0.41)	80 (0.53)	
TP53 (rs1042522)	G	208 (0.77)	95 (0.66)	0.016 ^a
	C	62 (0.23)	49 (0.34)	
LIF (rs929271)	T	184 (0.63)	99 (0.63)	0.863
	G	106 (0.37)	59 (0.37)	
MDM4 (rs1563828)	G	171 (0.59)	88 (0.57)	0.777
	A	121 (0.41)	66 (0.43)	
USP7 (rs1529916)	G	186 (0.65)	112 (0.73)	0.997
	A	100 (0.35)	42 (0.27)	

Nota: Test de χ^2 (Pearson)

^a P < 0.05

4.2.3 -Análisis poblacional y tendencia en los resultados en el grupo de estudio

Con el objeto de valorar la distribución de los genotipos para cada variante en la población general de europeos caucásicos, se emplearon los recursos disponibles en el catálogo de variantes genéticas depositada en 1000 Genome (85). En el caso de los SNPs se tomaron como referencias la distribución de frecuencias de la población de europeos caucásicos incluidas en el consorcio de 1000 Genome (Phase 3). De este modo se puede valorar si existe desviación en la población de estudio, conformada por las pacientes receptoras, cuyo origen también es caucásico.

El análisis comparativo entre las frecuencias genotípicas de las pacientes y las correspondientes a las poblaciones que se han tomado como referencia, mostró diferencias significativas para los marcadores 5-HTTLPR, rs6295 del gen HTR1A y el marcador rs2270641 de la proteína VMAT1. Para la variante ins/del 5-HTTLPR, al no ser un SNP del repositorio de 1000Genome, se hizo una excepción y se tomó como referencia la distribución de frecuencias de la población de Europeos caucásicos de la región mediterránea referenciada en un trabajo reciente cuyas características poblacionales son similares a nuestra población de estudio (106).

La población de mujeres que se someten a tratamientos de recepción de óvulos mostró un enriquecimiento del alelo S; concretamente la proporción del genotipo SS aumentó hasta un 33% frente al 19% en la población de referencia ($P=0,007$) [Tabla 6].

Para el marcador (rs6295) en el gen HTR1A se observó un ligero, pero consistente aumento del genotipo GG de hasta un 28% frente al 20% de la población de referencia ($P=0,046$) [Tabla 6]. En el SNP (rs2270641) de la proteína VMAT1 se observó un aumento del 9% para el genotipo GG en la población de receptoras con respecto a la población de europeos publicada por 1000 Genome ($P=0,003$) [Tabla 6].

Tabla 6. Análisis de las frecuencias genotípicas entre la población de receptoras participantes del estudio y poblaciones de referencia.

Gen Polimorfismo	Genotipo	Población Referencia	Pacientes totales
5-HTT (5-HTTLPR ins/del)	S/S	128 ^a	70
	S/L	247 ^a	83
	L/L	101 ^a	60
	P valor	0.007 ^c	
TPH1 (rs1800532)	G/G	185 ^b	86
	G/T	243 ^b	114
	T/T	75 ^b	35
	P valor	1	
5-HTR1A (rs6295)	G/G	101 ^b	66
	C/G	259 ^b	116
	C/C	143 ^b	55
	P valor	0.046 ^c	
5-HTR2A (rs6313)	G/G	166 ^b	67
	A/G	235 ^b	119
	A/A	102 ^b	49
	P valor	0.458	
5-HTR2C (rs3813929)	C/C	190 ^b	171
	C/T	68 ^b	57
	T/T	5 ^b	8
	P valor	0.549	
HTR3B (rs1176744)	Ser/Ser	49 ^b	26
	Tyr/Ser	212 ^b	70
	Tyr/Tyr	242 ^b	109
	P valor	0.118	
MAOA (rs3788862)	G/G	134 ^b	108
	A/G	105 ^b	87
	A/A	24 ^b	15
	P valor	0.731	
MAOA (rs979605)	G/G	132 ^b	103
	A/G	111 ^b	80
	A/A	20 ^b	19
	P valor	0.724	

Gen Polimorfismo	Genotipo	Población Referencia	Pacientes totales
MAOB (rs3027452)	G/G	181 ^b	103
	A/G	73 ^b	80
	A/A	9 ^b	19
	P valor	0.517	
VMAT1 (rs1390938)	Thr/Thr	280 ^b	158
	Ile/Thr	191 ^b	50
	Ile/Ile	32 ^b	8
	P valor	0.129	
VMAT1 (rs2270641)	Pro/Pro	64 ^b	137
	Pro/Thr	238 ^b	66
	Thr/Thr	201 ^b	16
	P valor	0.003 ^c	
TP53 (rs1042522)	G/G	253	46
	C/G	213	98
	C/C	37	65
	P valor	0.311	
LIF (rs929271)	G/G	69	114
	G/T	202	75
	T/T	232	18
	P valor	0.369	
MDM4 (rs1563828)	G/G	235	32
	A/G	213	101
	A/A	55	91
	P valor	3 x 10 ⁻⁴	
USP7 (rs1529916)	G/G	237	85
	A/G	219	89
	A/A	47	49
	P valor	0.887	

Nota: Test de χ^2 (Pearson)

^a Población referencia Mediterránea (106)

^b Población 1000 Genome Phase 3

^c P < 0.05

4.2.4 -Distribución de frecuencias genotípicas en función de los resultados clínicos de los tratamientos y su evolución

En las [Tablas 7 a y b] se muestran los resultados de los tratamientos en las receptoras agrupadas por genotipo. Se valoran las diferencias en la distribución de frecuencias genotípicas según el resultado del tratamiento y su evolución de acuerdo a las tasas de implantación, de embarazo clínico por transferencia embrionaria, de aborto bioquímico, de aborto clínico y de embarazo evolutivo.

Las pacientes mostraron diferencias en la evolución del tratamiento dependiendo del genotipo de algunas de las variantes del sistema serotoninérgico [Tabla 7a]; concretamente las variantes 5-HTTLPR, rs6295 del gen HTR1A y rs1390938 de la proteína VMAT1 [Tabla 7a]. Y también se observaron para la variante de la ruta de la p53 rs1042522 del gen TP53.

Las diferencias entre los resultados con respecto a los genotipos de la variante ins/del 5-HTTLPR mostraron una asociación negativa del genotipo LL con el éxito del tratamiento. De esta forma, las receptoras homocigóticas para el genotipo LL presentaron menores tasas de embarazo clínico y mayores tasas de aborto bioquímico.

En el análisis individual de los resultados en función del genotipo para los marcadores rs6295 (5-HTR1A) y rs1390938 (VMAT1) mostró variaciones de los mismos, con una tendencia negativa de los alelos C y A respectivamente, relacionados con menor tasa de implantación y mayor tasa de aborto bioquímico con respecto al resto de alternativas genotípicas de cada variante [Tabla 7a].

La variante rs1042522 (TP53) también está asociada a una variación en los resultados de los tratamientos en las receptoras, observándose una tendencia negativa del genotipo CC con menor tasa de implantación y de embarazo clínico [Tabla 7b].

Tabla 7a. Resultados clínicos y evolución del tratamiento de FIV por genotipo (5-HT)

Gen (Polimorfismo)	Genotipo	Edad (Media±DE)	Tasa de implantación (%)	Embarazo clínico (%)	Aborto Bioquímico (%)	Aborto clínico (%)	Embarazo Evolutivo (%)
5-HTT (5-HTTLPR)	S/S	41.1 ± 3.3	58/161 (36.0)	43/70 (61.4)	1/44 (2.3)	4/43 (9.3)	39/70 (55.7)
	S/L	40.2 ± 4.0	79/186 (42.5)	60/83 (72.3)	1/61 (1.6)	9/60 (15.0)	47/83 (56.6)
	L/L	40.1 ± 3.5	42/130 (32.3)	29/60 (48.3)	8/37 (21.6)	3/29 (10.4)	24/60 (40.0)
	P valor	^a 0.227	0.165	^b 0.014	^{a,b} 5.82 × 10 ⁻⁴	^a 0.739	0.103
TPH1 (rs1800532)	G/G	39.9 ± 4.1	66/188 (35.1)	51/86 (59.3)	3/54 (5.6)	7/51 (13.7)	41/86 (47.7)
	G/T	40.1 ± 4.4	107/259 (41.3)	73/114 (64.0)	4/77 (5.2)	7/73 (9.6)	64/114 (56.1)
	T/T	41.5 ± 3.0	29/77 (37.7)	20/35 (57.1)	3/23 (13.0)	3/20 (15)	17/35 (48.6)
	P valor	^a 0.172	0.407	0.684	^a 0.367	^a 0.698	0.452
5-HTR1A (rs6295)	C/C	40.9 ± 3.4	37/118 (31.4)	28/55 (50.9)	6/34 (17.7)	5/28 (17.9)	22/55 (40.0)
	C/G	40.4 ± 3.8	95/261 (36.4)	71/116 (61.2)	7/71 (9.9)	7/71 (9.9)	61/116 (52.3)
	G/G	39.6 ± 5.0	72/149 (48.3)	47/66 (71.2)	1/49 (2.0)	6/47 (12.8)	40/66 (60.6)
	P valor	^a 0.184	^b 0.011	0.073	^{a,b} 0.012	0.508	0.076
5-HTR2A (rs6313)	C/C	40.5 ± 4.3	55/150 (36.7)	38/67 (56.7)	5/43 (11.6)	3/38 (7.9)	34/67 (50.8)
	C/T	40.3 ± 4.3	100/267 (37.5)	72/119 (60.5)	4/76 (5.3)	9/72 (12.5)	61/119 (51.3)
	T/T	39.8 ± 3.6	45/107 (42.1)	34/49 (69.4)	1/36 (2.8)	5/34 (14.7)	27/49 (55.1)
	P valor	^a 0.668	0.641	0.372	^a 0.265	^a 0.667	0.878
5-HTR2C (rs3813929)	C/C	40.1 ± 4.2	143/382 (37.4)	103/171 (60.2)	8/112 (7.1)	14/103	88/171 (51.5)
	C/T	40.9 ± 4.0	49/125 (39.2)	35/57 (61.4)	2/37 (5.4)	3/35 (8.6)	30/57 (52.6)
	T/T	40.3 ± 3.7	11/19 (57.9)	7/8 (87.5)	0.0	0/7 (0.0)	5/8 (62.5)
	P valor	^a 0.445	0.200	^a 0.366	^a 1.00	^a 0.564	^a 0.874
HTR3B (rs1176744)	C/C	40,42 ± 4,45	22/56 (39,29)	14/26 (53,85)	2/16 (12,50)	3/14 (21,43)	9/26 (34,62)
	A/C	40,14 ± 4,72	66/150 (44,00)	47/70 (67,14)	2/49 (4,08)	3/47 (6,38)	42/70 (60,00)
	A/A	40,95 ± 3,79	96/242 (39,67)	67/109 (61,47)	1/69 (1,45)	9/67 (13,43)	56/109 (51,38)
	P valor		0.670	0.468	^a 0.084	^a 0.164	0.084
MAOA (rs3788862)	G/G	40,42 ± 4,50	99/241 (41,08)	68/108 (62,96)	2/71 (2,82)	10/68	53/108 (49,07)
	A/G	40,25 ± 4,59	75/192 (39,06)	56/87 (64,37)	3/59 (5,08)	7/56 (12,50)	48/87 (55,17)
	A/A	42,20 ± 3,41	14/34 (41,18)	8/15 (53,33)	1/9 (11,11)	0/8 (0,00)	8/15 (53,33)
	P valor		0.909	0.715	^a 0.301	^a 0.648	0.694
MAOA (rs979605)	G/G	40,60 ± 4,43	94/230 (40,87)	61/103 (59,22)	3/65 (4,62)	7/61 (11,48)	50/103 (48,54)
	A/G	40,29 ± 4,35	67/173 (38,73)	51/80 (63,75)	2/53 (3,77)	6/51 (11,76)	43/80 (53,75)
	A/A	42,32 ± 3,37	19/41 (46,34)	13/19 (68,42)	1/14 (7,14)	2/13 (15,38)	11/19 (57,89)
	P valor		0.663	0.681	^a 0.704	^a 0.856	0.660
MAOB (rs3027452)	G/G	40,63 ± 4,28	140/353 (39,66)	96/158 (60,76)	4/101 (3,96)	13/96	78/158 (49,37)
	A/G	41,12 ± 3,39	47/105 (44,76)	34/50 (68,00)	2/36 (5,56)	1/34 (2,94)	32/50 (64,00)
	A/A	39,13 ± 5,25	5/18 (27,78)	3/8 (37,50)	0/3 (0,00)	0/3 (0,00)	3/8 (37,50)
	P valor		0.350	^a 0.220	^a 0.698	^a 0.197	^a 0.145
VMAT1 (rs1390938)	Thr/Thr	40,45 ± 3,98	109/303 (35,97)	84/137 (61,31)	2/87 (2,30)	13/84	66/137 (48,18)
	Ile/Thr	40,41 ± 5,37	74/146 (50,68)	45/66 (68,18)	2/47 (4,26)	4/45 (8,89)	41/66 (62,12)
	Ile/Ile	41,19 ± 4,12	8/35 (22,86)	7/16 (43,75)	3/10 (30,00)	0/7 (0,00)	6/16 (37,50)
	P valor		^b 0,001	0.186	^a 0,006	0.406	0.089
VMAT1 (rs2270641)	G/G	39,89 ± 4,68	22/56 (39,29)	24/46 (52,17)	0/24 (0,00)	3/24 (12,50)	19/46 (41,30)
	G/T	40,69 ± 4,41	66/150 (44,00)	61/98 (62,24)	1/62 (1,61)	5/61 (8,20)	54/98 (55,10)
	T/T	40,74 ± 3,83	96/242 (39,67)	44/65 (67,69)	4/48 (8,33)	5/44 (11,36)	38/65 (58,46)
	P valor		0.067	0.250	^a 0.160	0.794	0.176

Nota. En cada columna se muestran los resultados en porcentaje de un suceso del tratamiento para las receptoras distribuidas por genotipos. Los valores de edad están representados por la media y la desviación estándar (DE). P valor calculado por test χ^2 -test o por

(^a) test exacto de Fisher's;

^b P valor < 0.05;

^c Análisis de la varianza (ANOVA)

Tabla 7b. Resultados clínicos y evolución del tratamiento de FIV por genotipo (Ruta p53)

Gen (Polimorfismo)	Genotipo	Edad (Media±DE)	Tasa de implantación (%)	Embarazo clínico (%)	Aborto Bioquímico (%)	Aborto clínico (%)	Embarazo Evolutivo (%)
TP53 (rs1042522)	G/G	40,89±3,89	105/248 (42,34)	78/114 (68,42)	2/80 (2,50)	8/78 (10,26)	66/114 (57,89)
	C/G	40,61±4,61	68/173 (39,31)	44/75 (58,67)	4/48 (8,33)	3/44 (6,82)	39/75 (52,00)
	C/C	38,28±5,11	9/41 (21,95)	7/18 (38,89)	0/7 (0,00)	1/7 (14,29)	6/18 (33,33)
	P valor		^a 0,047	^b 0,040	^a 0,333	^a 0,590	0,142
LIF (rs929271)	G/G	40,44±3,59	30/70 (42,86)	17/27 (62,96)	1/18 (5,56)	1/17 (5,88)	16/27 (59,26)
	G/T	40,42±4,68	84/220 (38,18)	56/92 (60,87)	2/58 (3,45)	4/56 (7,14)	50/92 (54,35)
	T/T	41,07±3,56	81/205 (39,51)	54/83 (65,06)	2/56 (3,57)	6/54 (11,11)	44/83 (53,01)
	P valor		0,783	0,848	^a 0,846	^a 0,683	0,852
MDM4 (rs1563828)	G/G	40,37±4,72	68/186 (36,56)	46/78 (58,97)	2/48 (4,17)	6/46 (13,04)	37/78 (47,44)
	A/G	40,39±4,22	87/197 (44,16)	58/83 (69,88)	4/62 (6,45)	2/58 (3,45)	53/83 (63,86)
	A/A	41,28±3,62	39/110 (35,45)	25/43 (58,14)	0/25 (0,00)	4/25 (16,00)	21/43 (48,84)
	P valor		0,20	0,263	^a 0,488	^a 0,098	0,080
USP7 (rs1529916)	G/G	40,35±4,74	79/223 (35,43)	54/92 (58,70)	2/56 (3,57)	8/54 (14,81)	41/92 (44,57)
	A/G	40,59±3,98	85/214 (39,72)	59/91 (64,84)	4/63 (6,35)	3/59 (5,08)	56/91 (61,54)
	A/A	41,56±3,71	26/53 (49,06)	13/18 (72,22)	0/13 (0,00)	1/13 (7,69)	11/18 (61,11)
	P valor		0,174	0,470	^a 0,832	^a 0,110	0,057

Nota. En cada columna se muestran los resultados en porcentaje de un suceso del tratamiento para las receptoras distribuidas por genotipos. Los valores de edad están representados por la media y la desviación estándar (DE). P valor calculado por test χ^2 -test o por

(^a) test exacto de Fisher's;

^b P valor < 0.05;

^c Análisis de la varianza (ANOVA)

4.3 Resultados para las variantes con significación clínica de la ruta P53

4.3.1 Arg72Pro TP53 (rs1042522)

La dotación genotípica de las receptoras con respecto a esta variante tiene influencia en la implantación. El genotipo CC (Pro/Pro) presenta casi la mitad de tasa de implantación (21,95%) con respecto a GG (Arg/Arg) (42,34%) y CG (Pro/Arg) (39,31%) (P=0,047). La diferencia en la tasa de embarazo clínico fue más moderada pero también significativamente menor siendo Pro/Pro (38,89%), Arg/Arg (68,42%) y Pro/Arg (58,67%) (P=0,040) [Tabla 7b].

En el análisis de regresión logística bajo un hipotético modelo recesivo para el alelo C (Pro) se corroboró un aumento significativo del riesgo de no conseguir el embarazo en aquellas receptoras con el genotipo Pro/Pro (P=0.035) [Tabla 8].

Tabla 8. Asociación genotípica de la variante Arg72Pro TP53 (rs1042522 con la consecución del embarazo

Embarazo clínico vs No embarazo							
N	Variante Genética	Modelo	Genotipo	Embarazo clínico	No Embarazo	OR (95% IC)	P-valor
207	Arg72Pro	Recesivo	Arg/Arg-Pro/Arg Pro/Pro	122 (94.8%) 7 (5.2%)	67 (84.7%) 11 (15.3%)	2.86 (1.06-7.73)	0.035 ^{a,b}

Nota: OR = odds ratio; IC = intervalo confianza

^a P-valor (Test- χ^2)

^b $P < 0.05$

4.4 Resultados para variantes con significación clínica influyentes en el sistema serotoninérgico

4.4.1 -SLC6A4 -Ins/del 5-HTTLPR

Tal y como se ha introducido con anterioridad se observaron diferencias en la tasa de embarazo clínico entre las receptoras según su genotipo en la variante ins/del de la región 5-HTTLPR del gen 5-HTT, observándose una disminución de la tasa de embarazo clínico considerable de la población de receptoras con el genotipo LL (48.3%) frente a las receptoras SS (61.4%) y SL (72.3%) ($p=0.014$) [Tabla 7a]. En el análisis de regresión logística el modelo dominante para el alelo S mostró que la frecuencia del genotipo LL aumentó significativamente en el grupo de receptoras que no lograron el embarazo [Tabla 9]. Las mayores tasas de implantación se asociaron a los heterocigotos LS (42.5%) frente a los homocigotos SS (36.0%) y LL (32.3%).

La tasa de Aborto Bioquímico aumentó significativamente para las pacientes receptoras con genotipo LL (21.6%) con respecto a las heterocigóticas SL (1.6%) y homocigóticas SS (2.3%) ($P= 5.82 \times 10^{-4}$) [Tabla 7a]. El modelo de regresión logística

también mostró una asociación entre la variante 5-HTTLPR y la pérdida gestacional temprana, concretamente se observó un aumento de la población de receptoras con genotipo LL que sufrieron un aborto bioquímico tras el tratamiento frente a aquellas pacientes con el genotipo SL o SS [14,21 (2,86-70,60) OR (95%IC)] (P=0.0003) [Tabla 9].

4.4.2. -HT1A- C1019G (rs6295)

Los resultados de comparar la tasa de implantación en función del genotipo de las pacientes para el polimorfismo 5-HT1A-C1019G (rs6295) mostraron diferencias significativas, observándose mayores tasas de implantación en el grupo de receptoras con genotipo GG (48.3%) que en las heterocigóticas CG (36.4%) y homocigóticas CC (31.4%) (P=0.011). La proporción de receptoras con el genotipo CC presentaron mayores tasas de aborto bioquímico (17.7%) frente a las que presentaron el genotipo CG (4.1%) y las homocigóticas GG (2.0%) (P=0.012) [Tabla 7a].

El análisis de regresión logística ajustado por edad mostró una tendencia negativa de los resultados en aquellas pacientes con genotipo CC, corroborándose un riesgo significativamente más elevado de sufrir un aborto bioquímico comparado con las pacientes que portaban los genotipos CG y GG [6,32 (1,67-23,91) OR (95%IC)] (P=0.0077) [Tabla 9].

4.4.3 -VMAT1-Thr136Ile (rs1390938)

El análisis de los genotipos para el SNP Thr136Ile (rs1390938) del gen VMAT1 reveló diferencias estadísticamente significativas en los resultados, con respecto a las tasas de implantación Ile/Ile (22.86%), Thr/Ile (51.03%) y Thr/Thr (35.86%) (P=0.001) y de aborto bioquímico Ile/Ile (30.00%), Thr/Ile (4.26%) y Thr/Thr (2.30%) (P=0.006) [Tabla 7a].

Tabla 9. Asociación genotípica de las variantes ins / del 5-HTTLPR, rs6295 y rs1390938 con la evolución de no embarazo y aborto bioquímico tras tratamiento de recepción de óvulos donados.

N	Variante Genética	Modelo	Genotipo	Embarazo clínico vs No embarazo			Embarazo clínico vs Aborto Bioquímico				
				Embarazo clínico	No Embarazo	OR (95% IC)	P-valor	Embarazo clínico	Aborto Bioquímico	OR (95% IC)	P-valor
213	Ins/Del 5-HTTLPR	Recesivo	S/S-S/L L/L	103 (78%) 29 (22%)	50 (61.7%) 31 (38.3%)	2.20 (1.20-4.05)	0.010 ^{a,b}	103 (78%) 29 (22%)	2 (20%) 8 (80%)	14.21 (2.86-70.60)	3×10 ^{-4,c,d}
237	C1019G (HT1A)	Recesivo	G/G-C/G C/C	118 (80.8%) 28 (19.2%)	64 (70.3%) 27 (29.7%)	1.78 (0.97-3.27)	0.063 ^a	118 (80.8%) 28 (19.2%)	4 (40%) 6 (60%)	6.32 (1.67-23.91)	7.7×10 ^{-4,c,d}
219	Thr136Ile	Recesivo	Thr/Thr-Thr/Ile Ile/Ile	129 (94.8%) 7 (5.2%)	74 (89.2%) 9 (10.8%)	2.22 (0.79-6.21)	0.13 ^a	129 (94.8%) 7 (5.2%)	4 (57.1%) 3 (42.9%)	13.82 (2.58-74.10)	5.3×10 ^{-4,c,d}

Nota: OR = odds ratio; IC = intervalo confianza

^a P-valor (Test-χ²) Comparación de frecuencias entre receptoras con embarazo clínico y aquellas que no lo logran

^b P < 0.05

^c P-valor (Test exacto de Fisher) Comparación de frecuencias entre receptoras con embarazo clínico y aquellas que sufrieron un aborto bioquímico

^d P < 0.05

El genotipo Ile/Ile parece verse asociado a peores resultados de cara al éxito del tratamiento comparado con los genotipos Thr/Ile y Thr/Thr.

En el estudio de regresión logística ajustado por edad bajo un modelo de herencia recesiva para el alelo A (Ile), se observa un aumento poblacional de las receptoras homocigóticas Ile/Ile que sufren un aborto bioquímico tras el tratamiento [13,82 (2,58-74,10) OR (95%IC)] (P=0.0053) frente a aquellas heterocigóticas Thr/Ile y homocigóticas Thr/Thr [Tabla 9].

4.5 Análisis de las combinaciones e interacciones entre alelos del sistema serotoninérgico.

4.5.1 -Combinaciones alélicas entre las variantes ins/del 5-HTTLPR y C1019G (5-HT1A)

El análisis de las frecuencias combinadas de los alelos en las variantes ins/del 5-HTTLPR y C1019G (5-HT1A) mostró diferencias significativas cuando se compararon las pacientes que lograron el embarazo frente a las que no. Concretamente la combinación de alelos LC se asoció negativamente con el éxito del tratamiento de forma y se observó aumentado en las pacientes que no obtuvieron el embarazo [p=0.012] [Tabla 10].

Los efectos negativos de esta combinación alélica LC se observaron también a nivel genotípico, ya que las pacientes homocigóticas para ambos alelos L (ins/del 5-HTTLPR) y C (C1019G (5-HT1A)), se mostraron proporcionalmente aumentadas en las pacientes que sufrieron un aborto bioquímico (30.77%) frente a aquellas que lograron el embarazo (7.38%). El análisis de la interacción de los polimorfismos con la progresión del embarazo, mostró que la combinación alélica LC también se asoció en mayor medida al hecho de sufrir un aborto bioquímico cuando el embarazo había tenido lugar [p=0.013] [Tabla 10].

Los resultados concuerdan en el análisis genotípico y en el análisis de la combinación de alelos, señalan una tendencia negativa de los alelos L (ins/del 5-HTTLPR) y C (C1019G (5-HT1A)) con respecto a los resultados reproductivos de los tratamientos de FIV en receptoras de óvulos donados, que se refleja tanto en el éxito de conseguir el embarazo como en el mantenimiento del mismo durante las etapas más tempranas de la implantación.

4.5.2 -Combinaciones alélicas entre las variantes C1019G (5-HT1A) y Thr136Ile VMAT1

El análisis de interacción entre las variantes de los SNPs C1019G (5-HT1A) y Thr136Ile VMAT1 mostró que la combinatoria de los alelos G (C1019G) y G (Thr136 VMAT1) son significativamente más frecuente en aquellas pacientes que lograron el embarazo clínico frente a las que no [$p=0.016$] [Tabla 11]. El análisis de asociación, por regresión logística, entre las combinaciones alélicas y el aborto bioquímico mostró una relación entre los alelos C (C1019G (5-HT1A)) G (Thr136) [$p=0.032$] y C (C1019G (5-HT1A)) A (Ile136) [$p=0.0013$] con la pérdida gestacional temprana, antes de que se establezca la implantación [Tabla 11].

4.5.3 Combinaciones alélicas entre las variantes ins/del 5-HTTLPR y Thr136Ile VMAT1

El análisis de las combinaciones alélicas entre las variantes (ins/del 5-HTTLPR) y (Thr136Ile VMAT1) mostró una asociación negativa del conjunto formado por las variantes L (ins/del 5-HTTLPR) y A (Ile136 VMAT1) con la obtención del embarazo ($p=0.021$) [Tabla 12]. Además, esta misma combinación se asoció significativamente con el aborto bioquímico ($p=0.0005$) [Tabla 12]. Aunque la presencia de esta combinación es minoritaria en la población de pacientes que consiguen el embarazo clínico, tiene proporcionalmente una alta representación entre la población de mujeres que sufre un aborto bioquímico (6.1% y 52.1% respectivamente).

Tabla 10. Análisis de asociación entre combinaciones alélicas de las variantes Ins/Del 5-HTTLPR y C1019G (5-HT1A) con el embarazo y el aborto bioquímico de las pacientes

Variantes genéticas	Embarazo clínico vs No embarazo				Embarazo clínico vs Aborto bioquímico						
	Ins/Del 5-HTTLPR (5-HT1A)	C1019G	Total	OR (95% IC)	P-valor	Total	OR (95% CI)	P-valor			
S	G	0.2831	0.2988	0.2531	1.00	0.2888	0.2988	0.0633	1.00	0.0008	
S	C	0.2407	0.2547	0.2233	1.12 (0.61 - 2.08)	0.70	0.2348	0.2547	0.0937	2.38 (0.20 - 25)	0.50
L	G	0.2393	0.266	0.2006	0.92 (0.48 - 1.75)	0.79	0.2533	0.2660	0.1808	4 (0.03 - 50)	0.26
L	C	0.2368	0.1805	0.323	1.92 (1.15 - 3.23)	0.01 ^b	0.2231	0.1805	0.6623	14.23 (1.79 - 100)	0.01 ^b

Nota: OR = odds ratio; IC = intervalo de confianza

^a Combinación alélica de referencia, es la más frecuente y se compara con las frecuencias del resto de grupos
^b P < 0,05

Tabla 11. Análisis de asociación entre combinaciones alélicas de las variantes C1019G (5-HT1A) y Thr136Ile VMAT1 con el embarazo y el aborto bioquímico de las pacientes

Variantes genéticas	Embarazo clínico vs No embarazo					Embarazo clínico vs Aborto bioquímico					
	C1019G (5-HT1A)	Thr136Ile (VMAT1)	Total	Embarazo Clínico	No Embarazo (95% IC)	OR	P-valor	Total	Embarazo Clínico	Aborto Bioquímico (95% CI)	OR
C	Thr	0.4018	0.3668	0.4554	1.00	----	0.3709	0.3668	0.4216	5.88 (1.18 - 29.18)	0.03 ^b
G	Thr	0.3775	0.4252	0.3009	0.55 (0.34 - 0.89)	0.02 ^b	0.4032	0.4252	0.0909	1.00	----
G	Ile	0.1460	0.1395	0.1572	0.94 (0.52 - 1.70)	0.84	0.1419	0.1395	0.1676	5.65 (0.81 - 39.47)	0.08
C	Ile	0.0747	0.0684	0.0865	0.93 (0.37 - 2.33)	0.87	0.084	0.0684	0.3199	19.30 (3.26 - 114.12)	1.3x10 ⁻³ ^b

Nota: OR = odds ratio; IC = intervalo de confianza

^a Combinación alélica de referencia, es la más frecuente y se compara con las frecuencias del resto de grupos

^b P < 0,05

Tabla 12. Análisis de asociación entre combinaciones alélicas de las variantes ins/del 5-HTTLPR y Thr136Ile VMAT1 con el embarazo y el aborto bioquímico de las pacientes

Variantes genéticas		Embarazo clínico vs No embarazo				Embarazo clínico vs Aborto bioquímico					
Ins/Del 5-HTTLPR	Thr136Ile (VMAT1)	Total	Embarazo Clínico	No Embarazo	OR (95% IC)	P-valor	Total	Embarazo Clínico	Aborto Bioquímico	OR (95% CI)	P-valor
S	Thr	0.4118	0.407	0.3984	1.00	--- ^a	0.3981	0.407	0.1506	1.00	--- ^a
L	Thr	0.3657	0.385	0.3563	0.92 (0.59 - 1.45)	0.72	0.3748	0.385	0.3288	2.55 (0.60 - 10.86)	0.21
S	Ile	0.1117	0.147	0.0805	0.55 (0.25 - 1.21)	0.14	0.1267	0.147	0	-	1
L	Ile	0.1107	0.061	0.1647	2.39 (1.15 - 4.99)	0.02 ^b	0.1004	0.061	0.5205	21.69 (3.93 - 119.57)	5 x 10 ⁻⁴ ^b

Nota: OR = odds ratio; IC = intervalo de confianza

^a Combinación alélica de referencia, es la más frecuente y se compara con las frecuencias del resto de grupos

^b P < 0,05

4.6 Análisis de combinado de genotipos

El análisis combinado de genotipos entre pares de variantes genéticas se realizó entre los grupos de pacientes que lograron el embarazo y aquellas que no. Las combinatorias de genotipos SL (5-HTTLPR) y GG (5-HT1A) por un lado y GG (5-HT1A) y Thr/Thr (Thr136Ile VMAT1) por otro, mostraron una relación favorable con el embarazo 0.21 (0.06-0.73) [OR IC 95%] ($p=0,008$) y 0.37 (0.14-0.94) [OR IC 95%] ($p=0,032$) respectivamente [Tabla 13]. La asociación entre los genotipos LL (5-HTTLPR) e Ile/Ile (Thr136Ile VMAT1) representa un 7,14% de la población de pacientes que no lograron el embarazo frente a la ausencia total (0%) en las que si lograron el embarazo ($p=0,0069$), esta frecuencia en las pacientes que no lograron el embarazo es muy alta en comparación con la teórica que se puede valorar según la frecuencia genotípica disponible en el repositorio de la población de referencia (1000genome) que según la estimación a partir de sus frecuencias correspondería a un 1,35%.

Tabla 13 Análisis combinado de genotipos dobles y su relación con el embarazo clínico entre las variantes Ins/Del 5-HTTLPR, C1019G (5-HT1A) y Thr136Ile (VMAT1)

Variante genética	EMB CLI SI	EMB CLI NO	OR (IC%)	P Valor *
5-HTTLPR/HTR1A	(N=122)	(N=76)		
SSGG	10	6	0.96 (0.33-2,76)	0.9203
SSGC	20	12	0.96 (0.44-2,09)	0.9203
SSCC	8	7	1.45 (0.50-4.16)	0.4930
SLGG	20	3	0.21 (0.06-0.73)	0.0078 ^{bc}
SLGC	25	18	1.20 (0.61-2.40)	0.5967
SLCC	8	4	0.79 (0.23-2.73)	0.4829 ^b
LLGG	11	4	0.56 (0.17-1.83)	0.2476 ^b
LLGC	11	13	2.08 (0.88-4.92)	0.0897
LLCC	9	9	1.69 (0.64-4.46)	0.2878
HTR1A/VMAT1	(N=125)	(N=75)		
GGAA	2	2	1.69 (0.23-12.22)	0.4818 ^b
GGAG	17	6	0.55 (0.21-1.47)	0.2301
GGGG	24	6	0.37 (0.14-0.94)	0.0318
GCAA	3	6	3.54 (0.86-14.59)	0.0694 ^b
GCAG	18	8	0.71 (0.29-1.72)	0.4463
GCGG	35	28	1.53 (0.83-2.82)	0.1692
CCAA	1	0	-	0.6249 ^b
CCAG	6	4	1.12 (0.31-4.10)	0.5558 ^b
CCGG	19	15	1.40 (0.66-2.95)	0.3802
5-HTTLPR/VMAT1	N=116	N=70		
SSAA	2	2	1.68 (0.23-12.18)	0.4842 ^b
SSAG	15	4	0.41 (0.13-1.28)	0.0898 ^b
SSGG	20	18	1.66 (0.81-3.42)	0.1648
SLAA	3	2	1.11 (0.18-6.80)	0.6235 ^b
SLAG	18	6	0.51 (0.19-1.36)	0.1715
SLGG	32	13	0.60 (0.29-1.24)	0.1648
LLAA	0	5	-	0.0069 ^{b,c}
LLAG	6	8	2.37 (0.79-7.13)	0.1175
LLGG	20	12	0.99 (0.45-2.18)	1

Nota: OR = odds ratio; IC = intervalo confianza

^a P-valor (Test- χ^2) Comparación de frecuencias entre receptoras con embarazo clínico y aquellas que no lo logran

^b P-valor (Test exacto de Fisher) Comparación de frecuencias entre receptoras con embarazo clínico y aquellas que sufrieron un aborto bioquímico

^c P < 0,05

5. RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS QUE AVALAN LOS RESULTADOS

Genetic polymorphisms of serotonin transporter and receptor 1A could influence success during embryo implantation and maintenance of pregnancy

Arturo R. Palomares, M.Sc.,^{a,b} Ana M. Lendínez-Ramírez, M.Sc.,^b Beatriz Pérez-Nevot, M.Sc.,^c Miriam Cortés-Rodríguez, M.Sc.,^c Francisco Martínez, Ph.D.,^a Nicolás Garrido, Ph.D.,^d Maximiliano Ruiz-Galdón, M.D.,^{b,c} and Armando Reyes-Engel, M.D.^b

^a Instituto de Fertilidad Clínica Rincón, IVF Laboratory and I+D+i Unit; ^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Malaga; ^c Clinical Analysis Service, Virgen de la Victoria University Hospital, Malaga; and ^d Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

Objective: To explore whether serotonin-related gene polymorphisms influence clinical outcomes of IVF treatment in recipients using donated oocytes.

Design: Nested case-control study.

Setting: University-affiliated infertility clinic.

Patient(s): Two hundred forty-five women undergoing IVF treatment with donated oocytes.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Genotype and haplotype analysis of the serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR), rs1800532, rs6295, rs6313, and rs3813929, between recipients grouped according to the results of the oocyte donation for IVF treatment.

Result(s): No differences were found between genotype distribution of the tryptophan hydroxylase 1, serotonin receptor 2A, and serotonin receptor 2C polymorphisms. Recipients carrying the LL genotype for 5-HTTLPR had lower clinical pregnancy rates (PR) and higher biochemical pregnancy loss (BPL) events. Lower implantation rates were found in CC carriers for 5-HT1A.rs6295 who also presented higher BPL rates. A lower incidence of clinical pregnancy was observed for LC haplotypes, corresponding to an increase in BPL rates.

Conclusion(s): A strong association was found between early pregnancy loss and recipients carrying the 5-HTTLPR and rs6295 genetic variants. Identifying biological processes involving serotonin and embryo implantation may help to understand the dynamics of the maternal-embryo dialogue. (Fertil Steril® 2013;99: 2009–16. ©2013 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: 5-HTTLPR, 5-HT1A, polymorphism, biochemical pregnancy loss, serotonin

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/palomares-genetic-polymorphisms-serotonin-receptor-transporter-1a/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Received October 11, 2012; revised January 25, 2013; accepted February 14, 2013; published online March 13, 2013.

A.R.P. has nothing to disclose. A.M.L.-R. has nothing to disclose. B.P.-N. has nothing to disclose. M.C.-R. has nothing to disclose. F.M. has nothing to disclose. N.G. has nothing to disclose. M.R.-G. has nothing to disclose. A.R.-E. has nothing to disclose.

Supported by PTQ 09-01-00496, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Spain. Reprint requests: Arturo R. Palomares, M.Sc., Instituto de Fertilidad Clínica Rincón, IVF laboratory, Reproduction and Infertility Unit, Avenida de la Torre N°24, Bajo, Residencial Los Claros, Rincón de la Victoria, Malaga 29730, Spain (E-mail: arturoalp@fertilidadclinicarincon.com).

Fertility and Sterility® Vol. 99, No. 7, June 2013 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2013 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.026>

VOL. 99 NO. 7 / JUNE 2013

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) comprises a highly connected molecular entity, involved in many different functions and widely detected in the reproductive tract of humans and other mammals (1–5). A serotonergic network has been described interacting between ovaries, oocytes, and developing embryos (6, 7). Animal models demonstrate that the uterus could be sensitive to changes in

2009

ORIGINAL ARTICLE: GENETICS

5-HT homeostasis, which could also affect embryo viability and maintenance of pregnancy (1, 8–10). Furthermore, fine regulation is suspected as high doses of SC serotonin and 5-HT deprivation interrupt decidualization and maintenance of pregnancy (11, 12).

Many effectors of the 5-HT related pathways have been identified in the reproductive tract of mammals (7), which add a significant clinical value as many drugs are available for modifying and controlling 5-HT fluxes (Supplemental Fig. 1, available online). However, the study of molecular interactions within the embryo–maternal interface in humans presents a barrier because of conditioning limitations for experimentation. The study of genetic variants related to 5-HT metabolism and their distribution between recipients, grouped according to reproductive outcomes obtained after an IVF-intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with donated oocyte, represents a suitable way to normalize other factors such as quality of oocytes, embryos, and sperm, isolating the potential effect of selected gene variants during 5-HT metabolism at the onset of the pregnancy.

The 5-HT transporter (SERT) is responsible for controlling extracellular levels of 5-HT and is expressed in the human endometrium (13). The 5-HT transporter could act during pregnancy as it has been shown that pregnant women treated with serotonin selective re-uptake inhibitors present an increased risk of spontaneous abortion (14, 15). Although some evidence supports these observations, the effects of serotonin selective re-uptake inhibitors on achievement of pregnancy may have passed unnoticed as these studies recruited women who were already pregnant or who had a spontaneous abortion. A candidate polymorphism to assess SERT implication is the 44-bp insertion/deletion located at the 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR), which modifies transcription rates of the solute carrier family 6 member 4 gene and therefore the activity of the transporter SERT in different cell types, like in the human placenta (16).

The polymorphism A(218)C (rs1800532) is associated with tryptophan hydroxylase-1 protein, the rate-limiting enzyme of tryptophan that is the direct precursor of 5-HT (6). Tryptophan hydroxylase-1 is detected in the endometrium, fallopian tubes and ovaries (17), activity of which has been reported to be essential for maintaining the early embryo development (9), represents a potential source of 5-HT in the uterus.

Because a functional 5-HT signaling system could be suspected from the wide range of serotonin-specific receptor subtypes identified in the uterus, ovaries, oocytes, and embryos (6, 7, 17–19), several candidate polymorphisms were selected to assess their implication. The polymorphism C(-1019)G in the 5-HT1A gene promoter seems to affect the expression of the 5-HT1A receptor and its binding with 5-HT (20). The polymorphism T(102)C has been related with different expression rates of the 5-HT2A gene and thus also with different densities of the 5-HT2A receptor (21). Finally, the functional polymorphism C(759)T in the gene 5-HT2C is involved in DNA–protein interaction, altering the self-expression of the receptor (6).

The genetic variants associated with 5-HT metabolism were used in this study to explore the influence on implanta-

tion and IVF results, focusing on pregnancy wastages at different stages using an oocyte donation model.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We conducted a nested case-control study between July 2009 and February 2011 at the Instituto de Fertilidad Clínica Rincón, involving 245 female recipients who underwent a first IVF treatment with donated oocytes. The inclusion criteria were not having received any previous ET cycle through oocyte donation, aged 18–45 years, and receiving a transfer of at least two good quality embryos defined as four to five cells on day 2 or eight cells on day 3, symmetric blastomeres, and less than 10% of total fragmentation. Recipients were excluded from this study if they presented an abnormal endometrial thickness, hydrosalpinx, body mass index (BMI) >30 kg/m², uterine disorder, or severe male factor infertility (e.g., azoospermia or cryptozoospermia). The recipients provided signed informed consent to IVF treatment approved by the Spanish Society of Fertility and also for providing samples required. The consent for the genetic study was approved by the institutional ethics review committee of the Instituto de Fertilidad Clínicas Rincón and by the ethics committee of the University of Malaga, under whose auspices the present study was carried out.

Oocyte Donors

The donors selected were healthy women with a good physical and mental state, younger than 35 years of age, with regular menstrual cycles, no prior family history of hereditary problems or chromosome abnormalities, a BMI between 18 and 29 kg/m², and a favorable testing for HIV, cytomegalovirus, hepatitis B and C, and karyotype. Donors were not accepted if they had an abnormal ovarian response to gonadotropins, polycystic ovary syndrome (PCOS), endometriosis, more than one previous miscarriage, or any medical or gynecological disorder that could compromise the success of the procedure. The donors were given an explanation and provided their specific consent for the oocyte donation before starting the procedure.

Ovarian Stimulation, Ovum Pick-up, and ICSI

Controlled ovarian hyperstimulation (COH) was developed under a protocol with GnRH antagonists. A fixed initial dose, between 150 and 300 IU, of human recombinant FSH (Gonal-F; Merck-Serono) was used daily for the first 2–5 days, depending on age, BMI, antral follicle count, and ovary volume. The dose was then adjusted depending on the ovarian response and serum E₂ level. Once the dominant follicle had reached a size of 14 mm, GnRH antagonists (Orgalutran; Organon) were also given, at a daily dose of 0.25 mg until the day of induction of ovulation. When at least three follicles reached 17 mm, ovulation was induced by the administration of a bolus of 0.4 mg of leuprolide acetate (LA; Procrin; Abbot S.A.). Oocyte retrieval was done exactly 35 hours after the administration of hCG in the donors. Decumulation was done by brief exposure to 40 IU/mL of hyaluronidase in Quinns

Advantage Medium with *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES; SAGE) supplemented with albumin (SAGE), followed by mechanical disaggregation. After a maximum of 2 hours postdecumulation, mature oocytes in metaphase II were inseminated by ICSI and were kept in culture individually in 35- μ L droplets of equilibrated Quinn's Advantage cleavage medium (SAGE) covered with equilibrated mineral oil (SAGE), until day +2 or day +3. If the culture was prolonged beyond day +3 but not beyond day +5 the droplets were replaced by 35 μ L of Blastocyst (SAGE), also under equilibrated mineral oil (SAGE). The culture was stored in Minigalaxy A incubators (RSBiotech) at a hypoxic atmosphere of 5% O₂ and 6% CO₂.

Evaluation of the Fertilization and Embryo Development

Fertilization was assessed 16–18 hours after ICSI. Zygotes were considered properly fertilized if two symmetric pronuclei (PN) were identified. Asymmetry, an excentric position or a great distance between the PN were considered poor markers in the evaluation of the fertilization (22). Embryo quality was later assessed on day +2 and day +3, considering the rate of division, symmetry between blastomeres, and the extension and type of fragmentation, as well as the presence or absence of multinucleation. Embryos considered to be of good quality on day +2 were those that presented two to four symmetric cells and less than 15% fragmentation without multinucleation. Good quality embryos on day +3 were those that presented six to eight cells and less than 20% fragmentation. Day +2 or day +3 ET and the surplus embryos were cryopreserved by vitrification on day +3 or at the blastocyst stage (23). The two highest quality embryos were selected according to the criteria mentioned previously for transfer.

Endometrial Preparation of the Recipients

The endometrial preparation was undertaken as described previously (24). The suppression of the ovarian function in the recipients was done during the luteal phase with a single dose of 3.75 mg of GnRH agonist depot formulation (Decapeptyl; Ipsen Pharm or Gonapeptyl; Ferring). Ultrasound scan was performed to verify that ovarian suppression had taken place and then E₂ valerate (Progynova; Schering) was given, with each recipient receiving an increasing dose from 2–6 mg/d. The luteal phase support in the recipients was achieved by the application of 600 mg/d of micronized P vaginally (Progeffik, Effik Laboratories) starting on the day of oocyte retrieval. The ET was performed if the endometrium had a typical trilaminar pattern and was at least 6 mm thick.

DNA Preparation and Genotyping

Genomic DNA was extracted from a buccal swab collected from the recipients and using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Different genotyping procedures were applied according to the nature of the gene markers, including the following single nucleotide polymorphisms (SNPs): rs1800532, rs6295, rs6313, rs3813929, and the insertion/deletion 5-HTTLPR variant of the solute carrier family 6 member 4 gene. Each plate included

replicate samples for quality control, which had to be in absolute concordance; negative controls were also assessed.

Single Nucleotide Polymorphisms

Genotyping of the SNPs was performed by multiplex minisequencing preceded by multiplex polymerase chain reaction (PCR) (25), using the following steps:

1. Amplification of regions flanking the SNPs was achieved by multiplex PCR reactions in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) under programmed conditions of 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles for 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, 30 seconds at 72°C, and a final extension for 7 minutes at 72°C. To eliminate the excess of primers and dNTPs, the PCR products obtained were digested by an "ExoCiAP" mix consisting of 2 U/10 μ L PCR *Escherichia coli* exonuclease I (TAKARA Bio Inc.) and 5 U/10 μ L PCR alkaline phosphatase (TAKARA Bio Inc.) incubated at 37°C for 60 minutes and a final step of enzymatic inactivation by heating at 80°C for 20 minutes.
2. A mini-sequencing primer with the 3'-end adjacent to the target SNP was designed to anneal specifically with the PCR product of each locus (Supplemental Table 1, available online). A reaction mix containing the PCR product, the mini-sequencing primer mix, and SNaPshot multiplex kit (Applied Biosystems) was subjected to the following conditions: 40 cycles at 10 seconds at 96°C, 7 seconds at 50°C, and 30 seconds at 60°C. One unit of alkaline phosphatase (TAKARA Bio Inc.) was added to purify the sample and incubated at 37°C for 1 hour and immediately after at 80°C for 20 minutes.
3. Analysis of purified mini-sequencing products was performed by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using LIZ120 size standard (Applied Biosystems). The resulting data were analyzed with GeneMapper 4.1 Software (Applied Biosystems).

Insertion/deletion 5-HTTLPR Variant

To detect the 5-HTTLPR polymorphism a PCR assay was performed using Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega). Amplification was achieved in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) with running conditions of 5 minutes at 94°C, followed by 25 cycles for 30 seconds at 94°C, 45 seconds at 58°C, 1 minute at 72°C, and a final extension for 7 minutes at 72°C. The fluorescent-labeled products were resolved by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer and GeneMapper version 4.1 software (Applied Biosystems).

Clinical Outcomes

Biochemical pregnancy was determined by quantifying the levels of human β -hCG in two consecutive measurements from day 11 or day 12 after ET, depending on whether this had taken place on day +3 or day +2. Ultrasound observation of a gestational sac 5–6 weeks after ET together with a positive previous β -hCG test was considered to represent a clinical pregnancy (CP). The absence of an ultrasound-identifiable pregnancy and a decrease in the levels of β -hCG represented

ORIGINAL ARTICLE: GENETICS

TABLE 1

Reproductive outcomes among recipients undergoing the study.

Outcome	Patients	% (95% CI)
No. of cycles	245	—
β -hCG positive rate per cycle	164/245	66.9 (61.05–72.83)
Implantation rate	210/542	38.8 (34.64–42.85)
Clinical PR per ET cycle	151/245	61.6 (55.54–67.72)
Ongoing PR per ET cycle	126/245	51.4 (45.17–57.69)
Biochemical pregnancy loss rate per positive β -hCG	13/164	7.9 (3.79–12.06)
Miscarriage rate per clinical pregnancy	19/151	12.6 (7.29–17.87)
Ectopic PR per positive β -hCG	7/164	4.3 (1.18–7.36)

Note: The overall group includes all women recruited for the study. CI = confidence interval; % = percentage results. PR = pregnancy rate.

Palomares. 5-HT related gene variants and pregnancy. *Fertil Steril* 2013.

a biochemical pregnancy loss (BPL). An ongoing pregnancy was defined as the presence of at least one viable fetus about week 12 of gestation. Miscarriages were considered to be those gestational losses that occurred between weeks 4 and 20, having previously identified a gestational sac (26). The implantation rate was calculated as the ratio between gestational sacs found on ultrasound scans and the number of embryos transferred. Those recipients with no evidence of pregnancy after the treatment were defined as the nonpregnant group.

Statistical Analysis

Recipient were grouped by genotype for each polymorphism, thus proportion of CP, ongoing pregnancy, and nonpregnant were calculated by ET cycle. The BPL rates were calculated by pregnant recipient with positive β -hCG. The proportion of miscarriage rates were calculated by CP. A χ^2 test was per-

formed to determine the Hardy-Weinberg equilibrium. For each polymorphism recipients were pooled by genotype, then analysis of the variance (ANOVA) was performed to compare differences in age and χ^2 test or Fisher's exact test were used to calculate statistical differences in reproductive outcomes between groups of recipients. A logistic regression model was used to compute the odds ratio with its 95% confidence interval. Thus the degree of association with each genotype was used as variables predicting the outcome of the treatment. To select the fittest interaction model between the genotypes, we considered the Akaike information criteria and the Bayesian information criteria in each polymorphism, using the SNPstats bioinformatic tool (27). For the haplotype analysis, estimated relative frequencies of each haplotype were compared through a logistic regression model, similar to that used with the genotype analysis.

RESULTS

The study included 245 white recipients aged 40.27 ± 4.09 years (Table 1). The indications for oocyte donation were advanced age (56.1%), ovarian failure (23.4%), low response to gonadotropins (12.4%), and endometriosis (4.1%).

The genotype frequency distribution of different polymorphisms complied with Hardy-Weinberg equilibrium in each group, except in the nonpregnant recipients for the 5-HTTLPR polymorphism. Minor allele frequencies were more than 0.05 and no linkage disequilibrium was found between the polymorphisms studied. Implantation rate and rates of CP, BPL, miscarriage, and ongoing pregnancy did not vary between genotypes of recipients for tryptophan hydroxylase-1-A218C, 5-HT2A-T102C, and 5-HT2C-C759T polymorphisms (Table 2).

TABLE 2

Age and clinical outcomes among recipients grouped by genotypes.

Marker	Genotype	Age (y)	IR (%)	CP (%)	BPL (%)	M (%)	OP (%)
5-HTTLPR	S/S	41.1 \pm 3.3	58/161 (36.0)	43/70 (61.4)	1/44 (2.3)	4/43 (9.3)	39/70 (55.7)
	S/L	40.2 \pm 4.0	79/186 (42.5)	60/83 (72.3)	1/61 (1.6)	9/60 (15.0)	47/83 (56.6)
	L/L	40.1 \pm 3.5	42/130 (32.3)	29/60 (48.3)	8/37 (21.6)	3/29 (10.4)	24/60 (40.0)
	P value	.227 ^c	.165	.014 ^b	5.82×10^{-4} a,b	.739 ^a	.103
TPH1 (rs1800532)	C/C	39.9 \pm 4.1	66/188 (35.1)	51/86 (59.3)	3/54 (5.6)	7/51 (13.7)	41/86 (47.7)
	C/A	40.1 \pm 4.4	107/259 (41.3)	73/114 (64.0)	4/77 (5.2)	7/73 (9.6)	64/114 (56.1)
	A/A	41.5 \pm 3.0	29/77 (37.7)	20/35 (57.1)	3/23 (13.0)	3/20 (15)	17/35 (48.6)
	P value	.172 ^c	.407	.684	.367 ^a	.698 ^a	.452
5-HTR1A (rs6295)	C/C	40.9 \pm 3.4	37/118 (31.4)	28/55 (50.9)	6/34 (17.7)	5/28 (17.9)	22/55 (40.0)
	C/G	40.4 \pm 3.8	95/261 (36.4)	71/116 (61.2)	3/74 (4.1)	7/71 (9.9)	61/116 (52.3)
	G/G	39.6 \pm 5.0	72/149 (48.3)	47/66 (71.2)	1/49 (2.0)	6/47 (12.8)	40/66 (60.6)
	P value	.184 ^c	.011 ^b	.073	.012 ^{a,b}	.508	.076
5-HTR2A (rs6313)	C/C	40.5 \pm 4.3	55/150 (36.7)	38/67 (56.7)	5/43 (11.6)	3/38 (7.9)	34/67 (50.8)
	C/T	40.3 \pm 4.3	100/267 (37.5)	72/119 (60.5)	4/76 (5.3)	9/72 (12.5)	61/119 (51.3)
	T/T	39.8 \pm 3.6	45/107 (42.1)	34/49 (69.4)	1/36 (2.8)	5/34 (14.7)	27/49 (55.1)
	P value	.668 ^c	.641	.372	.265	.667	.878
5-HTR2C (rs3813929)	C/C	40.1 \pm 4.2	143/382 (37.4)	103/171 (60.2)	8/112 (7.1)	14/103 (13.6)	88/171 (51.5)
	C/T	40.9 \pm 4.0	49/125 (39.2)	35/57 (61.4)	2/37 (5.4)	3/35 (8.6)	30/57 (52.6)
	T/T	40.3 \pm 3.7	11/19 (57.9)	7/8 (87.5)	0.0	0/7 (0.0)	5/8 (62.5)
	P value	.445 ^c	.200	.366 ^a	1.00 ^a	.564	.874 ^a

Note: Age values are represented by mean \pm SD. Proportion of recipients who reached the outcome defined in rows is represented by each genotype (percentage). BPL = biochemical pregnancy loss per β -hCG positive; CP = clinical pregnancy per ET cycle; IR = implantation rates; M = miscarriage per CP; OP = ongoing pregnancy per ET cycle.

^a P value by Fisher's exact test; otherwise by χ^2 test.
^b P value < .05 obtained from either χ^2 test or Fisher's exact test.
^c Analysis of variance (ANOVA).

Palomares. 5-HT related gene variants and pregnancy. *Fertil Steril* 2013.



Different CP rates between 5-HTTLPR genotypes were found ($P=.014$) (Table 2). The dominant model for the S allele showed that the LL genotype was significantly increased in recipients who did not achieve a CP (Table 3). The BPL rates presented strong differences for 5-HTTLPR marker distribution ($P=5.82 \times 10^{-4}$) and for 5-HT1A-C1019G polymorphism ($P=.012$); this latter polymorphism also presented different distribution when comparing implantation rate for different genotypes ($P=.011$) (Table 2).

Logistic regression model corroborated a negative tendency of recipients carrying individually the LL or the CC genotype, which correlated with a strong risk of experiencing BPL compared with the recipients who had the genotypes SL/SS or CG/GG (Table 3).

The haplotype analysis of the 5-HTTLPR and 5-HT1A-C1019G polymorphisms showed significant differences when the proportion of women who achieved a CP was compared with those who did not. More specifically, the haplotype LC was associated with the condition of not achieving a CP (Table 4). A higher representation of recipients homozygous for both L and C alleles was found in the women who suffered BPL (30.77%) compared with the recipients who became clinically pregnant (3.97%). Thus, the haplotype LC was also strongly associated with experiencing BPL (Table 4).

These results agreed in both the genotype and the haplotype analysis, indicating a negative trend of the genotypes LL at 5-HTTLPR and CC at 5-HT1A-C1019G in reproductive outcomes in recipients undergoing oocyte donation IVF treatment and also for maintaining the pregnancy when this occurred.

DISCUSSION

The results of this study show a significant association of genotype variants at 5-HTTLPR and rs6295 with different results of IVF treatment with donated eggs. To our knowledge, this is the first time that gene variants involved in 5-HT metabolism have been shown to modify implantation potential. The alleles L of 5-HTTLPR and C of rs6295 are associated with lower CP rates and higher BPL rates, suggesting a negative effect on the earliest phases of embryo implantation. The strong association of the LL genotype at 5-HTTLPR with the risk of BPL highlights the importance of this gene during early implantation, which could lead to overrepresentation of this genotype in the group of nonpregnant recipients and the noncompliance with Hardy Weinberg equilibrium.

The increased expression rate of SERT induced by the genotype LL (16) could hypothetically modify the 5-HT levels in the embryo-maternal interface. As mentioned, the dependence on a maternal supply of 5-HT has been reported during early embryo development (8-10) and later during the pregnancy (1). Two experimental procedures revealed an extreme decrease in the number of blastocysts recovered by ET when limiting maternal 5-HT biosynthesis through either blocking tryptophan production (9) or increasing its degradation (10). Furthermore, Doherty et al. (10) described a decreasing gradient of TDO gene expression from the inside of the stroma to the endometrial epithelium and lumen, which correlates with the increase in 5-HT levels in the same direction.

TABLE 3

Genotype association for insertion/deletion 5-HTTLPR and rs6295 with nonclinical pregnancy outcome and biochemical pregnancy loss.

Total	Gene marker	Model	Genotype	Nonpregnancy versus clinical pregnancy			Biochemical pregnancy loss versus clinical pregnancy				
				NP	CP	OR (95% CI)	P value	BPL	CP	OR (95% CI)	P value
213	5-HTTLPR	Recessive	S/S-S/L L/L	50 (61.7%) 31 (38.3%)	103 (78%) 29 (22%)	2.20 (1.20-4.05)	.010 ^{a,b}	2 (2.0%) 8 (80%)	103 (78%) 29 (22%)	14.21 (2.86-70.60)	.0003 ^{c,d}
237	5-HT1A. rs6295	Recessive	G/G-C/G C/C	64 (70.3%) 27 (29.7%)	118 (80.8%) 28 (19.2%)	1.78 (0.97-3.27)	.063 ^a	4 (40%) 6 (60%)	118 (80.8%) 28 (19.2%)	6.32 (1.67-23.91)	.0077 ^{c,d}

Note: BPL = biochemical pregnancy loss; CI = confidence interval; CP = clinical pregnancy; NP = nonpregnant; OR = odds ratio.
^a P value from χ^2 test comparing genotype frequencies between nonpregnant recipients and those with a clinical pregnancy.
^b $P < .05$.
^c P value from Fisher's exact test comparing genotype frequencies between recipients suffering biochemical pregnancy loss and those with a clinical pregnancy.
^d $P < .05$.

Palomares: 5-HT related gene variants and pregnancy. Fertil Steril 2013.



ORIGINAL ARTICLE: GENETICS

TABLE 4

Haplotype association between insertion/deletion 5-HTTLPR and rs6295 markers and outcome.

Markers	No pregnancy versus clinical pregnancy		Biochemical pregnancy loss versus clinical pregnancy		P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)
	Total	Nonpregnancy	Total	Biochemical pregnancy loss				
5-HTTLPR	0.2831	0.2531	0.2988	0.0633	0.2988	1.00	1.00	— ^a
5-HT1A rs6295	0.2407	0.2233	0.2547	0.0937	0.2547	1.12 (0.61–2.08)	2.38 (0.20–25)	5
S	0.2393	0.2006	0.266	0.1808	0.2660	0.92 (0.48–1.75)	1.4 (0.03–50)	.26
C	0.2368	0.323	0.1805	0.6623	0.1805	1.92 (1.15–3.23)	14.23 (1.79–100)	.013 ^b

Note: CI = confidence interval; OR = odds ratio.
^a Reference category, the most frequent haplotype distribution, is compared with the other haplotypes (frequencies by groups).
^b P < .05.
 Palomares: 5-HT related gene variants and pregnancy. *Fertil Steril* 2013.

This nonstochastic distribution of 5-HT suggests that regulatory elements could enhance embryo viability through secretion of 5-HT at the embryo–maternal interface and, in contrast, limit the interior tryptophan content to avoid immune rejection of the embryo (10). Monoamine oxidase A activity, which also degrades 5-HT, is particularly intense in the endometrial epithelial cells during the midsecretory phase of the menstrual cycle (28) and it has been associated with greater success in recipients receiving oocyte donation (29). From this factor, we hypothesize that an active regulatory system controls the 5-HT turnover in the endometrium.

Because SERT is expressed in the epithelial cells of the early decidua, it could represent the main agent responsible for the 5-HT clearance from the luminal side (13). The LL genotype would maintain an increased 5-HT turnover toward its assimilation into the endometrial cells, which could compromise 5-HT availability for the embryo (1). The pathological 5-HT depletion induced in mothers with phenylketonuria, which could represent a similar situation, is associated with a higher incidence of embryonic defects and spontaneous miscarriage (9, 30, 31). The effect of serotonin selective re-uptake inhibitors on SERT is expected to induce an increase of extracellular 5-HT levels, which would have a deleterious effect on the embryo (8) and, as mentioned, could lead to a higher incidence of spontaneous abortions (14, 15). Therefore, this could correlate with the necessity of a fine regulation of 5-HT levels to preserve the pregnancy during the early stages, or even sooner, as SERT is active from the oocyte until the blastocyst stage (32).

The variant 1019 C>G of 5-HT1A seems to increase the binding affinity of the repressors Deaf1 and Hes5 to the DNA sequence when the C allele is present, hence reducing the expression of the receptor (33). Molecular interaction of the different allele combinations influences the number of 5-HT1A surface receptors, which in turn affects the secretion of 5-HT from the cell (34). The CC genotype in the neuronal model seems to be associated with a lower density of the 5-HT1A receptor, resulting in a lower 5-HT induced response. In combination with the suggested effects of the L/L genotype in SERT, this could lead to a depression of serotonergic activity during implantation, when the embryo is most susceptible to the need for a maternal supply of 5-HT (9, 10).

Interactions between polymorphisms have been reported to modify the regulatory activity between the two genes in 5-HTTLPR and 5-HT1A in other tissues (35, 36). Our results support the idea of a synergic activity between the L and C alleles, as this haplotype was present in more than two thirds of the recipients who experienced BPL, whereas no differences were found in the haplotype distribution in those recipients who achieved CP. If the L/L and C/C genotypes are considered to be independent, as far as their effect on pregnancy is concerned, the combination of both alleles is highly significant in the group of nonpregnant and BPL recipients, and they might have a synergic functional behavior that can be observed at the population level.

A possible relation between 5-HT polymorphisms and endometriosis cannot be excluded because no distinction was performed between recipients. According to previous studies little effect could be expected for oocyte donation (37). Every recipient had a BMI of less than 30 kg/m², which is stated like



a critical level from which previous studies reported increased risk of spontaneous abortions (38).

The high success of oocyte donation could underestimate the influence of the recipient's genetic profile. However, a strong interaction takes place between the expressed phenotypes of the recipient and the embryo during the onset of pregnancy, which resembles an intense molecular dialogue involving immune-type molecular interactions and different functional couplings that alter the progress of the pregnancy (39).

Our results suggest a functional interaction between polymorphisms of SERT and 5-HT1A and the achievement or maintenance of early pregnancy. This interaction could be related with lower serotonergic interactivity due to an increased 5-HT reuptake, which would reduce its intercellular concentration and could be enhanced by a decreased activity of the 5-HT1A receptor mediated by lower gene expression rates when the CC genotype is present. Although further research is still needed, the results open up a wide field of study and facilitate the immediacy of a clinical trial, enabling other related studies about the role of serotonin in the embryo-maternal tolerance.

Acknowledgments: The authors thank the patients who gave their consent and made the research possible and Ian Johnstone for his assistance with the English.

REFERENCES

1. Acharya SB, Goswami NG, Debnath PK. Uterine and placental 5-HT profile in different gestational period of albino rats. *Indian J Exp Biol* 1989;27:505-9.
2. Bódis J, Bognár Z, Hartmann G, Török A, Csaba IF. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol Obstet Invest* 1992;33:165-7.
3. Bódis J, Török A, Tinneberg HR, Hanf V, Papenfuss F, Schwarz H. Serotonin induces progesterone release from human granulosa cells in a superfused granulosa cell system. *Arch Gynecol Obstet* 1993;253:59-64.
4. Juorio AV, Chedrese PJ, Li XM. The influence of ovarian hormones on the rat oviductal and uterine concentration of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine. *Neurochem Res* 1989;14:821-7.
5. Amenta F, Vega JA, Ricci A, Collier WL. Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *Anat Rec* 1992;233:478-84.
6. Amireault P, Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol Reprod* 2005;73:358-65.
7. Dubé F, Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci* 2007;81:1627-37.
8. Il'ková G, Reháč P, Veselá J, Cikos S, Fabian D, Czikková S, et al. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 2004;12:205-13.
9. Côté F, Fligny C, Bayard E, Launay J-M, Gershon MD, Mallet J, et al. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:329-34.
10. Doherty LF, Kwon HE, Taylor HS. Regulation of tryptophan 2,3-dioxygenase by HOXA10 enhances embryo viability through serotonin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E86-93.
11. Mitchell JA, Hammer RE, Goldman H. Serotonin-induced disruption of implantation in the rat: II. Suppression of decidualization. *Biol Reprod* 1983;29:151-6.
12. Maekawa F. Effect of deprivation of serotonin by *p*-chlorophenylalanine on induction and maintenance of pseudopregnancy in female rats. *Brain Res Bull* 1996;39:317-21.

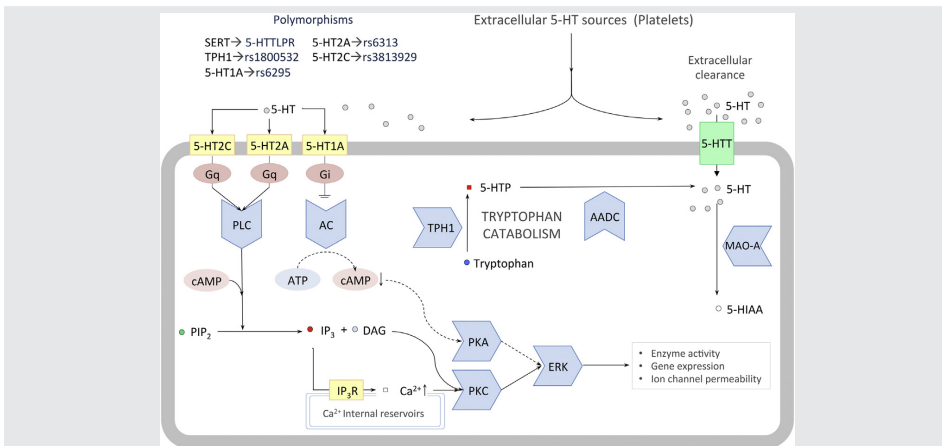
13. Bottalico B. Plasma membrane and vesicular monoamine transporters in normal endometrium and early pregnancy decidua. *Mol Hum Reprod* 2003;9:389-94.
14. Einarson A, Choi J, Einarson TR, Koren G. Rates of spontaneous and therapeutic abortions following use of antidepressants in pregnancy: results from a large prospective database. *J Obstet Gynaecol Can* 2009;31:452-6.
15. Nakhai-Pour HR, Broy P, Bérard A. Use of antidepressants during pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *CMAJ* 2010;182:1031-7.
16. Zhang H, Smith GN, Liu X, Holden JJA. Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiol Genomics* 2010;42:85-92.
17. The Human Protein Atlas. Available at: <http://www.proteinatlas.org/>. Accessed March 6, 2012.
18. Mihalyi A. Investigation of the role of the serotonergic activity of certain subtype-selective 1A antagonists in the relaxant effect on the pregnant rat uterus in vitro. *Mol Hum Reprod* 2003;9:475-80.
19. Minosyan TY, Lu R, Eghbali M, Toro L, Stefani E. Increased 5-HT contractile response in late pregnant rat myometrium is associated with a higher density of 5-HT2A receptors. *J Physiol* 2007;581(Pt 1):91-7.
20. Parsey RV, Oquendo MA, Ogden RT, Olvet DM, Simpson N, Huang YY, et al. Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* 2006;59:106-13.
21. Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ. The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. *Biol Psychiatry* 2004;56:406-10.
22. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, et al. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002;17:1852-5.
23. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007;67:73-80.
24. Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simón C, Remohi J, et al. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4399-404.
25. Carvalho CMB, Pena SDJ. Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics. *Genet Mol Res* 2005;4:115-25.
26. Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod* 2005;20:3008-11.
27. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-9.
28. Ryder TA, MacKenzie ML, Lewinsohn R, Pryse-Davies J, Sandler M. Amine oxidase histochemistry of the human uterus during the menstrual cycle. *Histochemistry* 1980;67:199-204.
29. Henriquez S, Tapia A, Quezada M, Vargas M, Cardenas H, Rios M, et al. Deficient expression of monoamine oxidase A in the endometrium is associated with implantation failure in women participating as recipients in oocyte donation. *Mol Hum Reprod* 2006;12:749-54.
30. Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon R, Rouse B, Trefz F, et al. Maternal phenylketonuria: an international study. *Mol Genet Metab* 2000;71:233-9.
31. Gambol PJ. Maternal phenylketonuria syndrome and case management implications. *J Pediatr Nurs* 2007;22:129-38.
32. Basu B, Desai R, Balaji J, Chaekady R, Siram V, Maiti S, et al. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction* 2008;135:657-69.
33. Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, et al. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 2003;23:8788-99.
34. Albert PR, Le François B, Millar AM. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Mol Brain* 2011;4:21.
35. Li Q, Wichems C, Heils A, Lesch KP, Murphy DL. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT1A) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. *J Neurosci* 2000;20:7888-95.



ORIGINAL ARTICLE: GENETICS

36. Iceta R, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. Expression of 5-HT1A and 5-HT7 receptors in Caco-2 cells and their role in the regulation of serotonin transporter activity. *J Physiol Pharmacol* 2009;60:157-64.
37. Diaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Impact of stage iii-iv endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril* 2000;74:31-4.
38. Bellver J. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril* 2003;79:1136-40.
39. Van der Hooft MLP, Lashley ELO, Bianchi DW, Claas FHJ, Schonkeren CMC, Scherjon SA. Clinical and immunologic aspects of egg donation pregnancies: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010;16:704-12.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1



Hypothesized scheme representing serotonin (5-HT) interaction with different genes included in the study. Monoamine oxidase A (MAO-A) degrading activity of 5-HT would remove it in 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA). Tryptophan can derive in 5-HT by tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) and aromatic amino acid decarboxylase (AADC) enzymes. The 5-HT receptors 2A and 2C activate phospholipase C (PLC) through G-protein (Gq) coupled subunit that promotes transformation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). These second messengers activate protein kinase C (PKC), which in time may activate the extracellular signal-regulated kinases (ERK). 5-HT1A G-protein (Gi) coupled subunit inhibits the formation of cyclic adenylylate monophosphate (cAMP) by adenylylate cyclase (AC), which also modify ERK activity in a different way.

Palomares. 5-HT related gene variants and pregnancy. *Fertil Steril* 2013.

2016-04

SUPPLEMENTAL TABLE 1

Oligonucleotides used for the genotyping of the different genetic variants.

Gene name	Reference	Sense	Location	A1	A2	Forward primers	Reverse primers	Minisequencing primers
SLC6A4	Ins /del 5-HTTLPR	F	5-HTTLPR	S	L	VIC-GCTGCTGCTCTACTGGGC	CCCGGCCGGTGATCTTGG	N/A
TPH1	rs1800532	R	Intron 7	A	C	CCATGCTCTATATGTGTTAGC	TCAGTGTACATCCCTATGC	(28)AAATTGACAACCTATTAGGTG
5-HT1A	rs6295	F	Promoter	C	G	TGCAATGGCCGAGAAACG	GCTAATTGATGGAAGAAGACC	(40)AAGACCAGGTGTCTTC
5-HT2A	rs6313	F	Exon 1	C	T	TGAGCTCAACTACGAACCTCC	ATTTTCAGAGTCGACTGTCC	(22)CTACAGTAATGACTTTAACTC
5-HT2C	rs3813929	F	Promoter	C	T	TGCTGATTGGCTGCTCTTGG	AACTGCACCACGCTCTTGG	(34)GCTCCTCCCTCATCC

Note: del = deletion; ins = insertion.

Palomares. 5-HT related gene variants and pregnancy. *Fertil Steril* 2013.

ORIGINAL ARTICLE: GENETICS

VOL. 99 NO. 7 / JUNE 2013

P-453 Haplotype analysis between 5-HTTLPR and RS6295 gene variants reveals a synergistic effect over pregnancy outcomes in recipient of donated eggs

A.R. Palomares¹, A.M. Lendinez Ramirez², F. Martinez¹, M. Ruiz Galdón³ and A. Reyes Engel³

+ Author Affiliations

Abstract

Introduction: Although the way of how serotonin (5-HT) could participate in reproduction is still unclear, serotonergic metabolism has been related in very early steps during embryo development and implantation. Gene variant affecting the serotonergic local network at female reproductive tract have been observed to influence success of IVF treatments. Haplotype analysis between several markers associated to serotonergic network has been performed to explore polymorphisms functional interaction in reproductive outcome of recipients undergoing IVF treatment with donated eggs.

Material and Methods: A total of 245 recipients undergoing first IVF treatment with donated eggs at Instituto de Fertilidad Clinicas Rincon with at least two good quality embryos for embryo transfer were included. Standardized protocols were applied in donors for ovarian stimulation as well as in recipients for the endometrial preparation. Recipients with uterine and endometrial defects were discarded as well as those women with a recurrent miscarriage failure history. Blood swap were collected and genomic DNA extraction was performed (Qiagen Mini-Kit). Genotyping of several markers with different functional implication were selected including the insertion/deletion promoter polymorphism 5-HTT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) of SCLA6A4, the SNPs; A218C (rs1800532) in the TPH1 gene, C1019G (rs6295) in the 5-HT1A gene, T102C (rs6313) in the 5-HT2A gene and C759T (rs3813929) in the 5-HT2C. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for genotypes in the overall group and also for compared groups. SNPStats software based on the expectation maximisation (EM) algorithm was used for the estimation of the genotype and haplotype frequencies. Chi square test was used to compare genotype distribution and logistic regression models were calculated for odd ratios (ORs), 95% confidence interval (CI) to assess genotypes association with different outcomes. OR were also calculated to assess haplotype distribution compared with the most common one observed in each studied population.

Results: No differences were observed between genotypes of markers rs1800532, rs6313 and rs3813929. Logistic regression model for 5-HTTLPR showed that recipients carrying LL genotype had lower clinical pregnancy rates [OR = 2.20 $p = 0.010$ (1.20–4.05) 95%] and higher risk for suffering a biochemical pregnancy loss (BPL) compared to SS + SL carriers [OR = 14.21 $p = 3 \times 10^{-4}$ (2.86–70.60) 95%]. For rs6295 SNP homozygous recipients, CC, showed lower implantation rates ($p = 0.011$) compared with CG + GG carriers, as well as higher risk of suffering BPL [OR = 6.32 $p = 0.0009$ (1.67–23.91) 95%]. Haplotype analysis between 5-HTTLR y rs6295 polymorphism, showed haplotype LC associated to lower clinical pregnancy rates [OR = 1.92 $p = 0.012$ (1.15–3.23) 95%] and complementary recipients that inherited together L and C alleles presented an increased risk of suffering BPL [OR = 14.23 $p = 0.013$ (1.79–100) 95%].

Conclusions: A strong association between occurrence of early pregnancy loss events and two common serotonergic markers, L/L 5-HTTLPR and C/C 5-HTR1A (rs6295), has been observed. Moreover recipient carrying L and C alleles, together, show a negative trend of the success after IVF treatment with donated oocytes. Both markers appear to have greater effect at the time of achieving clinical pregnancy, what seem especially representative in the group of BPL. These results agree with the hypothetical role of the surrounding serotonergic activity on embryo-maternal dialogue during implantation.

Supported by Grants SAF2008-03314 and PTQ 09-01-00496

P-591 Building a functional genetic network of serotonergic system in early pregnancy using biocomputational approaches

A. Reyes–Palomares¹, A.R. Palomares², M.A. Medina¹, M. Ruiz Galdón³ and A. Reyes Engel³

+ Author Affiliations

Abstract

Introduction: Although the role of serotonin (5-HT) in reproduction remains unclear, a strength interaction between gene variants affecting serotonergic signalling and reproductive outcome has been reported. A 44 bp insertion at 5-HTTLPR of 5-HTT and the functional single nucleotide polymorphism (SNP) rs6295 at the HT1A gene, have been related to lower clinical pregnancy rates and higher risk of suffering biochemical pregnancy loss. An increased activity of 5-HT transporter (5-HTT) and poor signalling process by low levels of HT1A receptor density, could synergistically induce a local deficiency of 5-HT at the embryo maternal interface. Macrophages express HT1A receptor and this cell population is responsible to modulate relevant aspects of immunological response during embryo implantation. Moreover, macrophages comprise about 10% of total decidual cells in the pregnant uterus and surrounded trophoblastic cells at the site of implantation.

In the present communication, biocomputational methods have been performed to elucidate the molecular background of genetic interactions between 5-HTT and 5-HTR1A. A molecular map represented all candidate genes involved in the serotonergic system and related to embryo implantation.

Material and Methods: A bibliographic review on 5-HT effects on 5-HTT and HTR1A provided us a list of genes related to embryo implantation. Data mining and network analysis methods were used respectively to obtain other related genes and to contextualize the disturbances of mutated genes (5-HTT and HTR1A). A biomedical literature-based tool was used to rank these genes according to our main clinical topic. In addition, all genetic interactions from public databases were used to draw a network of treated genes in previous bioinformatics analyses.

Results: In addition to embryo implantation topic, we also consider macrophages and their functional associations with the serotonergic systems yielding two genes CCR5 and CCL3/MIP-1 α besides 5-HTT and HTR1A. From the functional prediction analysis we gathered 24 genes related through physical interactions, pathways, co-expression and genetic co-location. Functional enrichment analysis revealed that most of them are involved in chemotaxis (2.6E-12) and inflammatory response (4.8E-11). Gene prioritization showed, as expected, that serotonergic system related genes occupied significant positions. Finally, we built a network of protein-protein interactions and protein-chemical associations considering 5-HT and genes describing well-known functional interactions.

Conclusions: Biomolecular interaction network reflects that HTR1A signalling mediated by 5-HT and 5-HTT are related with CCL3 and CCR5 present in macrophages and could play a role during embryo implantation. Moreover 5-HT diffusion in endometrial stromal cells seems to act on a dose and time-dependent manner over HTR1A signalling. Fluctuations of 5-HT levels could down regulate CCL3 expression and secretion and by hence recruitment of immune cell exercised by macrophages during early pregnancy. [Supported by Grants SAF2008-03314 and PTQ 09-01-00496; PS09/02216, SAF2011-26518]

43/190. Influencia de polimorfismos genéticos asociados al metabolismo de la 5-HT sobre los resultados de FIV/ICSI en receptoras de óvulos donados

Arturo Reyes Palomares¹; Ana María Lendinez Ramirez²; Francisco Martínez Díaz¹; Maximiliano Ruiz Galdón³; Armando Reyes Engel³.

¹Instituto de Fertilidad Clínica Rincón. Laboratorio de FIV. Rincón de la Victoria. Málaga; ²Hospital de Antequera. Laboratorio Clínico. Málaga; ³Universidad de Málaga. Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e inmunología.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La reciente descripción de una red serotoninérgica local en el tracto reproductor femenino, propone el metabolismo de la serotonina (5-HT) como potencial diana terapéutica en medicina reproductiva. Variantes genéticas funcionalmente relacionadas con la actividad de 5-HT son herramientas idóneas para explorar la influencia de este nodo metabólico en la reproducción. Se ha analizado la frecuencia de polimorfismos genéticos, relacionados al metabolismo serotoninérgico, en receptoras sometidas a fecundación in vitro (FIV) con óvulos donados para valorar su influencia sobre los resultados y la evolución del embarazo.

MATERIAL Y MÉTODO

Un total de 245 receptoras fueron genotipadas para cinco polimorfismos representativos del metabolismo de la 5-HT, incluyendo a 5-HTTLPR y un grupo de polimorfismos de base única (SNPs); rs1800532, rs6295, rs6313 y rs3813929. Se analizó la distribución de las frecuencias genotípicas y haplotípicas entre los distintos grupos según evolución y resultado del tratamiento.

RESULTADOS

El modelo de regresión logística mostró que el genotipo LL del polimorfismo 5-HTTLPR, presentó menores tasas de embarazo clínico (CP) [OR=2.20 p= 0.010 (1.20-4.05) 95%] y un elevado riesgo de sufrir aborto bioquímico (ABq) [OR=14.21 p= 3×10^{-4} (2.86-70.60) 95%]. Las receptoras CC para rs6295 presentaron menor tasa de implantación (IR) (p=0.011) y elevado riesgo de sufrir un ABq [OR=6.32 p= 0.0009 (1.67-23.91) 95%]. El haplotipo LC entre 5-HTTLR y rs6295 se asoció a menores tasas de CP [OR=1.92 p= 0.012 (1.15-3.23) 95%] y mayor riesgo de sufrir ABq [OR=14.23 p= 0.013 (1.79-100) 95%].

CONCLUSIONES

Aunque se desconoce el mecanismo por el que la 5-HT puede actuar en el proceso reproductivo. Existe una fuerte asociación de los marcadores 5-HTTLPR y 5-HTR1A (rs6295) con la consecución del embarazo clínico y el aborto bioquímico.

Introduction: Uterine leiomyomas are common benign tumors affecting 25% of women. The growth of leiomyomas is estrogen and progesterone dependent. Recent clinical studies have shown that treatment with an antiprogesterin, mifepristone leads to volume reduction of the leiomyomas without any side effects (Engman, M. et al.; 2009). The molecular mechanisms leading to growth regression are not known. The aim was to study the molecular mechanisms in myomas associated with volume regression in response to mifepristone treatment.

Materials and Methods: Thirty premenopausal women scheduled for surgery due to uterine leiomyoma were randomly assigned to treatment with 50 mg mifepristone or placebo for 12 weeks before surgery, after obtaining the ethical permission, at Karolinska University Hospital, Stockholm, Solna. Leiomyoma biopsies were collected and total RNA was extracted to study the differential gene expression by microarray and analysed using IPA software (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). Real time PCR was used to verify the expression of relevant genes. Oligonucleotide primers and dye-labeled TaqMan probes specific to seven target genes identified from the microarray namely GRIN2A, CREB5, ROR1, PIK3R1, PIK3C2G, EFN2, PAK3, were purchased from Applied Biosystems (TaqMan® Gene Expression Assays, USA). Apoptotic index was assessed by TUNEL using *In Situ* Cell Death Detection kit, Fluorescein (Roche Applied Science) as per the manufacturer's protocol. *In vitro* functional studies were done in leiomyoma cell cultures derived from a group of fresh leiomyoma biopsies obtained from 9 patients at the time of surgery in the absence of any preoperative hormonal treatment. Immunocytochemistry for smooth muscle α actin and hTERT was performed to confirm the purity of the myoma cells. The cell cultures were treated with progesterone, mifepristone, and dexamethasone in different combinations to evaluate if gene response was due to an anti-glucocorticoid action of mifepristone rather than the antiprogesterin action.

Results: Microarray analysis displayed 18 pathways, which were significantly changed. Integrin being the leading and Ephrin pathway being one of the top four significantly altered pathways. Real time PCR of patient Ephrin genes confirmed that 3 out of seven mRNAs were expressed significantly different: GRIN2A: -5.6 fold; $p = 0,041$, CREB5: -2,3 fold; $p = 0,030$, and ROR1: + 2,5 fold, $p = 0,021$ and in the Integrin pathway 2 of eight significant: ROR1: + 3,1 fold; $p = 0,013$ and PIK3R1: -1,8 fold; $p = 0,038$. Strong correlations between gene expression and myoma volume regression were found for PIK3C2G, $R = 0,83$, $p = 0,042$, EFN2, $R = 0,94$, $p = 0,005$ and PAK3, $R = 1,0$, $p = N.A.$ in the mifepristone treated group of Ephrin pathway genes. For Integrin pathway ROR1 correlated to myoma regression, $R = 0,67$; $p = 0,023$ in the pooled group. TUNEL analysis showed no difference between the groups, while a decrease in immunoreactivity for Ki-67 ($p = 0,049$) was observed with mifepristone treatment. The *in vitro* results confirm the *in vivo* data. In primary experiment the expression of PIK3R1 with mifepristone exposure was reversed with dexamethasone treatment, but not for any of the other integrin genes investigated.

Conclusion: Leiomyoma regression upon mifepristone treatment involves down regulation of proliferation rather than induction of apoptosis. There are significant positive correlations for the expression of ROR1 and PAK3 versus leiomyoma volume regression, suggesting key regulatory functions for these genes. Alterations in gene expression observed with mifepristone are due to its anti-progesterin nature rather than its anti-glucocorticoid action. An increased understanding of the molecular mechanism of mifepristone in leiomyoma volume reduction could be used to improve medical management of this condition.

Reference:

Hum Reprod. 2009 Aug;24(8):1870-9. Epub 2009 Apr 23.

SELECTED ORAL COMMUNICATION SESSION

SESSION 48: REPRODUCTIVE GENETICS

Tuesday 5 July 2011

15:15 - 16:30

O-179 Gender incidence on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection approach: a prospective randomized study

A. Iaconelli Jr.¹, R.C.S. Figueira², A.S. Setti³, D.P.A.F. Braga⁴, F.F. Pasqualotto⁵, E. Borges Jr.⁶

¹Fertility - Fertility - Assisted Fertilization Center, Clinical Department, Sao Paulo, Brazil

²Fertility - Fertility - Assisted Fertilization Center, IVF Laboratory, Sao Paulo, Brazil

³Sapientiae Institute, Scientific Research, Sao Paulo, Brazil

⁴Fertility - Assisted Fertilization Center, Scientific Research, Sao Paulo, Brazil

⁵Caxias do Sul University, Biotechnology Department, Caxias do Sul, Brazil

⁶Fertility - Assisted Fertilization Center, Clinical Department, Sao Paulo, Brazil

Introduction: Whether the ART procedure has any significant effect on gender is debatable. With the introduction of a new concept for high magnification sperm morphology examination, it is now possible to select normal spermatozoa in real time for use in an intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) cycle. Sperm selection performed by this methodology has been showing a significant and positive association with ART outcomes. Nonetheless, there is no available literature supporting sex ratio in embryos derived from this technique. Our study's objective was to determine whether the use of IMSI in preimplantation genetic screening (PGS) cycles is associated with gender incidence.

Material and Methods: This prospective study was conducted on couples who underwent their first IVF treatment in conjunction with PGS as a result of advanced maternal age. Couples were randomly allocated to receive one of two sperm selection procedures: ICSI ($n = 60$) or IMSI ($n = 60$). Patients' randomization was performed by laboratory personnel just before oocyte injection using SAS System for Windows (PROC PLAN, seed = 1234). To minimize the influence of male factor infertility, all cases in which sperm concentration was less than 1×10^6 mL and sperm motility less than 20% were excluded from the study. Sperm selection in IMSI group was performed using an inverted Nikon Diaphot microscope (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan) equipped with high-power differential interference contrast optics (DIC/Nomarski). The total calculated magnification was 6600x. The sperm cells exhibiting normally shaped nuclei ((i) smooth, (ii) symmetric and (iii) oval configuration) and (iv) normal nuclear chromatin content (if it contained no more than one vacuole, which occupies < 4% of the nuclear area) were selected for injection. Embryos reaching at least the 6-cell stage on day 3 of development were biopsied and a two-round FISH procedure was performed, which allowed for the detection of chromosomes X, Y, 13, 15, 16, 18, 21 and 22. Embryo transfer was performed on day 5. The influence of the sperm selection method on aneuploidy rates was assessed using logistic regression analysis. The data are presented as Odds Ratios (OR) with 95% confidence interval (95% CI) and p value. The results were considered to be significant at the 5% critical level ($p < 0.05$).

Results: No significant differences were observed between all groups in terms of patient demographics, stimulation and cycle characteristics. Clinical pregnancy (47.1% vs 53.8%, $p = 0.5321$) and implantation rates (40.9% vs 45.6%, $p = 0.5911$) were also not significantly different. There was no abortion occurrence in IMSI cycles and only one case described in ICSI cycles. A total of 153 successfully biopsied embryos derived from 60 ICSI-PGS and 240 successfully biopsied embryos derived from 60 IMSI-PGS cycles were characterized by gender. Considering all the biopsied embryos characterized as normal for sex chromosome, our results showed that IMSI approach results in a significantly higher incidence of female embryos when compared to ICSI (64.7% vs 53.8%, respectively, $p = 0.0268$). Analysing only euploid embryos for the 8 analysed chromosomes we also observed a significantly higher incidence of XX embryos derived from IMSI compared to ICSI cycles (66.7% vs 52.4%, respectively, $p = 0.0326$). This result was confirmed by logistic regression, which demonstrated a nearly two-fold increase in euploid XX embryos derived from sperm selected by high magnification (OR: 1.82, CI: 1.05-3.15, $p = 0.033$).

Conclusion: To our knowledge this is the first study on the sex ratio of embryos derived from IMSI cycles. "Best looking" spermatozoa analyzed by high magnification approach seem to carry a higher proportion of X chromosome suggesting a significantly predictive value on the incidence of euploid XX embryos.

O-180 Influence of 5-HTTLPR variants in the SLC6A4 gene over pregnancy outcomes among recipients of donated eggs

A.R. Palomares¹, A.M. Lendinez Ramirez², B. Pérez-Nevo³, F. Martinez¹, A. Jimenez², M. Ruiz Galdón², A. Reyes-Engel²

¹Instituto de Fertilidad Clínica Rincon, IVF laboratory and I + D + i Unit, Malaga, Spain

Abstracts of the 27th Annual Meeting of ESHRE, Stockholm, Sweden, 3 July – 6 July, 2011

²Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Bioquímica Biología
Molecular e Inmunología, Málaga, Spain

³Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Servicio de Análisis Clínicos,
Málaga, Spain

⁴Hospital Materno Infantil, Carlos Haya, Servicio de Anatomía Patológica,
Málaga, Spain

Introduction: Serotonin is an essential monoamine that plays a role in uterine blood flow, endometrial decidualization and embryo implantation. Serotonergic activity is regulated by serotonin transporter gene (5-HTT) that is occasionally expressed in migratory cells inside endometrial tissue during early pregnancy decidua. A serotonergic local network has been proposed to be an important key player acting locally in female genital tracts and being even more interesting target of study since it has been reported that 5-HT transporter gene (SLC6A4) is expressed in mammalian oocytes and embryos. A specific allele at an insertion/deletion promoter polymorphism (5-HTT gene-linked polymorphic region, HTTLPR) regulates the transcription of SLC6A4 gene and activity of 5-HTT in different human cells, the long allele (L) being responsible for increased transcriptional efficiency and higher rate of 5-HT uptake by the 5-HTT. SLC6A4 gene variation suppose an interesting target marker for assess the effect of this serotonergic activity on in vitro fertilization (IVF) treatments outcome. Recipients undergoing egg donation IVF treatment have been selected to study the influence of this polymorphism in treatment success rates and related pregnancy outcome.

Material and Methods: A total of 183 recipients undergoing first IVF treatment at Instituto de Fertilidad Clínica Rincon oocyte donation program with good quality embryo transfer were included. Standardized protocols were applied in donors for ovarian stimulation as well as in recipients for the endometrial preparation. Recipients with uterine and endometrial defects were discarded as well as those women with a recurrent miscarriage failure history. Blood swap were collected and genomic DNA extraction was performed (Qiagen Mini-Kit). Genotyping of SLC6A4 was carried out through PCR amplification achieved in a 2720 ThermalCycler® (Applied Biosystems). Separation of PCR products and subsequent size fragment analysis (ABI PRISM 3130) was performed. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for each group. Fisher exact test was performed to compare genotype distribution and logistic regression models were calculated for odd ratio (OR), 95% confidence interval (CI) for assess possible genotype association with pregnancy outcome, including chemical pregnancy loss, early pregnancy loss and clinical spontaneous abortion.

Results: Distribution of genotypes frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium except for non pregnant women. Recessive model for L allele was performed and Fisher exact test showed different genotype distribution [$p = 0.00698$] between chemical pregnancy loss group and clinical pregnant recipients (0.79 vs 0.26). Logistic regression model showed a strong association [OR = 12.89 $p = 0.0007$ (2.47-67.23) 95%] between chemical pregnancy loss and LL genotype. Although recipients of early spontaneous miscarriage group showed higher frequencies of LL genotype too, there were no statistical differences compared to clinical ongoing pregnancy recipients.

Conclusions: A strong association between long homozygous genotype and the occurrence of early pregnancy loss has been observed. Higher transcriptional profile of L/L SLC6A4 gene variant could influence the regulation of serotonin uptake during decidualization, when the serotonin receptor is occasionally transcribed at low levels. It could affect serotonin extracellular regulation and could be related to impaired events that affects to the normal endometrial development. New findings are necessary to assess functional and clinical impact of serotonergic local network in reproductive outcome.

Supported by Grants SAF2008-03314 and PTQ 09-01-00496.

O-181 Reproductive risk in carriers of robertsonian translocations, segregation study and interchromosomal effect

M. Sandalinas¹, E. García-Guixé¹, A. Jiménez-Macedo¹, C. Arjona¹, P. Colls², T. Escudero², S. Munne², C. Giménez³

¹Reprogenetics Spain, Molecular Genetics, Barcelona, Spain

²Reprogenetics, Molecular Genetics, NJ, U.S.A.

Introduction: Carriers of robertsonian translocations (ROBT) are at risk of producing chromosomally unbalanced embryos but it has been described that aneuploidy for other chromosomes may also play a role in their reproductive difficulties. Our purpose is to evaluate the percentage of normal/balanced and unbalanced embryos depending on maternal age and sex of the carrier and to

observe if there is an increase of chromosomal abnormalities due to interchromosomal effect (ICE).

Material and Methods: 1262 embryos from 126 PGD-ROBT cycles were analyzed. Biopsy and nuclei fixation were done on D + 3 of embryo development following standard protocols. Sequential FISH was applied using the necessary probes to follow the translocation and additional probes (up to 10) were applied to evaluate a possible ICE.

Aneuploidy results were compared to 329 embryos from a control group of patients following PGD cycles for sex-linked diseases (fertile, normal karyotype, maternal age < 38).

Cycles were divided by sex of the carrier and maternal age and according to the chromosome groups implicated in the translocation (D/D or D/G). Fisher exact test was used (Graph Pad Instat 3).

Results: The total percentage of normal or balanced embryos was 42.30%. When separated by maternal age (< 38 and ≥ 38y.o.), a very significant decrease of normal/balanced embryos was detected in the group of women ≥ 38y.o. (46.11% vs 34.51%, $p = 0.0017$). Significant differences were found in the percentage of normal or balanced embryos from female carriers when separated by maternal age (49% < 38y.o vs. 31% ≥ 38y.o., $p = 0.0007$). No differences in normal/balanced embryos were observed when separating by maternal age in male carriers (43% < 38y.o vs. 37% ≥ 38y.o., $p = 0.2058$).

Relating to abnormalities concerning other chromosomes not involved in the rearrangement, and in order to separate maternal age effect from ICE, ROBT cycles were separated by maternal age (< 38 and ≥ 38y.o.). An extremely significant decrease of normal embryos was observed in patients < 38y.o. compared to the control group (44.63% ROBT vs. 65.65% CONTROL, $p < 0.0001$) thus suggesting an ICE. Furthermore, an even more pronounced significant decrease of normal embryos was observed in the group of women ≥ 38y.o., probably as a consequence of the combined effects of maternal age and ICE (27.05% ROBT, $p < 0.0001$). When separated by maternal age and sex of the carrier, significant differences were found in the percentage of normal embryos in the group of ≥ 38y.o. (33% male carrier vs 19% female carrier, $p = 0.0142$) and no differences were found in the younger group (44% male carrier vs 46.19% female carrier, $p = 0.6844$).

Conclusions: Embryos from patients with a translocation have an increased risk of chromosome abnormalities due to the reorganization "per se" and also to the ICE. An especially poor prognosis group in ROBT seems to be female carriers aged 38y.o or more, to whom the combined effect of maternal age and ICE impact negatively, diminishing the number of normal/balanced embryos due to the translocation and also due to aneuploidy. In view of the results, we strongly recommend performing an IVF-PGD cycle for chromosome testing in addition to the translocation study, in order to avoid aneuploidies derived from ICE and advance maternal age. Being a cGH (comparative genomic hybridization array) a technique that allows the detection of any abnormality, it seems the best option to apply in this type of cases.

O-182 The impact of ovarian FMR1 genotypes and sub-genotypes in young oocyte donors on ovarian reserve and recipient pregnancy rates

N. Gleicher^{1,2,3}, A. Weghofer^{1,2,4}, D.H. Barad^{1,2,5}

¹Center for Human Reproduction – New York, NY, USA

²Foundation for Reproductive Medicine, New York, NY, USA

³Yale University School of Medicine, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences

⁴Medical University Vienna, Department of Obstetrics and Gynecology,

⁵Albert Einstein College of Medicine, Departments of Epidemiology and Social Sciences and Obstetrics, Gynecology and Women's Health

Introduction: We recently reported in infertile women that FMR1 genotypes and sub-genotypes affect ovarian reserve and, therefore, in vitro fertilization (IVF) pregnancy rates [Gleicher et al., *PLoS ONE* 2010;5(12):e15303]. At young ages ovarian reserve should best reflect genetic contributions since physiologic contributions of advancing female age are not yet profound. We, therefore, investigated the effects of FMR1 genotypes and sub-genotypes on ovarian reserve in young egg donors.

Materials: This study reports 55 consecutive oocyte donors < age 33 years (mean 23.6 ± 3.2; range 18-32) in 55 first egg donation cycles (recipient ages 42.8 ± 3.9; range 33-51). The donors' follicle stimulating hormone (FSH) was 6.8 ± 2.9 mIU/mL; their anti-Müllerian hormone (AMH) 4.5 ± 2.6 ng/mL. Ovarian FMR1 genotypes and sub-genotypes were determined, based on

Downloaded from <http://humrep.oxfordjournals.org/> by guest on December 30, 2016

significant influence of poor response on the percentage of embryos showing autosomal aneuploidy (OD: 1.23, CI: 0.74-2.05, $P = 0.417$), sexual aneuploidy (OD: 0.9, CI: 0.44-1.85, $P = 0.769$). On the other hand, poor response was associated with a significantly increased risk of embryo multiple abnormalities occurrence (OD: 2.15, CI: 1.15-4.04, $P = 0.017$). In addition, cycle cancellation rate was significantly higher on PR group (4.0% vs 23.5%, $P = 0.0128$). This finding was confirmed through the logistic regression model (OR: 7.38, CI: 2.35-23.24, $P = 0.016$).

Conclusion: In this study we attempted to associate ovarian poor response with increased occurrence of embryo chromosomal alterations in aged women. Results showed that embryo multiple abnormalities occurrence risk is more than two-fold higher in PR patients. This finding also makes plain the statistically lower number of transferred embryos on PR group, since a diminished number of viable embryos were available to be transferred. In addition, odds of cycle cancellation rate were more than seven-fold higher due to the decreased presence of normal embryos on PR group. Similar implantation and pregnancy rates in NR and PR groups could possibly be explained by equivalent embryo morphology and chromosomal status of transferred embryos after PGD performance. Despite the poor prognosis of the IVF outcome in aged patients with low response to ovarian stimulation, the present study shows that poor response is not constantly associated with a decreased implantation and pregnancy rate, however, poor ovarian response impairs embryo chromosomal integrity and percentage of viable embryos, reducing the chances of IVF cycles completion. Moreover, our results highlight the predictive value of aged women ovarian reserve for oocyte quality and competence.

P-550 Potential benefits of PGS in recurrent implantation failure: a prospective controlled trial in a properly characterized population

C. Rubio¹, J. Domingo², L. Rodrigo³, A. Mercader⁴, M.J. De los Santos⁵, T. Pehlivan⁶, E. Bosch⁷, M. Fernández⁸, C. Simón⁹, J. Remohí¹⁰, A. Pellicer¹¹

¹IVI Valencia, PGD, Valencia, Spain

²IVI Las Palmas, Medical Reproduction Unit, Las Palmas, Spain

³IVI Valencia, IVF, Valencia, Spain

⁴IVI Istanbul, IVF, Istanbul, Turkey

⁵IVI Valencia, Medical Reproduction Unit, Valencia, Spain

⁶IVI Sevilla, Medical Reproduction Unit, Sevilla, Spain

Introduction: In recent years great controversy has emerged regarding the application of preimplantation genetic screening (PGS) for different indications. Methodological aspects and patients' selection criteria could explain differences among authors. The aim of this study was to evaluate the usefulness of PGS in patients < 40 years with recurrent implantation failure. Patients were prospectively randomized to either of the following two groups: conventional IVF/ICSI or PGS, both treatments with day-5 embryo transfer.

Material and Methods: Study design: Before starting the cycle, patients were allocated through computer-generated randomization into two groups: conventional IVF/ICSI cycle (group A) or PGS cycle with screening for chromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y (group B). All patients recruited underwent an exhaustive infertility work-up: vaginal ultrasound (hysterosonography or hysteroscopy when needed); blood karyotypes; Anticardiolipin and lupus anticoagulant antibodies; Antitrombin III and APCR levels, factor V Leiden mutation; levels of protein C and S; Serum homocysteine and screening for MTHFR and factor II mutations. Inclusion criteria were: women < 40 years, with ≥ 3 implantation failures in previous cycles with the transfer of at least two good quality fresh embryos per cycle. Exclusion criteria were: any abnormality in the previous infertility work-up; hydrosalpinx; any polyp or myoma; previous ectopic or uterine miscarriages; previous difficult embryo transfer with high difficulty and/or bleeding; other indications for PGS/PGD.

Interventions: Similar protocols for ovarian stimulation and IVF were applied in both groups. Embryos were co-cultured on a monolayer of epithelial endometrial cells and were transferred on day-5 of development. In group B, single blastomere embryo biopsy was performed on day-3 using a non-contact laser system (OCTAX, Herbron, Germany) and aneuploidy was assessed by fluorescence "in-situ" hybridization using additional rounds with subtelomeric probes (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA).

Sample size calculation and interim analysis: Primary end-points were ongoing pregnancy and delivery rates and secondary end-points were blastocyst rates, chromosomal abnormalities and ongoing implantation rates. Sample size was calculated for a 20% difference (20 to 40%) in ongoing pregnancy rates per

cycle between the two groups and at least 64 patients/arm with ovum pick-up had to be enrolled in this trial (Error $\alpha = 5\%$; error $\beta = 20\%$). The study was initiated in 2004 and an interim analysis was performed in December 2009, with half of the patients recruited. A total of 132 patients were initially informed about the study: 25 rejected it, 26 did not meet the inclusion criteria, 11 were excluded after the infertility work-up and finally 70 were enrolled, 35 in each arm. Fisher's exact test was done to compare percentages and Mann-Whitney test for non-categorical variables.

Results: The interim analysis revealed that patients in groups A and B had similar mean age (35.0 ± 2.8 and 35.0 ± 4.0); mean number of MII oocytes (9.9 ± 5.1 and 10.0 ± 4.8); mean number of blastomeres on day-3 (7.1 ± 1.8 and 7.7 ± 1.3) and blastocyst rates (60.1% vs. 69.1%). No statistical differences were found neither in the mean number of embryos transferred (1.7 ± 0.8 vs. 1.4 ± 0.8), nor in the percentage of cycles reaching embryo transfer (88.6% vs. 85.7%) in groups A and B, respectively. The percentage of chromosomal abnormalities in group B was 60.9% (112/184). The one-sided analysis revealed significant increases in group B compared to group A, regarding ongoing pregnancy rate per transfer (50.0 vs. 25.8 ; $p = 0.0456$) and ongoing implantation rate (36.0 vs. 16.9 ; $p = 0.0202$). Group B also showed superiority in ongoing pregnancy rate per cycle, without reaching statistical significance (42.9 vs. 22.6 ; $p = 0.0630$).

Conclusions: PGS could be beneficial in a selected group of patients with recurrent implantation failure in whom other potential causes were discarded. Higher embryo aneuploidy rates than the expected according to patients' age were observed.

P-551 Spontaneous abortion and 44-bp insertion/deletion polymorphism of the SLC6A4 gene

B. Perez-Nevo¹, A.M. Lendinez¹, A.R. Palomares², M. Polo³, A. Rodriguez⁴,

A. Reche⁵, M. Ruiz-Galdón⁶, A. Reyes-Engel⁶

¹Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Análisis Clínicos, Málaga, Spain

²Instituto de Fertilidad Clínica Rincón, Bioquímica y Biología Molecular, Málaga, Spain

³Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Anatomía Patológica, Málaga, Spain

⁴Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Ginecología y Obstetricia, Málaga, Spain

⁵Hospital Materno Infantil, Carlos Haya, Ginecología y Obstetricia, Málaga, Spain

⁶Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Bioquímica y Biología Molecular, Málaga, Spain

Introduction: Although the relationship between antidepressant use during pregnancy and its adverse effects has been widely investigated, very few studies have evaluated the impact of antidepressant use during pregnancy on the risk of spontaneous abortion (SA). Several studies suggest that gestational exposure to antidepressants, especially selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), can lead to spontaneous abortion.

On the basis of these reports we have analyzed the allele and genotypes frequencies of the 44-bp insertion/deletion polymorphism in 5-Hydroxy-tryptamine transporter gene promoter region (5-HTTLPR) in samples from SA.

Material and Methods: Paraffin embedded tissues samples, from SA of unknown etiology ($n = 29$), and a group of 89 fertile women, were genotyped for the 44-bp insertion/deletion polymorphism located in the promoter region of the SLC6A4 gene. Paraffin from tissues was discarded by Xyloil washing. DNA was extracted from tissues and blood samples by salting-out method. PCR amplified samples were analysed by Snapshot (Applied Biosystem).

Results: The genotypes and allele frequencies of the groups were: SA, SS = 0.71, SL = 0.18 and LL = 0.11; control group, SS = 0.32, SL = 0.43, LL = 0.25 ($p < 0.001$). It has been reported that cells homozygous for the L form produced steady-state concentrations of SLC6A4 mRNA that were 1.4 to 1.7 times those in cells containing 1 or 2 copies of the S variant. In these studies, the data associated with the S/S and L/S genotypes were similar, whereas both differed from the L/L genotype, suggesting that the polymorphism has more of a dominant-recessive than a codominant-additive effect. Although S/L polymorphism of the SLC6A4 has been related to several mental diseases, and human behavior, and the short (S) form (functionally L/S or S/S) shows an increase in brain metabolism, very few of these studies are referred to the development of the brain embryo, and none has been related to foetal viability as the present report.

Abstracts of the 26th Annual Meeting of ESHRE, Rome, Italy, 27 June – 30 June, 2010

Conclusions: Although this is an ongoing study, with a low sample number by now, we observed a strong presence of SS genotype in samples of fetuses. These results permit to conclude that metabolism of serotonin has some influence on human fetal viability. Supported by Grants AF2008-03314 and PTQ 09-01-00496.

P-552 Validation of putative CNVs on the X chromosome in POF patients

E.A.H. Knauff¹, H.M. Blauw², K. Kok¹, C. Wijmenga³, B.C.J.M. Fauser¹, L. Franke²

¹University Medical Center Utrecht, Reproduction & Gynaecology, Utrecht, The Netherlands

²University Medical Center Utrecht, Neurology, Utrecht, The Netherlands

³University Medical Center Groningen, Genetics, Groningen, The Netherlands

Introduction: Premature ovarian failure (POF) is the spontaneous cessation of the menstruation before age 40 accompanied with elevated FSH, low AMH and oestradiol levels. Copy number variants (CNVs) are submicroscopic deletions or duplications ranging from 1 kilobase to several megabases and are of increasing interest in explaining human genetic variation. Since microscopic X chromosomal aberrations identified by karyotyping are associated with POF we hypothesized that submicroscopic CNVs also contribute to POF pathogenesis. These variants will go undetected by conventional karyotyping but can be readily detected with high-density SNP arrays. Using Illumina 370k SNP genotyping chips and Using PennCNV calling software, we identified putative deletions in the Xq21.3 locus in nearly 15% of the 110 patients that were analyzed and none in controls (ESHRE abstract 2009 - Hum. Reprod. 24:i12 O-029). Notably, karyotypic abnormalities have been reported in this locus to be associated with POF.

Material and Methods: To substantiate this finding we re-analyzed 13 of 15 subjects that suggested a deletion on the Xq21.3 locus using an 8-plex 60K array that was custom designed using eArray. The array (ID 023317, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) contains 48,325 probes, evenly distributed over the X chromosome, with a medium distance between the probes of 1.9 Kb. All probes were selected from the probe groups present on the catalogue 1M and 400K arrays (ID 021529 and ID 021850, respectively, Agilent).

Results: We did not observe deviating intensity values for consecutive probes in the analyzed samples, indicating that the samples do not contain CNVs in this locus. Therefore, the putative CNVs identified are most likely false-positives. We hypothesize that batch or probe binding effects may have played a role in the earlier Illumina experiment.

Conclusions:

- The earlier identified deletion locus on Xq21.3 could not be validated using a custom designed ultra high density X chromosome comparative genomic hybridization array.
- CNVs on the X chromosome do not play a major role in the aetiology of POF.
- Careful validation is required when using high density genotyping chips for CNV detection.

P-553 Parthenogenetic activation of human oocytes as a model for polar bodies-PGD

A. Paffoni¹, V. Paracchini², S. Ferrari¹, L. Restelli¹, D.A. Coviello², C. Scarduelli¹, M. Seia², G. Ragni¹

¹Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milan Italy, Department of Obstetrics and Gynaecology Infertility Unit, Milan, Italy

²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milan Italy, Medical Genetics Laboratory, Milan, Italy

Introduction: Pre-implantation genetic diagnosis (PGD) has become an established clinical approach for prevention of genetic disorders and polar bodies analysis instead of, or together with, blastomeres analysis has gained increasing importance in recent years.

We evaluated a model of parthenogenetic activation of human oocytes in order to assess the feasibility of PGD for monogenic disorders on human oocytes in our laboratory. Aim of this model was to test an ethical experimental setting independent from fertilization, resembling the dynamics of chromosome segregation and crossover during meiosis. In this model, after the molecular analysis of the first polar body (PB1), the second polar body (PB2) can be obtained in order to have a complete genetic analysis and validate molecular

results. Indeed, PB2 analysis is useful to confirm a diagnosis of homozygous PB1 or to predict which maternal allele will be present in the oocyte in case of heterozygous PB1.

Material and Methods: After partial zona pellucida dissection, PB1s were removed from spare donated metaphase-II oocytes and immediately transferred to lysis buffer for subsequent molecular analysis. Parthenogenetic activation was conducted on biopsied oocytes through exposure to 5 mM ionomycin in culture medium for 5 minutes at 37 °C, 5% CO₂ in the dark. Oocytes were then washed three times in fresh cleavage medium, placed separately in 40-µL microdrops of the same medium under mineral oil, and cultured in standard conditions. After 18–20 hours, oocytes were evaluated for signs of activation. Oocytes showing one enlarged pronucleus and extrusion of PB2 were considered activated; PB2s were biopsied and treated as PB1s.

The molecular analysis involved a fluorescent multiplex polymerase chain reaction (PCR) of highly polymorphic short-tandem repeat (STR) markers, closely linked to the disease-causing gene. In this set of experiments, a panel of ten highly polymorphic STR markers flanking 'Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator' (CFTR) gene was selected for haplotype analysis. Based on three or more informative markers, genetic analysis was performed on PB1 and PB2.

Results: Twenty-one oocytes were selected from seven women. After PB1 removal, twenty of them were subjected to parthenogenetic activation, and fifteen (75%) extruded the PB2. All of PB1s were successfully PCR-amplified but three out of 15 PB2 did not get any amplification product. Limiting the results to 12 oocytes with both PB1 and PB2, 10 out of 12 PB1s were heterozygous and 2 homozygous for the evaluated markers, thus resulting in a percentage of cross-over recombination of 83%. PB2s analysis consistently permitted the prediction of the oocyte's genotype in case of heterozygous PB1s (n = 10), and confirmed PB1 results in homozygous cases (n = 2).

Among all evaluated markers, we observed a frequency of allele drop out (ADO) of 5.1% (3/59) with no more than one case of ADO for single PB.

Conclusions: The model of parthenogenetic activation confirms that polar bodies-PGD for single gene disorders is feasible and offers a valuable tool for setting up PGD procedures without wasting zygotes. Our results confirm a high recombination rate in CFTR gene suggesting a very limited possibility of selecting oocytes according to genetic analysis of PB1 only.

P-554 Application of mild stimulation and single blastocyst transfer with vitrification in preimplantation genetic diagnosis (PGD) cycles: case report

N. Aoyama¹, Y. Takehara², S. Kawachiya², T. Kuroda¹, N. Kawasaki¹, R. Yamadera¹, T. Suzuki¹, K. Kato², O. Kato²

¹Kato Ladies Clinic, Perinatal Genetics Division, Tokyo, Japan

²Kato Ladies Clinic, Tokyo, Japan

Introduction: The efficacy of mild stimulation and single blastocyst transfer has been reported previously, however these techniques are not commonly applied in PGD cycles. We set out to develop a new approach for PGD.

Material and Methods: Nine couples consisting of subjects with a mean age of 35.1 years who were carriers of translocations, had experienced two or more consecutive pregnancy losses, and failed to experience a live birth in their entire reproductive history. Prior to the commencement of the study, approval from the ethical aspect was received from the Japan Society of Obstetrics and Gynecology and our local Institutional ethics committee.

From January 2007 to December 2009, 9 patients underwent mild ovarian stimulation, which was carried out by administration of clomiphene citrate in combination with a minimum amount of urinary HMG (150IU X less than 4 times) or recombinant FSH (150IU X less than 3 times). Administration of clomiphene citrate was initiated from day 3 of the menstrual cycle at 50mg/day and was continued until the day before administration of the GnRH agonist as the maturation trigger (GnRH_a nasal spray, 300µg) and 32-35 h before oocyte retrieval as described by Kato.

IVF was performed for all oocytes, and embryos reaching at least the 6-cell stage on day 3 of development were biopsied by mechanical and cleavage aspiration.

Two blastomeres were removed and fixed by the Carnoy method. Culture of all the biopsied embryos was continued, and embryos developing to the blastocyst stage were vitrified. FISH analysis was performed on all blastomeres using 3 to 4 appropriate FISH probes for several loci divided by the patient's own

Downloaded from <http://humrep.oxfordjournals.org/> by guest on January 9, 2017

i329

6. DISCUSION

El análisis de los polimorfismos genéticos es una herramienta válida para explorar la implicación de diversos sistemas biológicos en el proceso reproductivo. Las pacientes que se someten a un tratamiento de FIV-ICSI con recepción de óvulos de donantes pueden agruparse según su condición genotípica de acuerdo a las variantes seleccionadas para el estudio, lo que permite estudiar de forma fácil si existen diferencias en los resultados del tratamiento entre estos grupos y de esta forma se puede detectar si existe algún tipo de influencia genética en la consecución del embarazo.

Los resultados de este estudio demuestran una asociación significativa entre la distribución de las frecuencias poblacionales de variantes genéticas, relacionadas tanto con la ruta de la P53 y con el sistema serotoninérgico, con el éxito de los tratamientos FIV de recepción de óvulos de donante.

6.1 Las variaciones genéticas en la ruta de la P53 influyen en la implantación embrionaria.

La influencia de las variantes genéticas estudiadas en los genes TP53, LIF, Mdm4 y USP7 se han asociado previamente con un descenso de resultados en los tratamientos de FIV (58); sin embargo, en nuestro estudio con pacientes receptoras, no se observa esta tendencia para todas las variantes.

La distribución de frecuencias genotípicas para los distintos marcadores del grupo de mujeres embarazadas se mostró en el equilibrio de Hardy-Weinberg, pero no fue así para la variante MDM4 (rs1563828) ($p=0.0022$) en la población de mujeres que no logró el embarazo [Tabla 4]. La desviación de las frecuencias en el equilibrio en la población de mujeres no embarazadas, debe tomarse con cautela por la posible existencia de un sesgo poblacional o error en el genotipado, esta última opción es poco probable por los controles experimentales establecidos en los análisis. En el caso de ser un sesgo puede deberse la relación a de dichos marcadores polimórficos

con la causa de infertilidad subyacente, y por potencialmente influir en esa población de mujeres con problemas de infertilidad que han tenido que recurrir a la medicina para cumplir su proyecto reproductivo (108).

La única variante que presentó diferencias en los resultados según el genotipo de las pacientes fue la variante funcional Arg72Pro de la P53. Aumentó la presencia de la variante Pro de tal forma que la frecuencia del genotipo homocigótico Pro/Pro es hasta tres veces superior en el grupo de receptoras que no logró la gestación, además este grupo de receptoras presentó tasas de implantación muy inferiores respecto al resto de receptoras portadoras del alelo Arg72 [Tabla 7b].

La variante Arg72Pro modifica la expresión del gen LIF; así el alelo Arg72 de la P53 en homocigosis induce un patrón de expresión dos veces superior, observable a nivel transcripcional y traduccional de la proteína LIF, en comparación con la configuración homocigótica Pro/Pro (57). En trabajos previos se ha observado que el alelo Pro es más frecuente en los pacientes que recurren a tratamientos de FIV para solventar un problema de infertilidad y se llega a considerar como un factor de riesgo ante el fallo de implantación (88). En este mismo sentido, recientemente, se ha observado que la frecuencia del genotipo Pro/Pro es significativamente mayor en pacientes con fallo de implantación recurrente (109). Nuestros resultados confluyen en la misma línea que los estudios desarrollados previamente por otros grupos (58,88,109); sin embargo, algunas peculiaridades del diseño de nuestro estudio de receptividad endometrial, basado exclusivamente en receptoras de óvulos de donantes, pueden aportar nuevos aspectos en la línea de discusión de estos hallazgos. Kang et al., 2009. observaron una menor tasa de éxito del genotipo Pro/Pro en los tratamientos de FIV sobre pacientes menores de 35 años, quienes tuvieron menores tasas de implantación y embarazo. Esta misma tendencia negativa se observa en el grupo de pacientes que forman nuestro estudio, que presentan una edad media de 40.49 (\pm 4.31) años; por ello, consideramos que los efectos negativos en mujeres portadoras del genotipo Pro/Pro mantienen la misma importancia

independientemente de la edad. Kang et al. 2009 también utilizaron óvulos donados para las pacientes que superaban los 35 años, pero no se incluyen los criterios de selección de donantes, ni los criterios que llevaron a indicar la recepción de óvulos como opción de tratamiento a las pacientes.

La constitución cromosómica anómala de los embriones transferidos es una de las causas más importantes del fallo de implantación y de la pérdida gestacional temprana, este factor no se ha tenido en cuenta en el presente estudio y por lo tanto puede considerarse como una de las principales limitaciones que pueden influir sobre cualquier asunción realizada respecto a los resultados de los tratamientos. Sin embargo, a la luz de los resultados, se añaden evidencias para considerar que la presencia del genotipo Pro/Pro pueda constituir un factor de riesgo independiente que influye negativamente en el éxito del tratamiento de FIV, independientemente de la edad y del origen de los óvulos. A pesar de que existen trabajos desarrollados por otros grupos que muestran la misma tendencia que nuestros resultados, se requieren nuevos estudios que aclaren la relación entre estos polimorfismos en distintas poblaciones y etnias, puesto que también estudios poblacionales con un importante número de pacientes en los que no se observan los mismos resultados de acuerdo a los resultados de los tratamientos de FIV (110,111).

El efecto funcional de la variante Arg72Pro y su implicación en la implantación embrionaria es completamente desconocido, se ha evidenciado experimentalmente que la presencia del genotipo homocigótico Pro/Pro disminuye la expresión de LIF a la mitad con respecto al homocigótico Arg/Arg y por ello puede estar influyendo en la implantación donde LIF es esencial (34,47,48). LIF es una citoquina que interviene en diversos procesos biológicos relacionados con la implantación como son la proliferación y la diferenciación celular durante el desarrollo endometrial, la decidualización, la respuesta inmune y la vascularización en el entorno uterino (112). Un número creciente de evidencias sugieren que fluctuaciones en la expresión de LIF pueden tener consecuencias negativas en la consecución y el mantenimiento del

embarazo; concretamente, se ha observado que una elevada expresión de LIF es un marcador de alta receptividad endometrial (112,113) [Tabla 14].

Tabla 14. Influencia de los procesos biológicos que tienen lugar en la implantación regulados por LIF(113)(113)(113)(113)(113)

Función en el útero	Decidualización de células del estroma	Interacción epitelio-mesénquima y polaridad celular	Respuesta inmune inflamación/innata, vascularización, y angiogénesis	Proliferación celular y diferenciación
Rutas reguladas por LIF	Canonical and non-canonical Wnt/ β -catenin pathway Notch 2, FGF, TGF β /BMP/activing	Wnt/ β –catenin Actin cytoskeleton Integrin Osteoponin	Toll-like receptor, NF κ β , ephrin, VEGF, and FGF signaling pathways	IGF-1, FGF, progesterone receptor, and ERK-MAPK signaling pathways

(Rosario et al, 2016)

Son necesarios estudios que permitan aclarar las relaciones entre los distintos procesos involucrados para evaluar la asociación del genotipo Pro/Pro con una menor expresión de LIF y también su relación con un menor éxito en el tratamiento de FIV.

Considerando algunas observaciones que se pueden desprender de nuestros resultados se destaca una cuestión importante; por ejemplo, que el modelo de herencia puede determinar la influencia de los genotipos con respecto a la tasa de implantación ya que parece obedecer a un modelo de recesividad del alelo Pro72, al que se asocian menores tasas de implantación en las pacientes que lo portan en homocigosis comparado con las pacientes heterocigóticas Pro72/Arg72 y homocigóticas Arg72. Este aspecto tiene consecuencias directas a nivel funcional pudiendo tener a su vez mayor relevancia desde el punto de vista clínico. En general este polimorfismo influye sobre la expresión de LIF en células humanas que se refleja cuando existe una menor expresión de LIF en la línea homocigótica del alelo Pro72, pero solo han considerado líneas homocigóticas sin valorar las líneas heterocigóticas y por lo tanto no se puede determinar la existencia fenotipo intermedio que pudiera corroborar o rechazar el carácter recesivo de Pro72 (56).

Nuestros resultados, al igual que otros trabajos previos, hallaron una asociación negativa entre el genotipo Pro/Pro y el éxito tras el tratamiento de FIV. Hipotéticamente se sospecha que los sujetos homocigóticos Pro/Pro muestran un defecto en la expresión inducible de LIF, manifestando una expresión génica insuficiente durante la fase implantatoria cuando es especialmente necesario. Los individuos que presenten al menos una variante Arg expresarían una población de proteínas equitativa con ambos alelos e inducen la expresión de LIF con suficiente intensidad para que no sea limitante durante la implantación. Aunque el genotipo Pro/Pro está asociado a defectos en la implantación en nuestra población, no puede considerarse como un factor absoluto ni se puede generalizar para otras poblaciones. En este sentido deben considerarse otros factores de carácter también genético, a través de una interacción con otros genes o proteínas, o bien, otros condicionantes ambientales que coadyuven durante el evento reproductivo.

Existen grandes diferencias con respecto a la distribución geográfica de esta variante genética en distintas poblaciones evidenciando algunas particularidades, como por ejemplo que la variante Pro72 se haya seleccionado mayoritariamente, con respecto a la variante Arg72, en poblaciones Africanas y aquellas más próximas al Ecuador (114). Para justificar estas observaciones, se ha especulado con que pueda haber factores ambientales relacionados con una segregación variable de los alelos en distintas poblaciones debido al cambio de la latitud. Uno de los factores que se ha considerado es la variación en el índice de exposición a radiaciones ultravioletas (UV) entre poblaciones genotipadas a distintas latitudes. Sin embargo, las diferencias en el índice de radiación UV entre las localizaciones de las poblaciones estudiadas y los cambios en las frecuencias no obedeció a ninguna correlación, algo que si ocurrió al comparar la temperatura media en invierno por los cambios estacionales. A partir de estas observaciones se sugiere que haya producido una selección de forma ventajosa el alelo Arg72 en latitudes más frías reduciendo el riesgo de defectos de implantación (115). La variación de las frecuencias genotípicas de diversos marcadores que influyen directamente sobre el potencial reproductivo en interacción

con condicionantes ambientales, nutricionales y/o genéticos en determinadas poblaciones ya ha sido reportado como es el caso de la ingesta de folatos sobre los polimorfismos de la MTHFR en un estudio previo de nuestro propio grupo (116).

6.2 Las variaciones genéticas del sistema serotoninérgico influyen en el éxito de los tratamientos de recepción de óvulos de donante

Tres de las variantes seleccionadas previamente relacionadas con el sistema serotoninérgico han mostrado variaciones significativas en la distribución de frecuencias de la población de pacientes evaluadas según el resultado del tratamiento. Estas variantes cuyos resultados han sido estadísticamente significativos son ins/del en 5-HTTLPR en el gen SLC6A4 (SERT), el rs6295 (C1019G) del gen HT1A (5-HTR1A) y rs1390938 (Thr136Ile) del gen SLC18A1 (VMAT1). Hasta la fecha se desconoce la implicación que pueden tener estas variantes, aunque tanto el polimorfismo ins/del 5-HTTLPR como el Thr136Ile afectan a los genes SLC6A4 y VMAT1 cuya función biológica está relacionada con el transporte intercelular y la biodisponibilidad de 5-HT.

La distribución de las frecuencias para los distintos marcadores del grupo de mujeres embarazadas, se mostraron en el equilibrio de Hardy-Weinberg; sin embargo, no sucede lo mismo para los marcadores ins/del 5-HTTLPR (SERT), rs1176744 (HTR3B) y rs3027452 (MAOB) en la población de mujeres que no lograron el embarazo tras el tratamiento. La desviación en el equilibrio H-W de las frecuencias genotípicas de variantes estudiadas en la población de mujeres no embarazadas debe tomarse con cautela, puesto que podrían manifestar un sesgo en la selección de la población, o también errores en el genotipado. La inclusión de controles experimentales reduce la incertidumbre sobre la posibilidad de que haya un error en el genotipado. Por otro lado, el diseño del estudio como caso-control anidado, en el que la división de los grupos dependerá del resultado y la evolución de los tratamientos, reduce la posibilidad a que el sesgo, si tiene lugar, se deba a un bias de selección de las

poblaciones. Por lo tanto ante una desviación de H-W se podría manifestar una relación entre el polimorfismo y la causa subyacente de fertilidad que se observa directamente y que influye en el potencial reproductivo y que lleva a estas mujeres a requerir asistencia médica para lograr el embarazo (108).

La comparativa entre la distribución de las frecuencias genotípicas de las poblaciones que han sido tomadas como población de referencia (europeas y caucásicas del repositorio de 1000genome) y el total de las pacientes incluidas en el estudio, mostraron una desviación de las frecuencias en los marcadores ins/del 5-HTTLPR (SERT), C1019G (5-HTR1A) y Thr4Pro de la proteína VMAT1, lo que sugiere un enriquecimiento de dichas variantes en este grupo de mujeres sometidas a un tratamiento de infertilidad con respecto a la población general. Como se ha mencionado con anterioridad dos de estas variantes in/del (5-HTTLPR) y C1019G (5-HTR1A) están relacionadas con los resultados de los tratamientos de FIV.

Además de las variaciones en la distribución de frecuencias genotípicas con respecto a la población de referencia, se ha observado la relación entre condiciones genotípicas y los resultados de los tratamientos de FIV con óvulos de donantes para las variables ins/del 5-HTTLPR (SERT), C1019G (5-HTR1A) y Thr136Ile (VMAT1). Hasta la fecha y según nuestro conocimiento es la primera vez que se observa la relación entre estas variantes genéticas, relacionadas con la homeostasis y la respuesta del sistema serotoninérgico, y el potencial reproductivo observado bajo el desarrollo de técnicas de reproducción asistida.

Las mujeres portadoras de los genotipos individualmente LL de 5-HTTLPR (SERT), CC de C1019G (5-HTR1A) e Ile/Ile Thr136Ile (VMAT1) presentan menor tasa de implantación, menor tasa de embarazo y mayor tasa de aborto bioquímico. Resulta especialmente llamativo que 3 variantes asociadas directamente a la actividad de la serotonina puedan influir de forma similar durante las etapas tempranas de la

implantación embrionaria, antes de que llegue a completarse la formación del saco gestacional y que por lo tanto sea visible a nivel ecográfico.

6.2.1 -Las variantes 5-HTTLPR (SERT) y Thr136Ile (VMAT1) pueden influir en la disponibilidad de 5-HT en la interfase materno-embionaria.

Como ya se ha mencionado anteriormente el aporte materno de 5-HT es esencial durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario e incluso posteriormente durante la implantación y el embarazo (73,75,117,118). La distribución de la 5-HT en el endometrio es asimétrica y se concentra en mayor cantidad en la región epitelial, donde una elevada actividad de la MAO-A se ha asociado con mayor éxito reproductivo tras la recepción de óvulos donados (119). La mayor actividad de la MAO-A coincide con la mayor concentración de 5-HT en la región glandular del endometrio; por analogía con otros nichos tisulares en los que actúa el sistema serotoninérgico a nivel epitelial, se sugiere que ésta se internaliza y se degrada en esta localización (97,119). Como ya apuntan otros trabajos se suma una aportación más a la hipótesis de que existe un beneficio reproductivo cuando se acumula mayor cantidad de 5-HT en la región superficial del endometrio (75).

La distribución polarizada y asimétrica de 5-HT en la pared del útero es consecuencia de la compartimentación de las actividades de síntesis y degradación del triptófano en el epitelio y el estroma respectivamente. Así, la proteína TPH1 presente en el epitelio endometrial glandular (61), promueve la síntesis de triptófano, que es el precursor metabólico de 5-HT y también promoverá su síntesis en el epitelio endometrial durante las etapas más tempranas del desarrollo embrionario (75,77).

Por otro lado la TDO degrada triptófano en la región estromal presumiblemente así se previene la respuesta inmunológica mediante el control de la proliferación de linfocitos T; al limitar la producción de triptófano también limitará la producción de 5-HT (75). Las variantes genéticas 5-HTTLPR y Thr136Ile, influyen directamente sobre

el transporte de 5-HT y en determinadas condiciones el efecto de estas variantes podría comprometer la disponibilidad de 5-HT en determinadas localizaciones celulares. El hecho de que las variantes asociadas a una mayor tasa de internalización de 5-HT en el interior celular, sean significativamente más representativas de las mujeres que sufren un aborto bioquímico, podría estar relacionado con una mayor tasa de internalización de la 5-HT libre que en determinadas circunstancias pudiera crear un compromiso del proceso implantatorio por un mecanismo aún desconocido. Las proteínas SERT y VMAT1 cuya función se vincula a la movilización de 5-HT se han detectado en el epitelio glandular del endometrio y en la decidua, donde pueden llevar a cabo la internalización de 5-HT desde la superficie luminal hasta el citosol de las células endometriales bien por transporte directo (SERT) o a través de vesículas (VMATs) (79).

Como ya se mencionó anteriormente, monoaminas como la 5-HT, están involucradas en un gran número de procesos biológicos y su concentración suele estar estrechamente regulada, por lo que la tasa de asimilación de 5-HT en el interior de las células endometriales puede verse alterada por las variantes genéticas que alteran la función de SERT y VMAT1; si es así también podría verse condicionado el desarrollo embrionario, el proceso de implantación e incluso el embarazo como se ha visto en otros modelos animales (117). En humanos existen modelos patológicos que muestran como una depleción de 5-HT en mujeres gestantes que padecen Fenilcetonuria, presentan una mayor incidencia de defectos embrionarios durante la gestación y también de pérdidas gestacionales espontáneas (120,121). La inhibición de la recaptación de 5-HT a través de inhibidores del sistema recaptador de serotonina (SSRIs) bloquea parcialmente la internalización de 5-HT aumentando los niveles de 5-HT extracelulares. El empleo terapéutico de los SSRIs durante el embarazo se ha relacionado con mayores incidencias de abortos espontáneos (122,123). Aunque la FDA haya desaconsejado su uso durante el embarazo, existe un debate sobre como continuar, si la terapia debe seguir y si no se dispone de otras alternativas.

Desde el punto de vista fisiológico puede interpretarse que tanto un exceso de 5-HT libre como un defecto de recaptación de la misma puede tener consecuencias deletéreas durante el desarrollo embrionario, la implantación y las etapas tempranas del embarazo. Il'ková et al. propusieron la existencia de un nivel crítico en la concentración de 5-HT, a partir del cual se ejerce una regulación autocrina/paracrina tanto del desarrollo embrionario como de la interacción materno-embionaria. Para que se pueda estabilizar un nivel de 5-HT en un rango, deben existir procesos dirigidos a mantenerlo y regularlo; de hecho, se ha descrito la presencia de una red serotoninérgica local en el tracto reproductor femenino (74). Además de que existan mecanismos que regulan la 5-HT, están presentes otros elementos funcionales que permiten el trasiego de 5-HT hacia el embrión como es el caso de SERT (76).

La distribución exacta de la 5-HT en la superficie endometrial y su potencial rol sobre el desarrollo embrionario es completamente desconocido. La mayoría de la 5-HT periférica se sintetiza en las células enterocromafines en el tracto digestivo y se transporta a las distintas localizaciones del cuerpo viajando en el interior de las plaquetas que actúan como importantes reservorios. La concentración de 5-HT en la región glandular del endometrio epitelial parece ser consecuencia de los mecanismos de regulación local expuestos anteriormente mediados por TPH1 y TDO (75). No puede descartarse que exista algún tipo de influjo adicional desde el sistema circulatorio como podría ser a través de las plaquetas.

El aumento de la expresión de SERT que induce la presencia del genotipo LL (5-HTTLPR) y la mayor actividad de VMAT1 asociada al genotipo Ile/Ile en Thr136Ile (VMAT1) confieren a ambos una mayor tasa de recaptación de 5-HT (99,124,125). Los genotipos LL 5-HTTLPR (SERT) e Ile/Ile Thr136Ile (VMAT1) presentan individualmente una elevada asociación con el riesgo de sufrir un aborto bioquímico, pudiendo señalar la influencia del transporte de 5-HT, y quizás también de otras monoaminas, durante la deciduización y la progresión de la implantación.

En genética epidemiológica, mayoritariamente se estudian polimorfismos con valores genotípicos individuales siendo difícil advertir un posible efecto de epistasia. Por este motivo se ha expandido el análisis para ver si pudiera haber alguna sinergia entre las variantes sobre el potencial reproductivo. El análisis de interacción mediante combinación de alelos tiene un alto valor diagnóstico y funcional, pero su cálculo resulta en realidad de una estimación. Por otro lado, el análisis de diplotipos es una representación de la población de estudio y cualquier asociación detectada tendrá menor incertidumbre que la representada por los conjuntos de alelos (126). Tanto el análisis de las combinaciones alélicas [Tabla 12], como el análisis de los diplotipos en las variantes ins/del (5-HTTLPR) y Thr136Ile (VMAT1) y su asociación con el embarazo clínico tras los tratamientos de FIV [Tabla 13], mostraron que las receptoras portadoras de los alelos de riesgo L (5-HTTLPR) e Ile (Thr136Ile) tienen peor pronóstico. En nuestra población de estudio se observa una alta agregación de pacientes portadoras de ambos genotipos LL (5-HTTLPR) / Ile-Ile (VMAT1) con una frecuencia siete veces mayor en la población de pacientes con respecto a la frecuencia esperada de la población de referencia (1000genome). Pese a ser una estimación, la proporción de la interacción de los alelos L (5-HTTLPR) e Ile (VMAT1), también se correlaciona de forma aproximada con un aumento de proporción similar [Tabla 12]. A nivel genotípico en nuestra población, la combinación de LL (5-HTTLPR) e Ile/Ile Thr136Ile (VMAT1) está presente exclusivamente en pacientes que no lograron el embarazo y está ausente en aquellas pacientes embarazadas. No puede descartarse que ambos genotipos de forma sinérgica influyan en el transporte de 5-HT a través de SERT y del transporte vesicular a través de la VMAT1, pudiendo crear un desequilibrio de la homeostasis que regula la disponibilidad de 5-HT y comprometer el aporte materno de la misma durante la interfase materno-embrionaria, algo que ya se ha comprobado que es esencial tanto para el desarrollo embrionario como para la implantación (73,75). Aunque se desconoce si esta sinergia es efectiva hasta el punto de desequilibrar y comprometer la disponibilidad de 5-HT, la alta presencia de ambos genotipos en la población de mujeres que no logra el embarazo tras el tratamiento de FIV nos lleva a pensar que, en determinadas

condiciones, la dotación genotípica 5-HTTLPR e Thr136Ile pueden influir tanto en el desarrollo embrionario como en el mismo proceso de la implantación irrumpiendo el establecimiento de la gestación.

A partir del análisis individual de las variantes ins/del 5-HTTLPR (SERT) y Thr136Ile (VMAT1) se pueden extraer otras observaciones interesantes. La población de pacientes portadores de las variantes en heterocigosis en ambas variantes, presentan tasas de implantación más elevadas respecto a las respectivas pacientes homocigóticas. De esta forma, se especula con que el rendimiento de transporte de 5-HT y la disponibilidad de la misma en la superficie endometrial puede ser más beneficiosa bajo un fenotipo intermedio en el que no predomine una alta o baja tasa de recaptación. En las pacientes heterocigóticas para Thr136Ile se expresan proteínas VMAT1 con ambas configuraciones Ile136 y Thr136, implica que teóricamente se dispondrá de una distribución equitativa de ambas formas del gen con la que en definitiva se debe implantar una actividad intermedia que pudiera ser ventajosa. A expensas de que estas observaciones se corroboren experimentalmente y tengan la misma implicación desde el punto de vista funcional, este fenómeno guarda relación con las observaciones previas que apuntan a un rango óptimo de concentración de 5-HT durante la implantación embrionaria (118). Las diferencias en la tasa de implantación para la población heterocigota L/S de 5-HTTLPR (SERT), aunque también se elevan considerablemente no es significativa, probablemente porque la influencia sobre la expresión no difiera tanto en comparación con S/S como ya se ha observado en otros modelos (124).

6.2.2 -La interacción de las variantes 5-HTTLPR (SERT), Thr136Ile (VMAT1) y C1019G (5-HTR1A) pueden influir en la inmunomodulación serotoninérgica de la tolerancia materno-embionaria.

La interacción entre las variantes genéticas 5-HTTLPR (SERT) y C1019G (5-HTR1A) influyen sobre la regulación y actividad de ambos productos génicos SERT y 5-

HTR1A en otros tejidos distintos del endometrio (127,128). Los genotipos LL (5-HTTLPR) y CC C1019G (5-HT1A) afectan de forma independiente en la consecución del embarazo, pero la asociación combinada de ambos alelos es significativamente representativa en los grupos de receptoras que no lograron el embarazo y aquellas que tuvieron pérdidas gestacionales tempranas. La combinación entre los alelos L (5-HTTLPR) y C (C1019G de 5-HT1A) y su relación, significativa, con el aborto bioquímico, puede sugerir que exista una interacción funcional entre ambas variantes polimórficas. Se estima que un 66% de las pacientes receptoras que sufrieron una pérdida gestacional temprana en forma de aborto bioquímico portaba dicha combinación de ambos alelos juntos [Tabla 10].

La función de 5-HTR1A está bien caracterizada en la sinapsis neuronal; sin embargo, la amplia distribución de dicha proteína en otros tejidos, fuera del sistema nervioso, indica que podría desempeñar otras funciones ajenas a la neurotransmisión. Un nicho celular en el que 5-HTR1A puede tener un papel especialmente relevante es en el sistema inmunológico ya se expresa en un gran número de células que participan en la respuesta inmune, lo que le da una alta representatividad, y también por su papel, contrastado a través de diferentes ensayos experimentales, en la inmunomodulación mediado por serotonina (89,90,129). Algunas de las células del sistema inmune en el que se expresa 5-HTR1A son las células dendríticas y los macrófagos que están presentes en la decidua y migran transitoriamente al sitio de implantación (130,131).

Tanto los macrófagos como las células dendríticas parece que juegan un papel importante en la tolerancia materno-embrionaria (28). Además de su función de presentación de antígenos, los macrófagos, pueden ejercer un papel de control de la inflamación clave por la intensa actividad que se produce durante la remodelación de tejidos forzada por la invasión trofoblástica. Se sospecha que los macrófagos intervienen mediante la secreción de citoquinas y proteínas de la matriz extracelular, pero también fagocitan de forma activa restos de la matriz extracelular y células apoptóticas (131). Mediante la eliminación de los restos de degradación y detritus

celulares, los macrófagos son responsables de mantener la homeostasis y de controlar la intensidad de la respuesta inmune durante la implantación embrionaria en la decidua (43,131). Durante la invasión trofoblástica los macrófagos del endometrio van sufriendo una transición hacia un carácter más inmunosupresor (132). Esta conversión establece un equilibrio entre la población de macrófagos pro-inflamatorios (M1) y los inmunomoduladores (M2) que parece ser crucial para la tolerancia materno-embionaria (131). Una disrupción de esta transición de los macrófagos puede alterar el equilibrio durante la fase inflamatoria y promover defectos en el ambiente durante la gestación que finalmente, si existen complicaciones, puede derivar en pérdidas gestacionales tempranas como se ha visto en otros trabajos (46). La MAO-A es un agente responsable de la degradación de 5-HT, y parece su actividad parece correlacionarse con la transición del estado inflamatorio de los macrófagos, de tal forma que una mayor actividad de degradación de 5-HT, a través de MAO-A, se relaciona con un aumento de la tasa de transformación de los macrófagos hacia un estado de mayor potencial anti-inflamatorio (96). Este fenómeno es un indicador de que una mayor presencia de 5-HT induce la transición M1 a M2.

La 5-HT a través del receptor HT1A promueve la actividad fagocítica en los macrófagos (129), esto conlleva la posibilidad de que pueda reducir la respuesta inflamatoria local y por ello, este receptor pudiera intervenir en la transición de la población de macrófagos M1 a M2. El genotipo CC ejerce una supresión más efectiva de la expresión de HT1A disminuyendo la densidad de receptor y por lo tanto este genotipo hipotéticamente reduciría la sensibilidad a 5-HT, mediada por 5-HTR1A, en los macrófagos. Ante esta hipótesis y de acuerdo a nuestros resultados, una reducción en la respuesta del receptor podría dificultar la transición de la población de macrófagos M1 a M2 e interferir sobre la implantación embrionaria. El genotipo CC se asocia a menores tasas de implantación y una alta tasa de pérdida gestacional temprana en nuestra población de pacientes, pudiendo dar lugar a una menor sensibilidad de 5-HTR1A en macrófagos cuya transición M1 a M2 podría verse

comprometida y con ello también el mantenimiento del embarazo como se ha observado en otros estudios (46).

Por otro lado, la respuesta de 5-HTR1A ante el estímulo de 5-HT también puede activar la proliferación celular a e inhibir la apoptosis en linfocitos T y B cuya respuesta está asociada con un aumento de la translocación en el núcleo del Nuclear Factor-Kappa B (NF-kappaB) (133). Ya previamente se había descrito que el factor NF-kappaB pudiera secretar factores de regulación del estado inflamatorio en la decidua y promover la secreción de moléculas esenciales para la implantación y el progreso del embarazo (134). De forma análoga a lo que ocurriría hipotéticamente en macrófagos la variante genética C1019G (5-HTR1A) puede influir en la sensibilidad del receptor a la 5-HT y por ello también sobre la respuesta mediada por NF-kappaB.

Nuestros resultados sugieren que existen variantes que pueden alterar la homeostasis serotoninérgica e influir sobre el establecimiento y la progresión del embarazo temprano. Las alteraciones pueden deberse a dos mecanismos distintos; basándose uno en la baja disponibilidad de la 5-HT debido a la alta tasa de recaptación de la misma, a través de SERT cuando está presente el genotipo LL (5-HTTLPR) y a través del tráfico de vesículas mediado por VMAT1 cuando está presente el genotipo Ile/Ile (Thr136Ile). El otro mecanismo se debe a una menor sensibilidad de la respuesta mediada por 5-HT a través de macrófagos y de linfocitos en la decidua, donde el genotipo C/C (C1019) induciría una menor expresión del receptor 5-HT1A en membrana.

La presencia conjunta de los alelos L (5-HTTLPR SLC6A4), C (C1019G HT1A) e Ile (Ile136 VMAT1) en una misma paciente podría tener efectos negativos durante la obtención del embarazo. Hipotéticamente la combinación entre una situación de elevada internalización de la 5-HT libre y una menor densidad del receptor HT1A en la superficie celular, podría producirse una disrupción en el embarazo debido a una

disminución en la disposición de 5-HT, esencial en el desarrollo embrionario y el establecimiento del embarazo, y también a defectos en los procesos de prevención de la respuesta inmune descritos en macrófagos y linfocitos.

Aunque se necesitan nuevos trabajos que corroboren y aporten luz a estos datos, los resultados abren un nuevo campo de estudio que facilita de forma fácil el desarrollo de un ensayo clínico y permite abarcar nuevas hipótesis sobre el papel de 5-HT en la tolerancia materno-embionaria.

7. CONCLUSION

En el presente estudio hemos hallado cuatro polimorfismos cuyos genotipos se asocian, de forma variable, con los resultados de implantación embrionaria, aborto bioquímico y consecución de embarazo clínico.

Las variantes afectan a genes cuyos productos tienen presencia directa en el endometrio y la decidua (P53, SERT y VMAT1) e indirecta a través de células del sistema inmunitario (5-HTR1A).

Tres de estas variantes polimórficas están relacionadas con el sistema serotoninérgico Ins/Del 5-HTTLPR, Thr136Ile VMAT1 y C1019G HT1A. Dos de estas variantes afectan directamente a la internalización de 5-HT al interior celular, 5-HTTLPR y Thr136 VMAT1, y por lo tanto pueden condicionar la disponibilidad de la misma en el medio circundante.

La variante Pro72 de la proteína P53 en homocigosis influye negativamente sobre la implantación y también sobre la tasa de embarazo clínico tras los tratamientos de FIV. Esta observación confluye con los resultados ya reportados en los que la variante Pro72 tiene un impacto negativo sobre la tasa de éxito en los tratamientos independientemente de la edad.

El genotipo LL (5-HTTLPR) del gen SLC6A4 se asocia a menores tasas de embarazo y mayores tasas de aborto bioquímico tras los tratamientos de FIV.

La variante en homocigosis Ile136 del gen VMAT1 presenta menores tasas de implantación y mayores tasas de aborto bioquímico.

La combinación entre los genotipos LL 5-HTTLPR e Ile136/Ile136 VMAT1, relacionados con mayor intensidad de transporte de 5-HT al interior celular, están aumentados siete veces en la población de pacientes que no logró el embarazo con

respecto a la población de referencia y además no se halló la combinatoria de ambas mutaciones en nuestra población de pacientes embarazadas.

Los resultados con respecto a las variantes 5-HTTLPR e Thr136Ile VMAT1 apoyan la tesis de que un compromiso de la señal serotoninérgica sería determinante en el establecimiento y mantenimiento del embarazo en las etapas más tempranas.

La variante C1019 (HT1A) en homocigosis se asocia a menores tasas de implantación y mayores tasas de aborto bioquímico, pudiendo alterar el papel inmunomodulador del sistema serotoninérgico en la regulación de la tolerancia feto-materna durante la implantación embrionaria.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med* 1995;333(23):1517–21.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;92(5):1520–4.
3. Pérez Millán F, Monzó Miralles A, Castilla JA, Ballesteros Boluda A, Alonso Zafra J, Barrenetxea Ziarrustra G, et al. *Saber más sobre Fertilidad y Reproducción Asistida*. M-48980-20. Madrid: Sociedad Española de Fertilidad (SEF); 2011.
4. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319(4):189–94.
5. J SYS. Implantation failure, etiology, diagnosis and treatment. *Int J Infertil Fetal Med*. 2011;2(1):1–7.
6. Lessey BA, Palomino WA, Apparao KBC, Young SL, Lininger RA. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4 Suppl 1:S9.
7. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med* 2009;27(1):62–79.
8. Marshall JR, Hammond CB, Ross GT, Jacobson A, Rayford P, Odell WD. Plasma and urinary chorionic gonadotropin during early human pregnancy. *Obstet Gynecol* 1968;32(6):760–4.
9. Enders AC, Schlafke S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat* 1967;120(2):185–225.
10. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002;296(5576):2185–8.
11. Tabibzadeh S, Babaknia A. Molecular aspects of implantation: The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995;10(6):1579–602.
12. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HOD. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2003;7(2):151–61.
13. Akbas GE, Taylor HS. HOXC and HOXD gene expression in human endometrium: lack of redundancy with HOXA paralogs. *Biol Reprod* 2004;70(1):39–45.
14. Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin*

- Obstet Gynaecol 2003;17(2):289–307.
15. Wei Y, Schatten H, Sun Q-Y. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 2015;21(2):194–208.
 16. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998;78(11):1385–94.
 17. Leese HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 2012;143(4):417–27.
 18. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *J Reprod Immunol* ;55(1–2):85–100.
 19. Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, Recher G, Hupalowska A, Bolton V, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* 2016;
 20. te Velde E, Eijkemans R, Habbema H. Variation in couple fecundity and time to pregnancy, an essential concept in human reproduction. *Lancet* 2000;355(9219):1928–9.
 21. te Velde ER. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;8(2):141–54.
 22. Murphy SP, Sharma S. IL-10 and Pregnancy [Internet]. In: *Immunology of Pregnancy*. New York, NY: Springer New York; 2006. p. 26–36.
 23. Sharma S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. *Int J Dev Biol* 2014;58(2–3–4):219–29.
 24. Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferré F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 83(1):85–100.
 25. European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) C, Calhaz-Jorge C, de Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, Erb K, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2016;31(8):1638–52.
 26. van der Hoorn MLP, Lashley EELO, Bianchi DW, Claas FHJ, Schonkeren CMC, Scherjon SA. Clinical and immunologic aspects of egg donation pregnancies: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010;16(6):704–12.
 27. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):425–33.
 28. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1221(1):80–7.

29. Saito S, Nakabayashi Y, Nakashima A, Shima T, Yoshino O. A new era in reproductive medicine: consequences of third-party oocyte donation for maternal and fetal health. *Semin Immunopathol* 2016;38(6):687–97.
30. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(1):17–21.
31. Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I, et al. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003;79(6):1317–22.
32. RAZIEL A, SCHACHTER M, STRASSBURGER D, BERN O, RONEL R, FRIEDLER S, et al. Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil Steril* 2007;87(1):198–201.
33. Zhou L, Li R, Wang R, Huang H, Zhong K, Sherwin R, et al. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates. *Fertil Steril* 2008;89(5):1166–76.
34. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359(6390):76–9.
35. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:121–8.
36. Cheng S-B, Sharma S. Interleukin-10: a pleiotropic regulator in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2015;73(6):487–500.
37. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2014;124(5):1872–9.
38. Co EC, Gormley M, Kapidzic M, Rosen DB, Scott MA, Stolp HAR, et al. Maternal Decidual Macrophages Inhibit NK Cell Killing of Invasive Cytotrophoblasts During Human Pregnancy. *Biol Reprod* 2013;88(6):155–155.
39. Shima T, Sasaki Y, Itoh M, Nakashima A, Ishii N, Sugamura K, et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J Reprod Immunol* 2010;85(2):121–9.
40. Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM, et al. Human Decidual Tissue Contains Differentiated CD8+ Effector-Memory T Cells with Unique Properties. *J Immunol* 2010;185(7):4470–7.
41. Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial

- for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest* 2008;118(12):3954–65.
42. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:119.
 43. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and Apoptotic Cell Clearance During Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004;51(4):275–82.
 44. Svensson-Arvelund J, Ernerudh J. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. *Am J Reprod Immunol* 2015;74(2):100–9.
 45. Harris LK. Review: Trophoblast-Vascular Cell Interactions in Early Pregnancy: How to Remodel a Vessel. *Placenta* 2010;31:S93–8.
 46. Brown MB, von Chamier M, Allam AB, Reyes L. M1/M2 Macrophage Polarity in Normal and Complicated Pregnancy. *Front Immunol* 2014;5:606.
 47. Chen JR, Cheng J-G, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia Inhibitory Factor Can Substitute for Nidatory Estrogen and Is Essential to Inducing a Receptive Uterus for Implantation But Is Not Essential for Subsequent Embryogenesis¹. *Endocrinology* 2000;141(12):4365–72.
 48. Ni H, Ding N-Z, Harper MJK, Yang Z-M. Expression of leukemia inhibitory factor receptor and gp130 in mouse uterus during early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2002;63(2):143–50.
 49. Serafini P, Rocha AM, Osório CT, da Silva I, Motta EL, Baracat EC. Endometrial leukemia inhibitory factor as a predictor of pregnancy after in vitro fertilization. *Int J Gynecol Obstet* 2008;102(1):23–7.
 50. Serafini PC, Silva ID, Smith GD, Motta E LA, Rocha AM, Baracat EC. Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7(1):30.
 51. Suman P, Malhotra SS, Gupta SK. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *JAK-STAT* 2013;2(4):e25155.
 52. Gonzalez RR, Rueda BR, Ramos MP, Littell RD, Glasser S, Leavis PC. Leptin-Induced Increase in Leukemia Inhibitory Factor and Its Receptor by Human Endometrium Is Partially Mediated by Interleukin 1 Receptor Signaling. *Endocrinology* 2004;145(8):3850–7.
 53. Terakawa J, Hondo E, Sugiyama M, Wakitani S, Stewart CL, Kiso Y. Agrin pathway is controlled by leukemia inhibitory factor (LIF) in murine implantation. *J Reprod Dev* 2009;55(3):293–8.
 54. Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, et al. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol*

- Reprod 1999;60(2):355–64.
55. Schofield G, Kimber SJ. Leukocyte Subpopulations in the Uteri of Leukemia Inhibitory Factor Knockout Mice During Early Pregnancy. *Biol Reprod* 2004;72(4):872–8.
56. Feng Z, Zhang C, Kang H-J, Sun Y, Wang H, Naqvi A, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 2011;25(7):2245–55.
57. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007;450(7170):721–4.
58. Kang H-J, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(24):9761–6.
59. Park M, Kang K, Park S, Back K. Conversion of 5-hydroxytryptophan into serotonin by tryptophan decarboxylase in plants, *Escherichia coli*, and yeast. 2008.
60. Pelagio-Flores R, Ortíz-Castro R, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 2011;52(3):490–508.
61. The Human Protein Atlas. Available from: <http://www.proteinatlas.org/>
62. Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13 Suppl 2:15–30.
63. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009;60:355–66.
64. Baganz NL, Blakely RD. A Dialogue between the Immune System and Brain, Spoken in the Language of Serotonin. *ACS Chem Neurosci* 2013;4(1):48–63.
65. Csaba G, Kovács P, Pállinger E. Gender differences in the histamine and serotonin content of blood, peritoneal and thymic cells: a comparison with mast cells. *Cell Biol Int* 2003;27(4):387–9.
66. Idzko M, Panther E, Stratz C, Muller T, Bayer H, Zissel G, et al. The Serotonergic Receptors of Human Dendritic Cells: Identification and Coupling to Cytokine Release. *J Immunol* 2004;172(10):6011–9.
67. Stefulj J, Cicin-Sain L, Schauenstein K, Jernej B. Serotonin and immune response: effect of the amine on in vitro proliferation of rat lymphocytes. *Neuroimmunomodulation* 2001;9(2):103–8.
68. Betten A, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K. Serotonin protects NK cells against oxidatively induced functional inhibition and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2001;70(1):65–72.

69. Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol* 2010;161(1):19–27.
70. Campos-Lara G, Caracheo F, Valencia-Sánchez A, Ponce-Monter H. The sensitivity of rat uterus to serotonin in vitro is a late estrogenic response. *Arch Invest Med (Mex)* ;21(1):71–5.
71. Lang U, Prada J, Clark KE. Systemic and uterine vascular response to serotonin in third trimester pregnant ewes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;51(2):131–8.
72. Cordeaux Y, Pasupathy D, Bacon J, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Characterization of serotonin receptors in pregnant human myometrium. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328(3):682–91.
73. Côté F, Fligny C, Bayard E, Launay J-M, Gershon MD, Mallet J, et al. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(1):329–34.
74. Dubé F, Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci* 2007;81(25–26):1627–37.
75. Doherty LF, Kwon HE, Taylor HS. Regulation of tryptophan 2,3-dioxygenase by HOXA10 enhances embryo viability through serotonin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300(1):E86–93.
76. Basu B, Desai R, Balaji J, Chaerkady R, Sriram V, Maiti S, et al. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction* 2008;135(5):657–69.
77. Amireault P, Sibon D, Côté F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci* 2013;4(1):64–71.
78. Dubé F, Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci* 2007;81(25–26):1627–37.
79. Bottalico B. Plasma membrane and vesicular monoamine transporters in normal endometrium and early pregnancy decidua. *Mol Hum Reprod* 2003;9(7):389–94.
80. Benson G V, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996;122(9):2687–96.
81. Tatsumi K, Higuchi T, Fujiwara H, Nakayama T, Egawa H, Itoh K, et al. Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274(1):166–70.

82. Suzuki S, Toné S, Takikawa O, Kubo T, Kohno I, Minatogawa Y. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. *Biochem J* 2001;355(Pt 2):425–9.
83. Minatogawa Y, Suzuki S, Ando Y, Tone S, Takikawa O. Tryptophan pyrrole ring cleavage enzymes in placenta. *Adv Exp Med Biol* 2003;527:425–34.
84. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 2007;5(10):e254.
85. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491(7422):56–65.
86. Thomas D. Gene–environment-wide association studies: emerging approaches. *Nat Rev Genet* 2010;11(4):259–72.
87. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*;12(6):731–46.
88. Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB. p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2006;13(4):492–6.
89. Mössner R, Lesch K-P. Role of Serotonin in the Immune System and in Neuroimmune Interactions. *Brain Behav Immun* 1998;12(4):249–71.
90. Arreola R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez MA, Garcés-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G, et al. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. *J Immunol Res* 2015;2015:354957.
91. Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, et al. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 2003;23(25):8788–99.
92. Smith RM, Papp AC, Webb A, Ruble CL, Munsie LM, Nisenbaum LK, et al. Multiple regulatory variants modulate expression of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in human cortex. *Biol Psychiatry* 2013;73(6):546–54.
93. Mikulski Z, Zaslona Z, Cakarova L, Hartmann P, Wilhelm J, Tecott LH, et al. Serotonin activates murine alveolar macrophages through 5-HT_{2C} receptors. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 2010;299(2):L272–80.
94. Hill MJ, Reynolds GP. Functional consequences of two HTR_{2C} polymorphisms associated with antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics* 2011;12(5):727–34.
95. Krzywkowski K, Davies PA, Feinberg-Zadek PL, Brauner-Osborne H, Jensen AA. High-frequency

- HTR3B variant associated with major depression dramatically augments the signaling of the human 5-HT3AB receptor. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105(2):722–7.
96. Cathcart MK, Bhattacharjee A. Monoamine oxidase A (MAO-A): a signature marker of alternatively activated monocytes/macrophages. *Inflamm cell Signal* 2014;1(4).
97. Ryder TA, MacKenzie ML, Lewinsohn R, Pryse-Davies J, Sandler M. Amine oxidase histochemistry of the human uterus during the menstrual cycle. *Histochemistry* 1980;67(2):199–204.
98. Brunk I, Blex C, Rachakonda S, Holtje M, Winter S, Pahner I, et al. The First Luminal Domain of Vesicular Monoamine Transporters Mediates G-protein-dependent Regulation of Transmitter Uptake. *J Biol Chem* 2006;281(44):33373–85.
99. Khalifa AM, Watson-Siriboe A, Shukry SG, Chiu W-L, Nelson ME, Geng Y, et al. Thr136Ile polymorphism of human vesicular monoamine transporter-1 (SLC18A1 gene) influences its transport activity in vitro. *Neuro Endocrinol Lett* 2012;33(5):546–51.
100. ESHRE embryo grading 2011 istanbul conses.; Available from: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/26/6/1270.full.pdf>
101. Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simón C, Remohí J, et al. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):4399–404.
102. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, et al. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002;17(7):1852–5.
103. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007;67(1):73–80.
104. Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod* 2005;20(11):3008–11.
105. Carvalho CMB, Pena SDJ. Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics. *Genet. Mol. Res.* 2005;4(2):115–25.
106. Cervilla JA, Rivera M, Molina E, Torres-González F, Bellón JA, Moreno B, et al. The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: The PREDICT-gene study. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B(8):912–7.
107. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of

- association studies. *Bioinformatics* 2006;22(15):1928–9.
108. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;76(5):887–93.
109. Lledo B, Turienzo A, Ortiz JA, Morales R, Ten J, Llácer J, et al. Negative effect of P72 polymorphism on p53 gene in IVF outcome in patients with repeated implantation failure and pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(2):169–72.
110. Patounakis G, Treff N, Tao X, Lonczak A, Scott RT, Frattarelli JL. The p53 codon 72 single nucleotide polymorphism lacks a significant effect on implantation rate in fresh in vitro fertilization cycles: an analysis of 1,056 patients. *Fertil Steril* 2009;92(4):1290–6.
111. Chan Y, Zhu B, Jiang H, Zhang J, Luo Y, Tang W. Influence of TP53 Codon 72 Polymorphism Alone or in Combination with HDM2 SNP309 on Human Infertility and IVF Outcome. *PLoS One* 2016;11(11):e0167147.
112. Mariee N, Li TC, Laird SM. Expression of leukaemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells. *Hum Reprod* 2012;27(7):1946–54.
113. Rosario GX, Stewart CL. The Multifaceted Actions of Leukaemia Inhibitory Factor in Mediating Uterine Receptivity and Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016;75(3):246–55.
114. Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*;44(5):266–70.
115. Shi H, Tan S, Zhong H, Hu W, Levine A, Xiao C, et al. Winter temperature and UV are tightly linked to genetic changes in the p53 tumor suppressor pathway in Eastern Asia. *Am J Hum Genet* 2009;84(4):534–41.
116. Muñoz-Moran E, Dieguez-Lucena JL, Fernandez-Arcas N, Peran-Mesa S, Reyes-Engel A. Genetic selection and folate intake during pregnancy. *Lancet* 1998;352(9134):1120–1.
117. Acharya SB, Goswami NG, Debnath PK. Uterine and placental 5-HT profile in different gestational period of albino rats. *Indian J Exp Biol* 1989;27(6):505–9.
118. Il'ková G, Reháč P, Veselá J, Cikos S, Fabian D, Czikková S, et al. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 2004;12(3):205–13.
119. Henriquez S, Tapia A, Quezada M, Vargas M, Cardenas H, Rios M, et al. Deficient expression of monoamine oxidase A in the endometrium is associated with implantation failure in women participating as recipients in oocyte donation. *Mol Hum Reprod* 2006;12(12):749–54.

120. Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon R, Rouse B, Trefz F, et al. Maternal phenylketonuria: an international study. *Mol Genet Metab*;71(1–2):233–9.
121. Gambol PJ. Maternal phenylketonuria syndrome and case management implications. *J Pediatr Nurs* 2007;22(2):129–38.
122. Einarson A, Choi J, Einarson TR, Koren G. Rates of spontaneous and therapeutic abortions following use of antidepressants in pregnancy: results from a large prospective database. *J Obstet Gynaecol Can* 2009;31(5):452–6.
123. Nakhai-Pour HR, Broy P, Bérard A. Use of antidepressants during pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *CMAJ* 2010;182(10):1031–7.
124. Zhang H, Smith GN, Liu X, Holden JJA. Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiol Genomics* 2010;42(1):85–92.
125. Lohoff FW, Hodge R, Narasimhan S, Nall A, Ferraro TN, Mickey BJ, et al. Functional genetic variants in the vesicular monoamine transporter 1 modulate emotion processing. *Mol Psychiatry* 2014;19(1):129–39.
126. Zuo L, Wang K, Luo X. Use of diplotypes - matched haplotype pairs from homologous chromosomes - in gene-disease association studies. *Shanghai Arch psychiatry* 2014;26(3):165–70.
127. Li Q, Wichems C, Heils A, Lesch K-P, Murphy DL. Reduction in the Density and Expression, But Not G-Protein Coupling, of Serotonin Receptors (5-HT1A) in 5-HT Transporter Knock-Out Mice: Gender and Brain Region Differences. *J Neurosci* 2000;20(21):7888–95.
128. Iceta R, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. Expression of 5-HT1A and 5-HT7 receptors in Caco-2 cells and their role in the regulation of serotonin transporter activity. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(1):157–64.
129. Freire-Garabal M, Núñez MJ, Balboa J, López-Delgado P, Gallego R, García-Caballero T, et al. Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol* 2003;139(2):457–63.
130. Gardner L, Moffett A. Dendritic Cells in the Human Decidua. *Biol Reprod* 2003;69(4):1438–46.
131. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. *J Immunol* 2011;186(4):2633–42.
132. Jaiswal MK, Mallers TM, Larsen B, Kwak-Kim J, Chaouat G, Gilman-Sachs A, et al. V-ATPase upregulation during early pregnancy: a possible link to establishment of an inflammatory

response during preimplantation period of pregnancy. *Reproduction* 2012;143(5):713–25.

133. Abdouh M, Albert PR, Drobetsky E, Filep JG, Kouassi E. 5-HT1A-mediated promotion of mitogen-activated T and B cell survival and proliferation is associated with increased translocation of NF- κ B to the nucleus. *Brain Behav Immun* 2004;18(1):24–34.
134. King AE, Critchley HO, Kelly RW. The NF-kappaB pathway in human endometrium and first trimester decidua. *Mol Hum Reprod* 2001;7(2):175–83.

