



Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
UNIVERSITAT DE VALENCIA

Solicitud de aprobación de tesis Doctoral

**La adición de LH a la estimulación ovárica no produce más
maduración endometrial prematura ni diferente patrón de
expresión génica endometrial que la estimulación con solo FSH.**

Un estudio comparativo en donantes de ovocitos.

Tesis doctoral presentada por el Licenciado

ELKIN ALBEIRO MUÑOZ MUÑOZ

Para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Director de tesis:

Dr. JOSE REMOHÍ GIMENEZ

VALENCIA 2015

AGRADECIMIENTOS

- Al Prof. Antonio Pellicer Martínez por haber sido ejemplo como persona y como profesional. Por haber estado conmigo incluso en los momentos difíciles y permitirme trabajar a su lado.
- A mis compañeras de IVI Vigo, Berta Martínez por coordinar la toma y procesamiento de las muestras, así como la recolección de los datos del presente trabajo y a Susana Portela por haber ayudado a conseguir pacientes.
- A José A. Martínez Conejero, por ayudarme en la interpretación de los resultados y corregir la presente tesis.
- Al Prof. Carlos Simón por su orientación en la interpretación de los resultados de este trabajo.
- A Nicolás Garrido, un amigo que además me ha ayudado no solo en esta tesis.
- A Pepa Berto por ayudarme con los trámites administrativos y su siempre cordial y agradable disposición.
- A Iria Fernández y María Pérez, compañeras de IVI Vigo que me ayudaron en la redacción de la tesis.
- A mis padres que me apoyaron cuando les dije que haría el doctorado en España y porque nunca dudaron que lo lograría, además de haber estado siempre conmigo a pesar de la distancia.
- A Mayte, la mujer de mi vida y mi mejor apoyo. Que sirva de homenaje a su amor y su bondad, a su paciencia y su honestidad y a su sacrificio para que yo pudiera hacer esta tesis.
- A mis hijos David y Sofía por el tiempo que les robó este trabajo y ser el mayor motivo de felicidad en mi vida.
- Finalmente al Prof. José Remohí Giménez, a quien debo gratitud y respeto por su apuesta profesional y personal por mí. Por haberme ofrecido su amistad.

A Leo y Aleja, por haberme dado la vida
A Mayte, David y Sofía por acompañarme a recorrerla...

I. Introducción general	11
<hr/>	
1. El endometrio en reproducción asistida	13
a. Histología del endometrio	14
i. Epitelio luminal	15
ii. Epitelio glandular	15
iii. Estroma	17
iv. Vascularización	18
v. Células inmunológicas	18
vi. Cambios histológicos asociados a la fase proliferativa	19
vii. Cambios histológicos asociados a la fase secretora	20
b. Fisiología del ciclo endometrial	21
i. Ciclo endometrial	21
ii. Receptores esteroideos	24
c. Implantación embrionaria	25
i. El embrión como inductor de implantación	27
ii. Moléculas de adhesión	27
iii. Ventana de implantación	28
2. Evaluación del endometrio	29
a. Biopsia de endometrio	29
i. Análisis histopatológico	29
ii. Patrones de expresión génica- microarrays	32
1. Genes regulados por estrógenos	33
2. Genes regulados por progesterona	38
b. Ecografía	49
3. Endometrio durante la estimulación ovárica	49
a. Maduración endometrial prematura	50

INDICE

4. Estimulación ovárica	53
a. Antagonistas de la GnRH.....	53
b. Utilidad de la LH	54
c. Luteinización prematura	55
II. Justificación	57
<hr/>	
III. Objetivos	61
<hr/>	
IV Material y métodos	65
<hr/>	
1. Diseño del estudio	67
2. Selección de la población	67
a. Criterios de inclusión	67
b. Criterios de exclusión	68
3. Protocolos de estimulación	69
4. Intervenciones	70
a. Medición hormonal	70
b. Biopsias de endometrio	71
i. Análisis histopatológico	71
ii. Estudio de microarrays.....	72
1. Extracción del ARN total.....	72
2. Análisis de la cantidad e integridad del ARN.....	73
3. Hibridación con microarrays.....	74
iii. Análisis de datos	75
1. Obtención de los datos.....	75
2. Pre-procesado y normalización de la matriz.....	75
3. Análisis jerárquico.....	76
4. Análisis funcional de los resultados	77

5. Análisis estadístico	77
V. Resultados	79
<hr/>	
VI. Discusión	97
<hr/>	
VII. Conclusiones	121
<hr/>	
VIII. Bibliografía	125
<hr/>	
IX. Anexos	157
<hr/>	

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. El endometrio en reproducción asistida

El endometrio es un elemento fundamental en el proceso reproductivo porque debe ser receptivo al embrión. Esto es absolutamente indispensable para la consecución y evolución normal del embarazo, ya sea natural o conseguido mediante técnicas de reproducción asistida (TRA). Aunque en condiciones patológicas se puede desarrollar una gestación ectópica sin contacto con el endometrio que evolucione hasta bien avanzado el embarazo, esto pasa a ser solo algo anecdótico y es el endometrio el tejido fisiológico destinado a albergar un embarazo normal.

Desde siempre, el endometrio ha recibido mucha menos atención que el ovario en el diagnóstico y tratamiento de las parejas con problemas de esterilidad. Sin embargo, se sabe que la mala receptividad endometrial es la base de muchos fracasos a la hora de conseguir la gestación.

El endometrio sufre cambios morfológicos y funcionales necesarios para alcanzar el estado receptivo que permite la implantación del embrión, favorecer la formación de la placenta y el desarrollo embrionario y fetal hasta la llegada de la gestación a término con el nacimiento de un recién nacido vivo sano.

Durante la introducción incluiremos la descripción histológica, la fisiología del ciclo endometrial y la fisiología de la implantación así como los factores implicados en este proceso. A continuación, describiremos la forma de evaluación del endometrio incluyendo la tecnología de microarrays y finalmente el efecto que tiene la estimulación ovárica sobre el endometrio con especial énfasis en la actividad de la hormona luteinizante (LH).

I. 1. a. Histología del endometrio.

El endometrio es la mucosa que tapiza la cavidad uterina. Se considera un órgano formado por una multicapa celular que consta de una capa funcional y una capa basal, situadas sobre el miometrio. Sufre cambios periódicos en respuesta a la variación de los niveles hormonales durante el ciclo menstrual, propio de humanos y primates superiores (Simon C. 2009).

Los cambios morfológicos y funcionales son desencadenados por el efecto de las hormonas esteroideas ováricas: estrógeno y progesterona, que por vía sanguínea viajan hasta el endometrio (Paulson R., 2011), donde se unen específicamente a sus respectivos receptores de alta afinidad, desencadenando la transcripción de factores y moduladores de un gran número y variedad de genes (Cooke P.S., 1997), que conllevan a la remodelación morfológica endometrial. Los estrógenos son las hormonas dominantes durante la fase proliferativa (Hoozemans D.A., 2004), siendo la progesterona la hormona predominante durante la fase secretora, en la que ocurre la transformación y decidualización del estroma (Strowitzki T., 2006).

El endometrio está formado por tejido epitelial y estroma, pudiéndose hacer una subdivisión en una capa funcional o *funcionalis* y una capa basal o *basalis*. La capa funcional es la capa luminal que recubre la cavidad endometrial y está formada por invaginaciones glandulares. La capa basal está formada por pliegues glandulares más profundos, que se extienden hasta el límite con el miometrio.

La capa funcional sufre variaciones en su grosor y morfología que responden a la acción de las hormonas esteroideas ováricas durante el ciclo menstrual, separándose de la capa basal durante la menstruación. Sin

embargo, el grosor de la capa basal permanece invariable durante todo el ciclo, con un espesor medio de 0.5-1mm (Simon C., 2009). El endometrio está compuesto por diferentes tipos celulares, incluyendo células epiteliales luminales y glandulares, células fibroblásticas estromales, células inmunocompetentes y células sanguíneas. El número de células, actividad, morfología y función varía a lo largo del ciclo menstrual. (Driedrich K., 2007).

I.1.a.i. Epitelio luminal

El epitelio luminal está compuesto por células no ciliadas y ciliadas, cuyas poblaciones aumentan durante la fase proliferativa a una proporción de 30:1 y 15:1 respectivamente, desde el inicio a la fase proliferativa tardía, experimentando un descenso en ambas poblaciones celulares a partir del día 20 del ciclo menstrual (Ferenczy A., 1977). La morfología de la membrana celular de las células no ciliadas se ve alterada durante la fase secretora, produciéndose protrusiones apicales.

I.1.a.ii. Epitelio glandular

En la fase proliferativa bajo acción de los estrógenos, las células glandulares proliferan y las células de la cara luminal se recubren de microvellosidades, cuyo número aumenta a medida que avanza el ciclo menstrual. Las células aparecen con uniones intercelulares tipo desmosomas, uniones estrechas que permiten aislar el lumen glandular del ambiente interno.

El núcleo de las células que no están en división celular activa, se presenta redondo, grande y ocupando la porción basal de la célula, que es rica

en polisomas que pueden estar libres o asociados al retículo endoplasmático rugoso (RER). Las mitocondrias son abundantes y se mantienen próximas entre sí y el aparato de Golgi no está muy desarrollado.

A medida que avanza la fase proliferativa, las células se agrandan, manteniendo las microvellosidades en la cara apical y aparecen ondulaciones en las membranas laterales con la formación de espacios entre células adyacentes. Al final de esta fase, se aprecia un epitelio celular pseudoestratificado con una maquinaria secretora bien desarrollada (aparato de Golgi, retículo endoplasmático liso (REL) además de numerosas vesículas secretoras) y núcleo celular de gran tamaño. Cuando se acerca el momento de la ovulación, se produce un incremento en las interdigitaciones en las membranas celulares laterales, junto a un aumento en la población mitocondrial y un descenso del RER en el citoplasma basal.

Con el inicio de la fase secretora las células epiteliales glandulares comienzan el proceso secretor de productos complejos, parecen estar implicados en el mantenimiento del trofoblasto. En el interior celular se manifiestan fenómenos característicos asociados con esta transformación como son la acumulación de material glucogénico en la región citoplasmática subnuclear, mitocondrias de gran tamaño y formación del sistema de canales nucleares. La secreción glandular se inicia a medida que las células se llenan con productos de secreción.

Con el avance de la fase secretora el volumen nuclear disminuye. El contenido en glucógeno es máximo en el día LH+4 (cuatro días después del pico de LH), provocando el incremento en el volumen celular, que es máximo en el día LH+6. El inicio del cese de la actividad secretora se observa al día LH+8, observándose la desaparición del sistema de canales nucleares,

entre otros. Aumentan el número de interdigitaciones en las membranas celulares laterales. Al final de esta fase, el núcleo celular está hundido, el RER dilatado, se observan numerosas mitocondrias de pequeño tamaño y pocos acúmulos glucogénicos en el contenido citoplasmático.

I.1.a.iii. Estroma

El estroma endometrial es un tejido conectivo compuesto por células y una compleja matriz extracelular (MEC). Las células estromales, también conocidas como células reticulares, son predominantemente fibroblastos que se encargan de la síntesis de la mayor parte de los componentes de la matriz extracelular (Wynn RM., 1989). También se encuentran linfocitos *natural killer* uterinos (NKu), macrófagos y otros tipos de células residentes y migratorias. En el transcurso del ciclo menstrual, los fibroblastos estromales sufren una serie de modificaciones morfológicas en respuesta a las variaciones de estrógenos y progesterona. En el momento cercano a la ovulación, aparecen los primeros signos de remodelación de la MEC por parte de los fibroblastos. Entre los días LH+2 y LH+8 el diámetro nuclear aumenta en torno al 20% su tamaño original y se produce un aumento en la acumulación de glucógeno en el citoplasma. El aumento del volumen nuclear se correlaciona con el incremento en la actividad transcripcional. A partir del día LH+8 la densidad estromal comienza a decrecer, hecho que puede explicarse por el continuo crecimiento de las células glandulares llenas de productos secretores, que forzaría a los fibroblastos a retraerse. En este momento se aprecia el máximo edema estromal, que puede deberse a la reabsorción de agua desde el lumen glandular.

I.1.a.iv. Vascula rización del endometrio

Tanto la capa basal como la funcional están intensamente vascularizadas. La vascularización de la capa basal está compuesta por arteriolas rectas, que no se descaman durante la menstruación, y por arteriolas espirales ramificadas en la capa funcional. Estas últimas se ven modificadas a lo largo del ciclo menstrual por los cambios hormonales. La complicada red vascular endometrial comienza en el miometrio, de donde parte la arteria uterina que traspasa el límite miometrio-endometrio (Simón C., 2009).

Durante el ciclo menstrual y bajo el efecto hormonal de estrógenos y progesterona, se produce regresión y angiogénesis del entramado vascular endometrial. Al inicio del ciclo, con la menstruación, comienza a regenerarse el entramado vascular a partir de la capa basal, produciéndose un aumento en el grosor de la capa funcional y crecimiento vascular a lo largo de las fases proliferativa y secretora (Rogers PA., 1996). Existen muchos factores implicados en la regulación de la angiogénesis endometrial, siendo VEGF el más importante (Print C., 2004).

La angiogénesis en el endometrio no se produce por la vía clásica, sino mediante la adición de tabiques celulares dentro de vasos existentes (intususpección) y la elongación de éstos; de modo que el flujo sanguíneo no se interrumpe en ningún momento (Gambino L.S., 2002).

I.1.a.v. Células inmunológicas endometriales.

Las células inmunocompetentes son principalmente linfocitos T, linfocitos NKu, macrófagos y en menor medida linfocitos B. La población linfocitaria fluctúa cíclicamente y es máxima durante la fase secretora tardía

y premenstrual, siendo predominantes las NKu (fenotipo CD56+, CD16- y CD3-) que se sitúan próximas a las glándulas endometriales y a las arteriolas espirales (King A., 2000).

I.1.a.vi. Cambios histológicos asociados a la fase proliferativa.

La fase proliferativa se caracteriza por la reepitelización postmenstrual y el crecimiento de los elementos epiteliales y del estroma a partir de la capa basal, donde podría residir una población de células madre endometriales (Kato K., 2007) (Gargett C.E., 2007). El resultado final es el engrosamiento endometrial de 1 a 4 mm de espesor en el día de la ovulación. Los estrógenos procedentes del ovario son las hormonas dominantes, que a su vez son dependientes de la hormona folículo estimulante (FSH) secretada por la adenohipófisis. La duración de la fase proliferativa puede extenderse durante 9-23 días, y su duración se relaciona entre otros factores con la edad de la mujer (Lenton E.A., 1984).

La respuesta proliferativa a las hormonas en el epitelio luminal y glandular se prolonga hasta el día LH+3 debido a los altos niveles circulatorios de estradiol. A partir del 5º día del ciclo menstrual comienza a detectarse la actividad mitótica epitelial. La fase proliferativa temprana se caracteriza por un endometrio de poco grosor, con glándulas estrechas, cortas, rectas y parcialmente colapsadas con núcleos redondos localizados en la zona basal de las células. El estroma está formado por fibroblastos alargados con núcleo de gran tamaño. Hacia la mitad de la fase (días 8-10 del ciclo menstrual) crece la población de células glandulares, que se hacen alargadas y tortuosas, mostrando inicio de pseudoestratificación. En la fase

proliferativa tardía el lumen glandular es máximo. Las células glandulares son altas y columnares y el lumen estromal comienza a aumentar de volumen. A medida que aumentan los niveles de progesterona, la actividad proliferativa en el epitelio va disminuyendo hasta hacerse indetectable, tanto en el epitelio glandular y en el estroma, pero la actividad mitótica se mantiene a niveles mínimos solamente en la superficie epitelial y en las células predeciduales.

Otros factores de crecimiento son candidatos para el mantenimiento de la fase proliferativa. El IGF (factor de crecimiento similar a insulina), el EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el TGF β (Factor de crecimiento transformante) son factores predominantes en el endometrio proliferativo.

I.1.a.vii. Cambios histológicos asociados a la fase secretora.

En el ciclo menstrual de humanos, a lo largo de la fase secretora se inhibe la proliferación de las células endometriales que comienzan a sufrir un proceso de diferenciación, con la finalidad de proporcionar un ambiente adecuado para la implantación embrionaria. Estos cambios son dirigidos directa e indirectamente mediante la acción de la progesterona.

El inicio de la fase secretora se caracteriza por el desarrollo de vacuolas subnucleares en las células epiteliales, resultando en la alteración de la localización intracelular del núcleo, que pasa a tener una situación más central en la célula. Debido a la presencia de vacuolas, las células adquieren una apariencia más alargada. El contenido intracelular va disminuyendo a medida que aumenta la secreción glandular.

Hacia la mitad de la ventana de implantación, se aprecian cambios estructurales en la membrana citoplasmática y el citoesqueleto de las

células epiteliales no ciliadas. Se forman unas estructuras en la cara apical denominadas pinópodos, que mediante microscopía electrónica se observan a modo de proyecciones ectoplásmicas, que comienzan a formarse desde las 6-8 horas post-ovulación y estando plenamente desarrollados durante menos de 48 horas, limitando de este modo el periodo de implantación embrionaria (Nikas G., 1999). Los pinópodos están implicados en el proceso de adhesión del embrión (Bentin-Ley U., 1999) y son un marcador morfológico del período de receptividad uterina (Nikas G., 2003). Se cree que también pueden colaborar en la implantación embrionaria al absorber material desde el lumen uterino.

I.1.b Fisiología del endometrio.

I.1.b.i Ciclo endometrial

El ciclo comienza durante el **periodo menstrual** con la descamación de los dos tercios superiores del endometrio, ya que el tercio basal no responde a los esteroides ováricos y queda retenido cuando concluye la menstruación.

Tras este comienza la **fase proliferativa**, con un crecimiento rápido de glándulas y estroma desde el tercio basal, estimulado por los estrógenos. Estas glándulas son estructuras tubulares rectas revestidas por células cilíndricas regulares, altas y pseudoestratificadas. Abundan las mitosis glandulares que indican proliferación y no existen signos de secreción mucosa o de vacuolización. Las mitosis glandulares comienzan ya durante la menstruación, ya que ambos mecanismos, reparación y degradación, progresan de modo simultáneo. El estroma endometrial está compuesto por

células fusiformes muy compactadas que tienen escaso citoplasma pero abundante actividad mitótica.

Durante la **ovulación** el endometrio disminuye la velocidad de su crecimiento y la actividad mitótica cede unos días después de la ovulación. A las 36-48 horas tras la misma se produce la vacuolización basal, formándose vacuolas secretoras por debajo de los núcleos del epitelio glandular.

En la **fase secretora**, cuya actividad es más marcada durante la tercera semana del ciclo menstrual, cuando las vacuolas basales empujan progresivamente más allá de los núcleos. En la cuarta semana las secreciones son eliminadas a las luces glandulares. La secreción máxima ocurre entre los días 18-24 del ciclo, y es en este momento, cuando las glándulas se dilatan. En este momento las glándulas son tortuosas, con un aspecto aserrado o “en dientes de sierra” cuando son cortadas por su eje longitudinal. En los estadios más avanzados la secreción se vuelve espesa.

Es importante en esta fase secretora tardía valorar el estroma endometrial. Se produce un desarrollo prominente de las arteriolas espirales en los días 21-22. El edema entre las células del estroma es constante durante toda la fase secretora. A partir de los días 23-24 del ciclo las células estromales se hipertrofian con acumulación de eosinófilos citoplasmáticos. Es la **reacción predecidual** que se extiende desde el estrato funcional (que responde a estímulos hormonales) de los días 24-28 del ciclo y se manifiesta primero alrededor de las arteriolas y progresa hasta inmediatamente antes de la menstruación. Se forma una capa compacta superficial. También se acompaña de neutrófilos y linfocitos ocasionales, la inflamación con neutrófilos comienza unos dos días antes del comienzo del flujo. Existe un diálogo epitelio estromal que está mediado en parte por el HAND2; un factor de transcripción regulado por la progesterona y cuya

presencia es esencial para la implantación (Li Q., 2011).

En caso de no producirse gestación el estrato funcional se desintegra y comienza la pérdida de sangre estromal que marca el **inicio de la menstruación**.

En cada ciclo menstrual en el endometrio se produce proliferación celular, diferenciación y apoptosis, que ocurren simultáneamente a los cambios que tienen lugar en la composición de la MEC y la circulación de leucocitos (Diedrich K., 2007). En las mujeres se produce la eliminación de la totalidad de la capa funcional en cada menstruación y la posterior regeneración del tejido a partir de la capa basal. La finalidad de esta remodelación tisular es la de preparar el endometrio para proporcionar un ambiente adecuado para la implantación embrionaria, que tiene lugar durante un periodo de tiempo limitado y específico denominado ventana de implantación (Dominguez F., 2003).

Desde el inicio a la mitad de la fase secretora se produce un incremento en la actividad del epitelio glandular. Hacia el final de la fase secretora, las glándulas mantienen poca actividad secretora y experimentan regresión e involución glandular. A partir del día 22, se inicia el proceso de decidualización del endometrio, incluyendo la diferenciación de células estromales que aumentan de tamaño y adquieren una morfología más redondeada, con núcleo vesicular bien definido, aparato de Golgi desarrollado y formación del Retículo Endoplásmico. El proceso de decidualización también incluye cambios en la vascularización endometrial, MEC y en la angiogénesis, con la infiltración de leucocitos específicos, principalmente monocitos y células NKu (King A., 2000). Los fibroblastos del estroma endometrial son los encargados de la remodelación de la MEC. La MEC está compuesta principalmente por moléculas complejas glicosidadas como laminina, heparina, proteoglicanos

sulfatados y colágeno tipo IV (Ferenczy A., 1995). Tras la remodelación estructural que implicó una modificación en la morfología del fibroblasto, pasando de ser pequeño y redondeado a poligonal y de gran tamaño, con un núcleo de gran tamaño y aumento en el desarrollo del aparato de Golgi y retículo endoplasmático; las células estromales comienzan a sintetizar y secretar prolactina (PRL) y la proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1), que se caracterizan como los marcadores de la decidualización (Wahlstrom T., 1984). Existen un grupo de nuevos marcadores que regulan la decidualización que además parecen indispensables para la implantación e incluyen Bmp2, Wnt5 o el PTHR1 (Franco H., 2010)

I.1.b.ii. Receptores endometriales.

Estrógeno y progesterona son los moduladores hormonales dominantes del desarrollo endometrial. Tanto la capa funcional como la basal expresan receptores para estrógenos y progesterona. La respuesta es dependiente de: la cantidad de receptores expresados, la concentración de ambas hormonas y de su metabolismo (por ejemplo, la activación de enzimas que convierten estradiol en estrona) (Diedrich K., 2007). También influye en la actividad hormonal el efecto de co-activadores y supresores (Punyadeera C., 2003).

En el endometrio se expresan los receptores de estrógeno (RE) tipo α (RE α) y tipo β (RE β), siendo RE α el tipo de receptor dominante. RE α está presente en las glándulas epiteliales y en el estroma de la capa funcional. En humanos su presencia es máxima durante la fase proliferativa y disminuye durante la fase secretora del ciclo (Kyrou D., 2009). El receptor

epitelial RE β también disminuye durante la fase secretora, no detectándose en el estroma, pero es el único subtipo presente en el endotelio vascular endometrial. La mayor presencia de los RE durante la fase proliferativa, se explica debido a que los estrógenos inducen la proliferación celular y la angiogénesis para asegurar la nutrición del tejido en desarrollo (Critchley H., 2001), a la vez que inhibe la acción de factores apoptóticos (Strowitzki T., 2006). Simultáneamente ejerce un efecto indirecto, estimulando la expresión de otros receptores esteroideos como el receptor de andrógenos (AR) en el estroma (Slayden O., 2004) y el receptor de progesterona (RP), que es crucial para la acción de esta durante la fase secretora. (Strowitzki T., 2006).

Los receptores para progesterona RP-A y RP-B se coexpresan en células diana endometriales y están también presentes en células endoteliales. A pesar de que el RP-A es la isoforma predominante durante todo el ciclo, sólo RP-B permanece en las células del epitelio glandular más allá de la mitad de la fase secretora (Mote P., 2000), sugiriendo que quizás este sea el tipo de RP más importante para desencadenar los cambios que tienen lugar en las glándulas endometriales durante esta fase del ciclo. Mediante sus receptores, la progesterona disminuye la proliferación e induce la diferenciación tisular, característica en el endometrio de humanos, independientemente de si se produce embarazo o no.

I.1.c. Implantación embrionaria

En la regulación de este proceso responde a los esteroides ováricos,

al propio embrión y a algunos mecanismos autocrinos. Se define como receptividad endometrial la habilidad del endometrio para aceptar y acomodar un embrión, dando como resultado un embarazo evolutivo.

En este proceso, el ovocito fertilizado reside en la ampolla tubárica durante aproximadamente 72 horas, después de las cuales, la mórula es transportada hacia istmo uterino bajo la influencia de los esteroides ováricos, el sistema autónomo y el propio desarrollo del embrión. El blastocisto empieza a expresar y transcribir aproximadamente 500 genes previamente inactivos. Este blastocisto “activado” eclosiona liberándose de la zona pelúcida aproximadamente 72 horas después de haber entrado en la cavidad y lo consigue gracias a la presión hidrostática y a enzimas proteolíticas liberadas desde el blastocisto (por ejemplo: estripsina) y del endometrio (por ejemplo: triptasa) que lisan la zona pelúcida (O`Sullivan C., 2004)

La implantación comienza 6-7 días después de la fecundación y ha sido clasificada en tres estadios: aposición, adhesión y penetración (Enders A.C., 1967). En el momento de la aposición, el polo embrionario del blastocisto es orientado hacia el endometrio. El endometrio bajo influencia de la progesterona forma proyecciones de la membrana epitelial apical llamadas pinópodos. Estos se adhieren a las células del trofoectodermo a través de moléculas de adhesión como las E-Caderinas. Una vez completada la adhesión del blastocisto al endometrio, comienza la invasión y el trofoblasto penetra en el epitelio. Para el décimo día post fecundación, el blastocisto es totalmente embebido en el estroma subepitelial y el epitelio uterino crece para cubrir el sitio de implantación (Benirschke K., 1991). Finalmente, se produce la decidualización del endometrio, que es un proceso de diferenciación bioquímica y morfológica que favorece la invasión del tercio interno del miometrio y de

la vascularización materna por el trofoblasto. Actualmente es controvertido el papel de la inflamación en la respuesta del endometrio durante la preparación para la implantación. Parece que la inflamación controlada es necesaria para una correcta implantación y una desregulación de ese proceso puede llevar a un útero no receptivo (Lédée N., 2011).

I.1.c.i El embrión como inductor de la implantación.

El embrión tiene la capacidad de inducir receptores CXCR1, CCR2, CCR5 y CXCR4 para las quimoquinas, unos polipéptidos con capacidad de atracción para linfocitos los cuales liberan proteasas y otros mediadores que facilitan la invasión embrionaria.

La leptina es un polipéptido de conocida importancia en la obesidad, sin embargo recientemente se ha demostrado que la leptina y la forma larga de su receptor están regulados en las células endometriales por el embrión humano en la fase de aposición.

El blastocisto entra en la cavidad girando libremente y guiado por las señales de la L-selectina. Una Mucina, el MUC-1 repele el blastocisto y previene su adhesión en áreas con pobres cambios implantatorios (Surveyor G.A., 1995). El papel de las activinas en la implantación podría explicar el fallo que se origina en el caso del embarazo ectópico (Refaat B., 2014)

I.1.c.ii Moléculas de adhesión

Hay muchas sustancias que han sido estudiadas como mediadoras del proceso de implantación. Un conjunto de ellas se les ha llamado moléculas

de adhesión celular e incluyen: las integrinas, cadherinas, selectinas e inmunoglobulinas.

Otras moléculas de adhesión (integrinas y cadherinas) unen firmemente el blastocisto a los pinópodos para asegurar así la implantación. Dentro de las integrinas la más importante es la alfa V Beta 3. Su expresión aberrante ha sido detectada en pacientes con esterilidad de origen desconocido, pacientes con endometriosis, hidrosalpinx u ovario poliquístico.

Otros marcadores moleculares de la implantación extensamente estudiados incluyen las citoquinas, en particular el LIF, la IL-6 y la IL-1, además de las prostaglandinas.

I.1.c.iii. Ventana de implantación

El periodo de máxima receptividad se denomina ventana de implantación y sucede entre los días 7 a 10 después del pico de LH. Durante este período ocurre la invasión del blastocisto en el endometrio. Es el periodo de mayor receptividad endometrial, y comprende los días 4-5 postovulatorios (días 19-20 del ciclo menstrual), cuando los niveles de progesterona alcanzan su máxima concentración (Hodgen G.D., 1983). (Laufer N., 1982) (Navot D., 1991).

La influencia que las distintas hormonas tienen sobre esta receptividad endometrial, en especial la progesterona, transformando el endometrio proliferativo, gracias a los estrógenos, en secretor, fue puesta de manifiesto en 1929 cuando se asociaron por primera vez los bajos niveles de progesterona y los abortos (Corner G.W., 2005), pasando a denominarse fase lútea insuficiente en 1949 (Jones G.S., 1949). Su evaluación es

actualmente realizada mediante la expresión génica del epitelio endometrial. La posibilidad que esta ventana se desplace unos días hace que se hable de una ventana adelantada cuando comienza antes del 5to día de exposición a la progesterona (LH/hCG +7) o retrasada cuando sucede después (Ruiz-Alonso M., 2013)

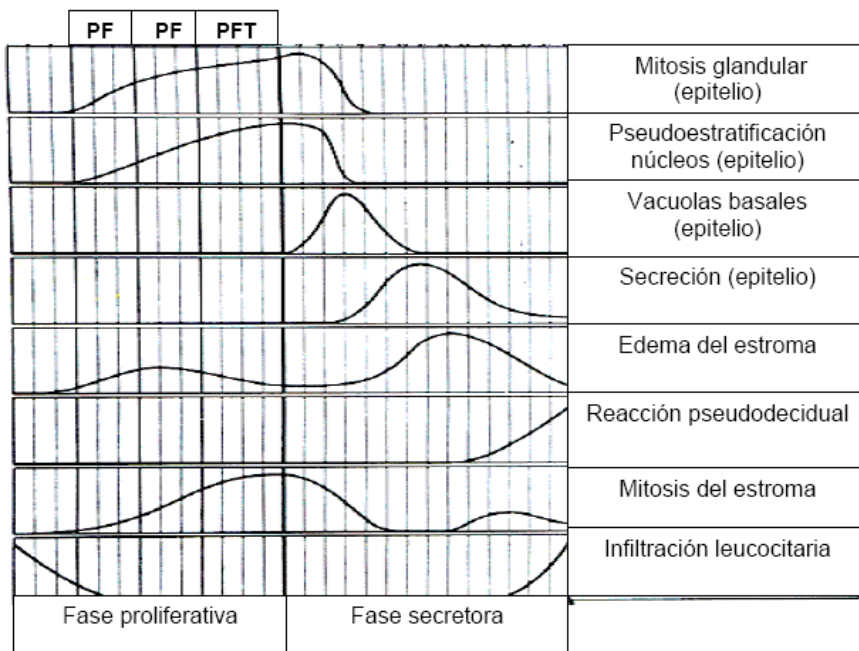
I. 2. Evaluación del endometrio

I.2.a. Biopsia de endometrio.

I.2.a.i. Análisis histopatológico.

Además de los estudios hormonales y ecográficos, la mayoría de las investigaciones que estudiaban el endometrio hasta 1990 se basaban en la biopsia de endometrio, datando el mismo y estudiando su morfología en las distintas fases del ciclo. Esto es importante a nivel clínico porque permite valorar el estado hormonal, verificar la ovulación e incluso estudiar algunas causas de infertilidad. A través de un cuidadoso estudio de muestras de biopsias endometriales en las distintas fases del ciclo, Noyes et al. describieron las características del endometrio secretor y su respuesta a la progesterona. Estos criterios se describen en la siguiente gráfica (Noyes R.W., 1950).

Figura 1. Criterios histológicos, según Noyes, 1950.



Desde un punto de vista histológico, en la biopsia endometrial, podemos valorar la ovulación; para ello es necesario un endometrio proliferado, por lo tanto, no es posible determinarla en los últimos días de la menstruación cuando solo está presente el estrato basal, sino en la fase secretora, observando la vacuolización basal de las células glandulares, agotamiento secretor o cambios predeciduales. También podemos valorar problemas funcionales, como la fase lútea insuficiente, que se caracteriza por una función inadecuada del cuerpo lúteo con una baja producción de progesterona. En este caso en la biopsia endometrial realizada postovulatoria se apreciará un endometrio secretor que va por detrás en sus características secretoras respecto a la fecha esperada (Casper R., 2011) (Lessey B., 2011).

Figura 2. Descripción histológica endometrial durante el ciclo menstrual.

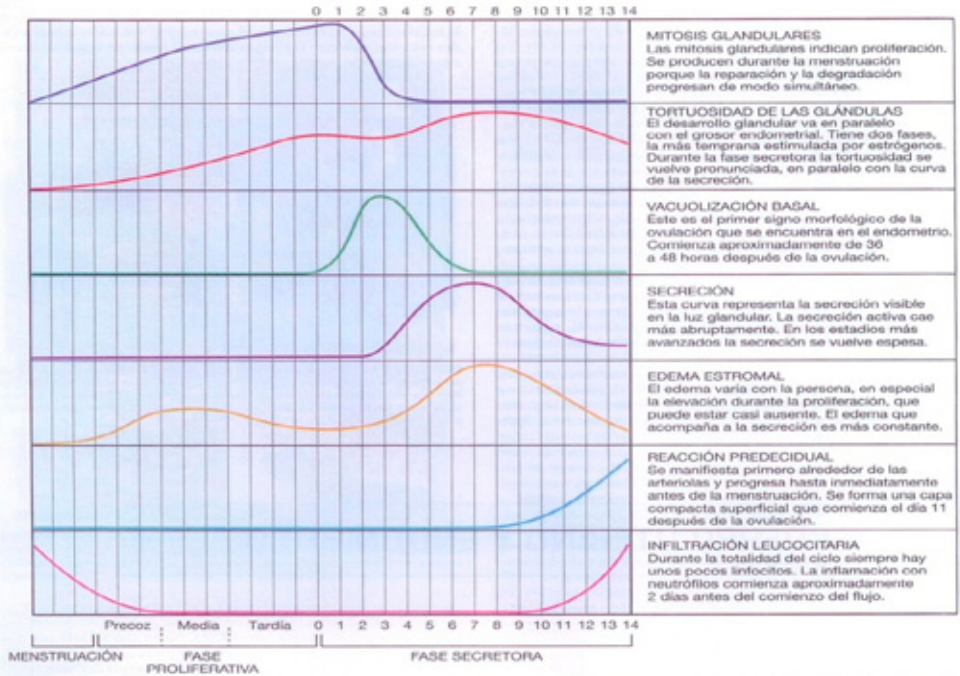


FIGURA 22-25 Cambios cuantitativos aproximados en siete criterios morfológicos de mayor utilidad en la datación del endometrio humano. (Modificado de Noyes RW: Normal phases of the endometrium. En Norris HJ, et al (eds): The Uterus. Baltimore, Williams & Wilkins, 1973.)

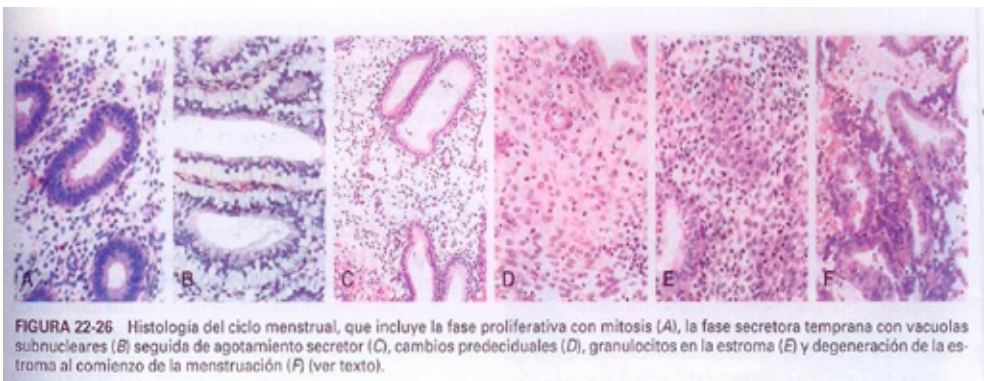


FIGURA 22-26 Histología del ciclo menstrual, que incluye la fase proliferativa con mitosis (A), la fase secretora temprana con vacuolas subnucleares (B) seguida de agotamiento secretor (C), cambios predeciduales (D), granulocitos en el estroma (E) y degeneración de la estroma al comienzo de la menstruación (F) (ver texto).

Los cambios cíclicos del endometrio se describen extensamente con microscopia óptica tras la inclusión en parafina con la tinción de hematoxilina-eosina. Durante la fase lútea del ciclo natural pueden observarse cambios morfológicos en el endometrio que día a día permiten su datación. Estos patrones obtenidos por Noyes, se consideran el patrón de oro en la evaluación endometrial.

La utilidad de estos criterios ha sido muy cuestionada en diferentes estudios en los que se observa una variabilidad intraobservador y ciclo a ciclo del 60% (Murray M., 2004) y en otro estudio se demuestra que la datación endometrial no se relaciona con el estado de fertilidad, porque la prevalencia de biopsias endometriales fuera de fase es similar cuando se compararon 287 pacientes infértiles con 332 mujeres fértiles, incluso fue un hallazgo más frecuente en mujeres fértiles (endometrio fuera de fase >2 días 42,2% en mujeres fértiles vs 32,7% en infértiles) (Coutifaris C. , 2004).

I.2.a.ii. Patrones de expresión génica- microarrays.

Más recientemente, ha comenzado una nueva línea de investigación que trata de dilucidar las bases moleculares para todos estos cambios endometriales en relación a las distintas concentraciones hormonales y fases del ciclo. Se trata de los **microarrays** que consisten en una superficie sólida, donde hay miles de puntos (spots) que contienen sondas de ácidos nucleicos o anticuerpos adheridos que tienen afinidad por aquellos genes o secuencias genómicas de interés que queremos estudiar. Estos microarrays son de diferentes tipos:

Microarrays de ADN, que se han diseñado para comparar patrones

genómicos, como los que permiten la hibridación genómica comparativa, útiles para evaluar tanto anomalías numéricas de los cromosomas como duplicaciones, deleciones, etc de secuencias de ADN en las blastómeras embrionarias, los microarrays de metilación para evaluar modificaciones epigenéticas y los microarrays de factores ChIP o de factores de transcripción que evalúan el papel de las interacciones de proteínas con el ADN.

Microarrays de ARN; los cuales exploran la transcripción del genoma en su ARN mensajero analizando cantidades distintas de ARN. Entre ellos tenemos los microARN que estudian la regulación de los mensajeros y los proteómicos capaces de detectar un número considerable de proteínas en fases receptivas y no receptivas del ciclo menstrual. Los microarrays de expresión se han utilizado para tratar de determinar los genes que aumentan o disminuyen su expresión durante la ventana de implantación. El endometrio permitirá la implantación embrionaria solo en condiciones óptimas y existe por tanto un mecanismo receptor en el endometrio que regula la invasión embrionaria.

Existen cientos de genes identificados como potenciales marcadores. La mayoría de estos estudios se realizan en muestras de biopsias endometriales, una el segundo día tras la ovulación y otra en el séptimo día. Tenemos dos tipos de genes en el endometrio: aquellos cuya expresión está regulada por los niveles de estrógenos y aquellos en los que se encuentra regulada por los niveles de progesterona.

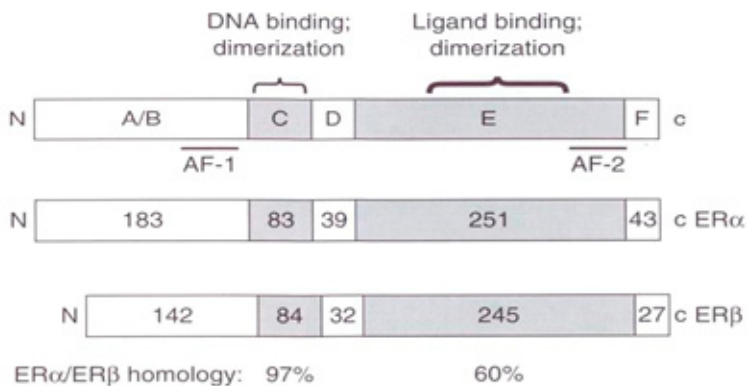
I.2.a.ii.1 Genes endometriales regulados por estrógenos.

Las fluctuaciones en los niveles de hormonas de origen ovárico son críticas para el desarrollo y mantenimiento de un endometrio apto para la

implantación y desarrollo embrionario. Muchos estudios se basan en la identificación de los genes regulados por estrógenos mediante la medida de su expresión a través de las distintas fases del ciclo menstrual o en respuesta a la administración de estrógenos exógenos o antagonistas del receptor estrogénico.

Los efectos de los estrógenos a nivel endometrial están mediados por el receptor de estrógenos (ER). Dicho receptor consta de 6 dominios, siendo los más importantes:

Figura 3. Receptor de estrógenos.



-Dominio C: responsable del reconocimiento y unión de las secuencias de ADN específicas de los genes objetivo.

-Dominio E: es el segmento de la proteína del receptor que se une específicamente a los ligandos agonistas o antagonistas. Cuando se une el ligando se produce una compactación de la estructura del dominio que determina la capacidad de reclutar co-activadores, proteínas que modulan la actividad de transcripción de los receptores.

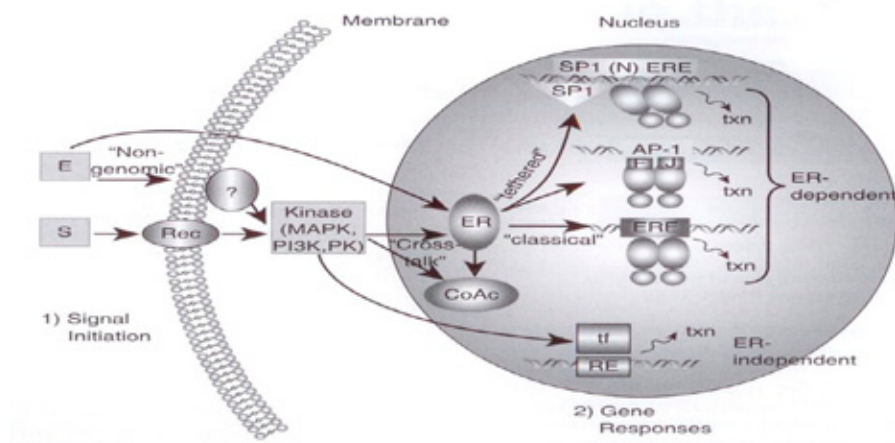
-Región AF-1 y región AF-2: relacionadas con la activación de los mecanismos de transcripción.

Existen dos receptores de estrógenos, el ER α y el ER β codificados por los genes *Esr1* y *Esr2*, que tienen la capacidad de unirse a estrógenos y regular genes similares. Se puede observar una homología del 98% entre el dominio C de ambos receptores, variando fundamentalmente en la región N-terminal y en el dominio E.

Los estrógenos tienen propiedades lipofílicas, con lo que pueden entrar en las células a través de la membrana celular e interactuar con el receptor. La transcripción génica mediada por estos ER comienza con la unión del agonista al receptor, modificando su conformación y permitiendo el reclutamiento de los coactivadores. (McKenna N.J., 2002). Estos coactivadores son numerosos y diversos y actúan interactuando con las regiones AF-2 y AF-1 de los receptores nucleares activados por los agonistas. Existen diferentes mecanismos por los cuales se producirá la transcripción génica. El *mecanismo clásico* consiste en que el complejo agonista-receptor activado se une a genes nucleares que poseen regiones de ADN específicas para ese receptor y que se unirán al dominio C del mismo, comenzando así el proceso de transcripción de dicho gen. *Otro mecanismo (tethered)* se basa en el reclutamiento de otros factores de transcripción (SP1 y AP1) por parte del complejo agonista-receptor antes de unirse a los genes específicos. Un tercer mecanismo, el denominado *no genómico*, se produce mediante la interacción de los estrógenos con receptores extracelulares (en la membrana celular), como la GPR30 que al unirse al estrógeno es capaz de activar la quinasa MAP. La respuesta a los estrógenos mediante esta vía es muy rápida (minutos o segundos) pero aún queda mucho por estudiar.

(Coleman K.M., 2001) (Levin E.R., 2005). Conocemos otras moléculas como factores de crecimiento que pueden iniciar cascadas de señales a través de la membrana celular y activar la quinasa MAP (MAPK) o la quinasa PI3, las cuales pueden regular el receptor o actuar sobre sus coactivadores, o directamente sobre otros factores de transcripción independientes del ER que actuarán a su vez sobre sus genes objetivo transcribiéndolos. Este mecanismo se denomina *cross-talk*. (Li X.T., 2003).

Figura 4. Mecanismos de activación del receptor de estrógenos.



Para poder llevar a cabo estas investigaciones que permiten la identificación de los genes uterinos regulados por estrógenos, es habitual recurrir al uso de modelos animales. Hay que tener en cuenta que en un medio regulado cíclicamente por hormonas es difícil discernir los efectos específicos debidos a la acción de cada hormona. Uno de los modelos que se han usado son las hembras de roedores ooforectomizadas. A estos animales se les administraron agonistas de los ER, pudiendo así describir

los efectos de los mismos a nivel uterino en dos fases. En una primera fase se apreció la transcripción de “genes tempranos” como el Fos, y en una segunda fase, 16-24 horas después, se observó la transcripción de “genes tardíos” como la lactoferrina. (Boettger-Tong H.L., 1995) (Kraus W.L., 1993) (Clark J.H., 1979).

Otro modelo utilizado son los ratones con carencias de receptores de estrógenos y progesterona o que expresan formas mutadas del ER. Fueron diseñados genéticamente para este tipo de estudios. (Couse J.F., 1999) (Lydon J.P., 1995) (Jakacka M., 2002). También hay modelos en animales domésticos como las vacas, ovejas y cerdos hembra, pero su manipulación es muy dificultosa debido a su peso y tamaño (Spencer T.E., 1995). Los modelos más compatibles con el humano son los babuínos y otras especies de monos (Fazleabas A.T., 2006) (Dwivedi A., 1999).

Los estudios en endometrio humano utilizan como ya decíamos muestras obtenidas mediante biopsia endometrial o histerectomías (Mirkin S., 2005) (Yanaihara A., 2005).

A partir de estos modelos la tecnología basada en los microarrays de ADN ha identificado miles de genes uterinos regulados por estrógenos. Una vez identificados los genes, resta entender como los distintos patrones genómicos de expresión pueden dar lugar a las diferentes respuestas biológicas. Esto se lleva a cabo mediante paquetes de software que permiten comparar y analizar las bases de datos de microarrays. Otra aproximación sería el análisis matemático de las secuencias génicas y los factores de transcripción (Kamalakaran S., 2005) (Bourdeau V., 2004). Una nueva tecnología desarrollada es la inmunoprecipitación de cromatina combinada con los microarrays, también llamada “chip on chip”, que muestra la

transcripción proteica para cada secuencia génica y ayuda a identificar las respuestas específicas que son un resultado directo de la actividad del ER y diferenciarlas de las respuestas secundarias debidas a otros factores de transcripción (Jin V.X., 2004) (DeNardo D.G., 2005).

I.2.a.ii.2 Genes regulados por progesterona en el endometrio

La progesterona es la principal hormona reguladora de todos los procesos reproductivos implicados tanto en el establecimiento como en el mantenimiento del embarazo. Entre sus funciones se encuentran la regulación de la receptividad endometrial para permitir la implantación embrionaria y controlar la proliferación celular epitelial y estromal.

Esta actividad de la progesterona está mediada por su receptor (PGR), que es un factor de transcripción nuclear. Este receptor consta de 3 dominios fundamentales:

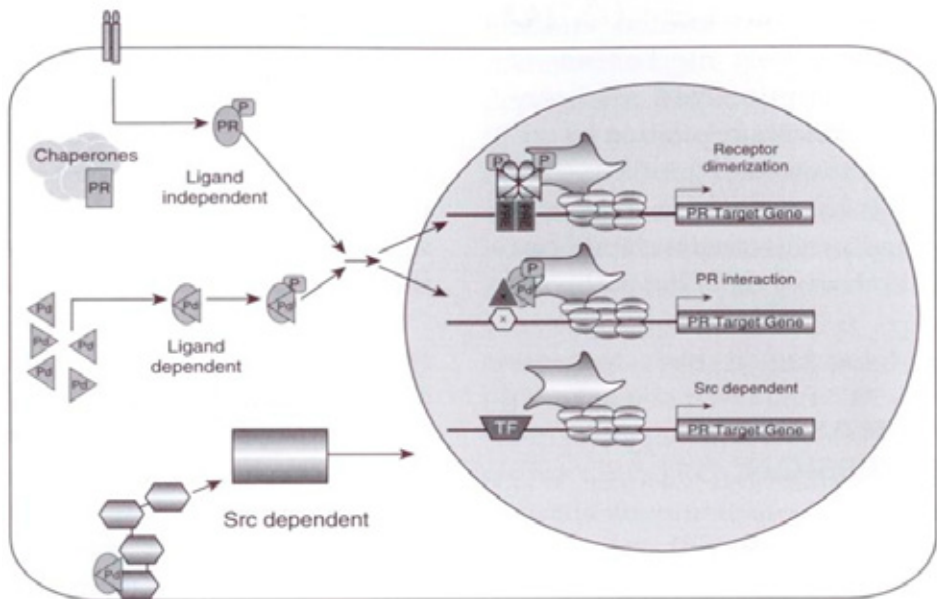
- Dominio de unión a secuencias de ADN: determina qué secuencias de ADN reconocerá el receptor.
- Dominio de unión al ligando: confiere especificidad al receptor y regula su actividad de transcripción.
- Dominio de activación (AF).

El receptor de la progesterona está codificado por un gen pero existen diversas isoformas: PRA, PRB y PRC (Tsai M.J., 1994).

Figura 5. Receptor de progesterona.



Figura 6. Mecanismos de activación del receptor de progesterona.



Estos receptores pueden ser activados por varios mecanismos, al igual que los receptores estrogénicos que ya hemos descrito:

-Mecanismo tradicional dependiente del ligando: se basa en la unión de la progesterona al dominio específico del receptor. En ausencia de progesterona los receptores se encuentran inactivos en el citoplasma celular unidos a proteínas chaperonas. Cuando se produce la unión de la progesterona, el PGR se fosforila, se libera de las proteínas, y se traslada al núcleo donde se producirá la transcripción.

-Mecanismo independiente del ligando: se basa en la fosforilación del receptor a través de quinasas activadas por una cascada de señales tras la activación de receptores de membrana por diferentes factores como el cAMP, la dopamina y la Cdk2 (Power R.F., 1992).

El mecanismo de acción es en ambos casos una fosforilación del receptor que produce cambios en la conformación del mismo que permite la unión a los elementos de respuesta a la progesterona (PREs) para estimular la expresión de los genes objetivo. Una vez que el PGR se une al PRE, el receptor activado interacciona con los coactivadores que unirán el PGR a la maquinaria de transcripción. Además, estos coactivadores reclutan enzimas necesarias para la correcta expresión génica, como la CBP/p300, pCAF, p160s, ATP-coupled chromatin-remodeling SWI-SNF complex, CARM1, PRMT-1/2, E6-AP y Rsp5. Los primeros en ser conocidos fueron los coactivadores de la familia del receptor esteroideo (SRC1, SRC2 y SRC3). (Smith C.L., 2004).

También existen correpresores como N-CoR y SMRT.

Todos estos cofactores se expresan en el endometrio y miometrio. En el miometrio los niveles son constantes, mientras que en el endometrio sufren

cambios cíclicos el SRC-1, N-CoR y SRC-3. Los niveles de p300 y CBP se mantienen relativamente constantes. En el embarazo a término la disminución de los coactivadores puede desencadenar el parto por la disminución de la capacidad de los PGRs de mantener la relajación uterina (Shiozawa T., 2003) (Arnett-Mansfield R.L., 2001). La expresión del PGR en el endometrio humano está regulada por estrógenos y progesterona. En la fase proliferativa endometrial el útero está bajo la influencia de los estrógenos y se produce una proliferación de las células epiteliales y estromales. En este momento podemos ver muchos PGRs en el núcleo de estas células. En la fase secretora el endometrio está sobre todo bajo el influjo de la progesterona que provoca los cambios secretores. Las glándulas incrementan su tortuosidad y se acumulan sustancias en las células epiteliales glandulares. También aumentan los depósitos de lípidos y glucógeno en el citoplasma de las células estromales. La cantidad de PGRs presentes en el epitelio glandular y luminal decrece progresivamente. No así en las células estromales y miometriales que continúan expresando niveles elevados de estos receptores, y que irán decreciendo a medida que avanza la fase secretora. La menstruación se produce por un rápido descenso de los niveles de estrógenos y progestágenos, fundamentalmente estos últimos, seguido por una involución endometrial. La función de estos PGRs es muy importante ya que determinan los cambios secretores endometriales que son necesarios para la implantación embrionaria y también en la prevención de las contracciones uterinas para evitar los abortos espontáneos por esta causa (García E., 1988) (Press M.F., 1988) (Condon J.C., 2006).

Al igual que en el caso de los estrógenos, para poder identificar los genes uterinos cuya función es dependiente de la progesterona, se ha recurrido a las investigaciones en modelos animales:

-Modelos con ablación génica del PGR: llevados a cabo en ratones, producen anomalías reproductivas, problemas ovulatorios, mala respuesta decidual asociada a fallo de implantación y defectos del desarrollo glandular en las mamas. En el ratón, el PRA es el mayor mediador de los efectos de la PG en el útero. El PRB regula la proliferación de las células epiteliales endometriales. Son las dos isoformas predominantes tanto en el útero como en las glándulas mamarias (Lydon J.P., 1995).

-Modelos indicadores de la actividad del PGR: en ratones. Para determinar la relación entre el PGR y los coactivadores SRCs. Fue desarrollado el sistema de Progesterone Receptor Activity Indicator (PRAI) que monitoriza la transcripción del PGR. Consiste en una modificación artificial del cromosoma de una bacteria clonado que contiene un locus de PGR (BAC) donde se sustituye el dominio de unión al ADN por una proteína fluorescente (hrGFP), cuya expresión en el útero indica actividad del PGR. Se ha demostrado que el SRC-1 modula la actividad del PGR en el útero, en respuesta a los estrógenos y la progesterona el SRC-1 activa el PGR en células del estroma y del miometrio. Tras un tratamiento crónico con progesterona el SRC-1 disminuirá la expresión del PGR.

-Modelos con eliminación del desarrollo glandular uterino: en ovejas. Se basa en la ooforectomía de ovejas recién nacidas a las cuales se les coloca un implante de 19-norprogesterina. Dado que la señal para el desarrollo de las glándulas uterinas es la retirada de la progesterona del ambiente prenatal, en estas ovejas la retirada no se produce y las glándulas no se desarrollan. Este modelo es útil en la identificación de genes expresados en el epitelio endometrial (Bartol F.F., 1988) (Gray C.A., 2002).

-Modelos con ablación de los coactivadores: en ratones. Ratones homocigotos

con ablación del SRC-1 son fértiles y viables. Se produce un aumento en la expresión del SRC-2 que compensa parcialmente el defecto, aunque existe un cierto grado de resistencia a la progesterona en los tejidos, siendo deficiente la respuesta decidual. SRC-2 es necesario durante el embarazo. Cuando las hembras no poseen expresión del SRC-2 puede producirse la reacción decidual y la implantación, pero el tamaño de la camada es drásticamente reducido. Se produce una hipoplasia placentaria con disminución del número de trabéculas trofoblásticas y capilares (Gehin M., 2002).

-Modelo FKBP52: en ratones. En ausencia de progesterona el PGR se encuentra inactivo unido a chaperonas en el citoplasma, una de las cuales es la FKBP52. Esta proteína es capaz de potenciar la actividad de transcripción del PGR. Durante la fase de implantación esta proteína está localizada en las células del estroma decidualizado alrededor de la zona de implantación. Las hembras de ratones sin esta proteína son infértiles, presentando siempre un fallo de implantación debido a una reducción en la actividad de transcripción del PGR y a la no expresión de los genes objetivo (Barent R.L., 1998) (Tranguch S., 2005).

-Modelos con ablación de las quinasas Src: en ratones. El PGR puede activarse directamente en el citoplasma por la interacción con quinasas Src. Estas quinasas están relacionadas con procesos de proliferación, diferenciación y angiogénesis relacionados con la decidualización, encontrándose estas proteínas en la decidua en estudios inmunohistoquímicos. Las hembras que no poseen estas proteínas no tienen respuesta decidual, siendo su actividad indispensable para una correcta decidualización (Thomas S.M., 1997) (Shimizu A., 2005).

Al igual que en el caso de los estrógenos, la tecnología con microarrays ha mejorado la capacidad para identificar genes regulados por PGR en el

útero. Algunos de estos genes son el *Areg*, *Hdc*, *Hoxa-10* y *11*, calcitonina, calbindin-D9K, Indian hedgehog, *HIF1A* y genes de respuesta inmune.

Hay muchos estudios basados en los microarrays que intentan identificar estos genes. Uno de los primeros (Yoshioka K., 2000) trató de identificar la regulación génica del periodo de preimplantación (día 3) y postimplantación. Se vio que la expresión de 192 genes se incrementaba y la de 207 genes decrecía en el paso de un periodo a otro. En otro estudio (Reese J., 2001) se investigó la expresión génica durante el periodo de implantación, pero a un grupo se le administró tratamiento con progesterona exógena y a otro tratamiento con estrógenos exógenos retrasando la implantación. Se trató de identificar qué genes se expresaban concretamente en el periodo de implantación y bajo control hormonal. Se encontraron 27 genes que se expresaban en ambos grupos durante este periodo. Cheon et al. (Cheon Y.P., 2002) plantearon un estudio basado en la administración del antiprogestágeno RU486 en hembras de ratón gestantes en día 2 y valorando los cambios 24 horas después. En este momento los PGRs están aumentados en todos los compartimentos y con la retirada de la progesterona se identificaron 148 genes posiblemente regulados por el PGR. Jeong et al. (Jeong J.W., 2005) estudiaron hembras de ratones ooforectomizadas mediante arrays de oligonucleótidos. Estas hembras fueron tratadas con 1 mg de progesterona cada 12 horas y el estudio se dividió entre las que fueron sacrificadas 4 horas tras la primera inyección o tras cuatro dosis (40 horas). A las 4 horas 139 genes aumentaron su expresión por efecto de la progesterona y PGR y 96 genes la disminuyeron. Tras un tratamiento crónico con progesterona se observó una disminución en la expresión de estos genes. Kao et al. (Kao L.C., 2002) estudiaron en células de endometrio humano de muestras de biopsia mediante microarrays de

oligonucleótidos genes que se expresan durante la ventana de implantación (días 20-24 del ciclo). Comprobaron el aumento en la expresión de 156 genes y la disminución en 377 genes. Son muchos los genes que se han identificado mediante estos estudios como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 1. Genes implicados en la receptividad endometrial.

Nombre del Gen	Ciclo Natural	HOC	DIU
Glutathione peroxidase 3	+25.87	-11.81	-13,4
Placental protein 14	+81.61	-9.83	-10.18
FXD domain containing ion transport regulator 2	+4.07	-4.53	-9,43
Dipeptidylpeptidase 4	+31.37	-37.14	-8.47
Leukemia inhibitory factor	+36.62	-23.02	-4.57
Insulin-like growth factor binding protein 3	+4.00	-4.26	-3.76
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	+8.03	-3.03	-3.52
Hyaluronan binding protein 2	+5.90	-6.41	-3,42
Endothelin receptor type B	+8.21	-3.20	-3.41
Leiomodin 1	+29.73	-4.08	-3.10
Calponin 1, basic, smooth muscle	+10.31	-9.26	-2.86
Clusterin	+28.78	-7.13	-2.79
Transgelin	+8.38	-3.72	-2.73
Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	+2.48	-4.66	-2,49
Inositol -1 -monophosphatase 2	+5.23	-5.88	-2.23
Calpain 6	-4.58	+10.32	+11.20
Tissue factor pathway inhibitor 2	-3.52	+5.42	+7.32
Mitogen-activated protein kinase kinase 6	-4.87	+8.65	+6.57
Catenin , alpha 2	-8.44	+7.32	+6.40
Sorbitol dehydrogenase	-2.42	+11.56	+5,87
Major histocompatibility complex, class II, DO beta	-16.48	+12.23	+4.93
Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	-3.33	+10.32	+4.06
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2	-3.12	+4.28	+3.52
NDRG family member 2	-5.98	+5.90	+3.35
Folate receptor 1	-10.49	+9.30	+2.53

HOC: hiperestimulación ovárica controlada. DIU: Dispositivo intrauterino.

En esta tabla se presenta la relación de genes que durante un ciclo natural se expresan en la ventana de implantación y cómo se modifican durante el uso del DIU (que actúa como cuerpo extraño en el interior de la cavidad endometrial) y durante la hiperestimulación ovárica controlada (HOC). Otros genes relevantes incluyen:

-Calcium-binding proteins (CaBP-d28k): se detecta en todos los estadios del ciclo menstrual, fundamentalmente en el epitelio luminal y glandular, con baja expresión en el estroma. El momento de máxima expresión es en la fase media secretora cuando el endometrio es receptivo a la implantación (Luu K.C., 2004).

-CCAAT/enhancer-binding protein B (C/EBPB): durante la fase proliferativa del ciclo se expresa en el epitelio y en ocasiones en el estroma. Regula la proliferación, diferenciación y apoptosis celular.

-Homeobox (Hox) genes: HoxA10 y 11 se expresan en el epitelio glandular y el estroma endometrial durante todo el ciclo incrementándose su expresión durante la fase lútea media y tardía. En pacientes con endometriosis o miomas no se visualiza este incremento (Taylor H.S., 1998) (Taylor H.S., 1999) (Cermik D., 2002).

-Colony-stimulating factor I (CSF-1): se expresa también durante todo el ciclo menstrual, pero aumenta en la fase proliferativa. Se expresa también en la decidua de mujeres gestantes. Una expresión anormal del CSF-1 durante el embarazo se asocia a infertilidad y abortos espontáneos recurrentes (Katano K., 1997).

-Vascular endotelial growth factor (VEGF-A): se expresa a través de todo el ciclo menstrual, siendo su expresión máxima en el epitelio glandular en la fase lútea. En el estroma endometrial la estimulación por estrógenos y

progéstágenos induce la expresión del VEGF. Según el estudio de Kao et al. sus niveles disminuyen durante el periodo de implantación (Torry D.S., 1996) (Shifren J.L., 1996) (Ancelin M., 2002).

-Mucin I (Muc1): los niveles de Muc1 se han relacionado directamente con la fertilidad en el útero humano y su expresión está directamente regulada por la progesterona. Mujeres con abortos de repetición presentan niveles disminuidos de Muc1 durante la fase lútea y el periodo de implantación (Hey N.A., 1995).

-Inmune response gene I (IRG1): se expresa en el epitelio luminal solo durante el embarazo y durante la implantación. Su expresión está regulada por progesterona y estrógenos.

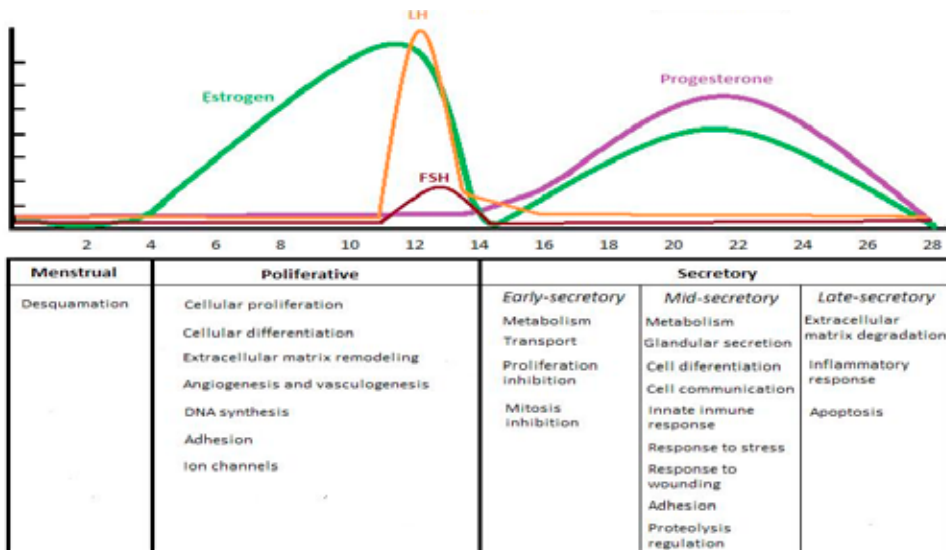
-Indian hedgehog (Ihh): su expresión es en el epitelio e inducida por la progesterona. Es un mediador esencial en la acción del PGR regulando la ventana de implantación. Su ablación produce infertilidad absoluta con un endometrio refractario a la implantación embrionaria, con pérdida de los cambios proliferativos en el estroma, angiogénesis y respuesta decidual (Lee K., 2006).

Está claro que tanto los efectos de los estrógenos como de la progesterona son críticos para un buen éxito reproductivo. Los efectos de estas dos hormonas pueden estudiarse mediante modelos animales o en muestras de endometrio humano. Estos estudios con microarrays, en combinación con otras tecnologías emergentes, permitirán en el futuro comprender los mecanismos de regulación génica y la identificación de componentes críticos de la biología uterina. Utilizando por ejemplo, la tecnología chip on chip en un futuro se podrá conocer qué genes específicos del ER o PGR son directamente estimulados por ellos y cuáles son los cambios secundarios que su transcripción produce en los tejidos. Se aspira a identificar qué genes se expresan en cada tipo celular uterino (epitelio glandular y luminal, miometrio, células vasculares y del sistema inmune).

Una vez se tiene identificado en una muestra de tejido los genes que se regulan al alza o a la baja comparado un patrón normal (por ejemplo, en este caso un patrón endometrial receptivo), es posible agruparlos para ver su comportamiento en diferentes momentos (por ejemplo LH +2 vs LH +7) mediante PCA (Clustering). Igualmente, se puede realizar el análisis funcional buscando la activación o inactivación de funciones biológicas o vías metabólicas, para ello se utiliza la base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID) (Dennis G.. 2003), Esta herramienta identifica bloques de genes relacionados funcionalmente según diferentes criterios como la ontología genética o las vías KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Los procesos biológicos que suceden durante el ciclo menstrual incluyen proliferación celular, descamación celular, síntesis de ADN, inhibición de la mitosis, respuesta al stress, etc. y están resumidos en la siguiente gráfica.

Figura 7. Procesos biológicos durante el ciclo menstrual.



Hay descrita una herramienta para determinar el estado de receptividad endometrial basado en la señal transcriptómica que incluye 238 genes seleccionados mediante microarrays, de los cuales se definió la señal transcriptómica en 134 genes. Esta herramienta alcanza una especificidad de 0,8857 y una sensibilidad de 0.99758 para la datación endometrial, constituyendo un potencial biomarcador de receptividad endometrial (Diaz-Gimeno P., 2011).

I.2.b. Ecografía

El endometrio presenta un aspecto ecográfico diferente durante las distintas etapas del ciclo ovulatorio. Dichos cambios ultrasonográficos se correlacionan con los cambios histológicos madurativos y nos sirven para identificar la etapa del ciclo menstrual así como para identificar aquellos casos de desarrollo endometrial inadecuado.

La medición ecográfica del grosor endometrial correlaciona bien con su grosor anatómico (Fleischer A.C., 1986). El grosor endometrial parece relacionarse con la posibilidad de gestación durante los tratamientos de reproducción asistida, como se demuestra en un estudio de 1294 ciclos de FIV. La tasa de gestación aumentó gradualmente con el aumento del grosor endometrial e incluso se ha descrito una menor tendencia a la tasa de aborto en estas pacientes (Richter K.S., 2007).

I. 3 Endometrio durante la estimulación ovárica

Uno de los efectos de la estimulación ovárica controlada es el incremento de los esteroides ováricos los cuales afectan el endometrio. Los estudios

comparando el endometrio de ciclos de fecundación in Vitro (FIV) con ciclos naturales han demostrado cambios secretores prematuros en la fase post-ovulatoria y lútea media en los ciclos de estimulación para FIV. La estimulación ovárica controlada pretende desarrollar múltiples folículos en medio de un ambiente endocrino caracterizado por un progresivo incremento de niveles suprafisiológicos de estradiol y unos niveles controlados de gonadotropinas. Aunque el órgano diana de la estimulación es el ovario, el efecto del ambiente esteroideo alterado ha sido motivo de preocupación en diferentes estudios (Chen Q., 2007) los cuales advierten que la estimulación ovárica produce una maduración endometrial prematura (MEP) (Kolibianakis E., 2002a).

Los estudios histológicos del endometrio que ya tienen más de 60 años no tienen aplicación clínica actual. Sin embargo, pueden ser útiles en la investigación básica. Las biopsias de endometrio tomadas en ciclos de estimulación con análogos de la GnRH han demostrado cambios secretores tempranos incluso antes de la elevación precoz de la progesterona sérica.

Los estudios del endometrio en los ciclos de transferencia embrionaria han demostrado un efecto deletéreo de un adelanto en la maduración endometrial en la fase periovulatoria, de tal forma que si ese adelanto es mayor de 3 días no se consigue ningún embarazo en ese ciclo (Kolibianakis E., 2002a). Un estudio de la expresión génica del endometrio en protocolos de agonistas de GnRH comparado con antagonistas demuestra que los antagonistas presentan un patrón más similar al ciclo natural (Haouzi D., 2010).

I.3.a. Maduración endometrial prematura (MEP)

La MEP ha sido definida tradicionalmente como un adelanto de

al menos dos días en los cambios histológicos del endometrio según los criterios de Noyes, en relación con los datos cronológicos del ciclo endometrial (Noyes R., 1950). Este adelanto de la madurez endometrial tiene repercusiones negativas en las posibilidades de embarazo como se ha demostrado recientemente. En un estudio de 55 pacientes estimuladas con FSH recombinante, se les tomó una biopsia de endometrio el día de la recuperación de los ovocitos. El adelanto en la madurez endometrial fue un hallazgo universal y no se consiguió ninguna gestación en las 6 pacientes que tuvieron más de tres días de adelanto en la MEP (Kolibianakis E., 2002a). Esa maduración endometrial en el momento de la captación ovocitaria parece estar relacionada con los niveles elevados de la LH y con la duración del período de estimulación con FSH antes de empezar con el antagonista de la GnRH (Kolibianakis E., 2004).

Los cambios de maduración endometrial son inducidos por la progesterona después de una fase de preparación bajo efecto de los estrógenos. La MEP podría estar asociada con el efecto de la progesterona sobre el endometrio pero no necesariamente con elevación sérica de sus niveles. Puede haber un aumento de los receptores de progesterona inducidos por los estrógenos que explique el efecto negativo de la estimulación ovárica sin que haya una “luteinización precoz” sérica. La diferencia entre los niveles séricos de progesterona y su efecto a nivel endometrial permanece como un enigma.

Esta MEP está asociada a una baja tasa de implantación (Kolibianakis E., 2002), sin embargo, el efecto negativo de la estimulación ovárica sobre el endometrio no está totalmente demostrado y el mecanismo exacto que produce la MEP, tampoco está claramente definido. Los estudios de anatomía patológica del endometrio han demostrado que la estimulación

ovárica controlada puede resultar en un desarrollo endometrial avanzado, especialmente en el compartimento estromal y puede estar asociado con una disincronía glándulo-estromal (Acosta A., 2000).

Un estudio de 20 pacientes demuestra que una elevación de los niveles de progesterona durante la fase folicular induce una aceleración de cambios secretorios en el endometrio (MEP) en el momento de la recuperación de los ovocitos y no se consigue embarazo cuando la diferencia cronológica supera los tres días de maduración (Ubaldi F., 1997). En este mismo estudio se describe que no existe correlación entre los días de exposición a la elevación de la progesterona y el grado de MEP. Un estudio de 22 pacientes normales estimuladas con HMG pero en quienes la transferencia embrionaria no se realizó, se les practicó una biopsia de endometrio y se describió que en 11 de ellas había un patrón endometrial avanzado, algo que en transferencias embrionarias en día 2-3 puede ser beneficioso para el momento de la llegada del embrión a la cavidad endometrial (García J., 1984).

Además de la tradicional forma de medir de los cambios histológicos, recientemente contamos con la nueva tecnología de los microarrays que permite el estudio génico del endometrio y determinar no solo si el endometrio es receptivo al embrión durante el período de la ventana de implantación (Haouzi D., 2009) (Horcajadas J., 2007) sino también es una herramienta útil como marcador del efecto endometrial de diferentes protocolos de estimulación ovárica (Martínez-Conejero J.A., 2007). La MEP en ciclos estimulados con el uso de los antagonistas de la GnRH (GnRH-ant) se correlaciona con una expresión génica alterada como quedó demostrado en un estudio de 11 pacientes a quienes se les practicó una biopsia de endometrio el día de la extracción de los ovocitos, confirmando un adelanto

histológico de D+2 a D+4 (Van Vaerenbergh I., 2009). La MEP puede suceder en la fase proliferativa con la aparición de cambios secretores con un anticipo de maduración entre dos y cuatro días (Lass A., 1998) o en la fase lútea media con un anticipo de la maduración endometrial manifestado por una disincronía glándulo-estromal (Basir G., 2001).

El paso de un endometrio de fase pre-receptiva a receptiva podría interpretarse como una maduración endometrial prematura alrededor del momento de la implantación. Muchos estudios han evaluado el efecto de la estimulación o de la inducción de la ovulación sobre el endometrio demostrando un paso de estado pre-receptivo a receptivo bajo efecto de la estimulación ovárica (Bermejo A., 2014).

I. 4. Estimulación ovárica

I. 4.a. Antagonistas de la GnRH

Los GnRH-ant son fármacos destinados a evitar la liberación de la LH en respuesta a los niveles elevados de estradiol que normalmente se alcanzan cuando el folículo dominante llega a 14 mm de diámetro medio (Younis J., 2010), lo que normalmente se corresponde con una concentración sérica de estradiol de 800 pg/mL. Sin embargo, los GnRH- ant pueden utilizarse desde el inicio de la estimulación ovárica sin afectar los resultados y garantizan bajos niveles endógenos de LH a partir de las 48 horas desde la aplicación de la primera dosis (Kolibianakis E., 2003) (Broekmans F., 2014).

Los GnRH-ant causan una inmediata y rápida supresión de las gonadotropinas por una ocupación competitiva de los receptores de la GnRH y son administrados en la fase folicular media para evitar la liberación prematura

de LH (Kolibianakis E., 2005). Los estudios comparando el uso de agonistas con los GnRH- ant han demostrado que con el uso de estos últimos se consumen menos gonadotropinas, la estimulación ovárica es más corta, aunque no se ha demostrado que mejore las tasas de gestación (Fluker M., 2001).

Actualmente su mayor beneficio es la aplicación en mujeres con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica en las cuales se puede inducir la maduración final de los ovocitos con un agonista de la GnRH con la práctica abolición de este síndrome (Muñoz E., 2012a).

I. 4.b Utilidad de la LH

La estimulación ovárica puede realizarse con o sin LH (Filicori M., 1999, 2002), sin embargo, no está claro en qué casos debe usarse el suplemento con la LH durante la estimulación. (Alviggi C., 2006) (Kilani Z., 2003). Una reciente revisión intenta asociar el uso de la LH durante la estimulación ovárica en función de los niveles endógenos de esta hormona en estado basal (Muñoz E., 2012). La LH es la principal hormona responsable del cambio de las células de la granulosa hacia la “luteinización”; un cambio morfológico y funcional que determina el inicio de la producción de progesterona en el folículo.

La LH como suplemento de la FSH en la estimulación ovárica para hiperestimulación ovárica controlada se considera que beneficia a mujeres mayores de 35 años (Hill M., 2012). Además, parece inducir una mayor sincronía en el desarrollo folicular con atresia de los folículos de menor tamaño y una mejoría en la calidad de los ovocitos procedentes de los folículos de mayor tamaño (Filicori M., 2002). Finalmente, parece

útil en mujeres con baja respuesta a la estimulación ovárica (Alviggi C., 2006). La dosis de LH que parece suficiente para conseguir efecto de estimulación es de 75 UI/d. (Bosch E., 2011). Se ha demostrado que solo es necesario ocupar el 1% de los receptores de LH para conseguir una adecuada esteroidogénesis para la reproducción (Chappel S., 1991).

I. 4.c Luteinización precoz

Se define como la elevación de los niveles séricos de progesterona antes de la aplicación del hCG (Legro R., 1993), sin embargo, su definición puede ser mal interpretada porque en muchas ocasiones no se acompaña de una elevación de la LH. Incluso, puede no ser debida a una producción aumentada de progesterona por parte de la células de la granulosa, sino que puede verse con una producción normal por cada folículo, pero en presencia de muchos folículos llevar a una luteinización precoz (Venetis C.A., 2007).

La luteinización precoz definida como un incremento $>$ o igual a 1,3 ng/mL de los niveles de progesterona sérica antes de la aplicación de la hCG se asocia con baja implantación, sin que se afecten las tasas de fecundación o de división embrionaria (Bosch E., 2003) y su incidencia varía entre el 5 y el 30% (Edelstein M., 1990) (Schoolcraft W., 1991) (Givens C., 1994) (Ubaldi F., 1995). Los niveles de LH durante la estimulación no se han correlacionado con la luteinización precoz (Melo M., 2006). De forma natural o durante la estimulación ovárica, la progesterona no debería aparecer durante la fase folicular y sus niveles séricos deberían permanecer bajos. Sin embargo, en algunas mujeres la progesterona se eleva de forma prematura tanto en ciclos naturales (Kolibianakis E., 2003a) como durante la estimulación ovárica (Bosch E., 2010). El efecto negativo que ejerce la luteinización precoz

sobre el resultado del ciclo de reproducción asistida es fundamentalmente derivado de la acción de la progesterona sobre el endometrio, como ha sido demostrado en estudios con donantes de ovocitos (Melo M., 2006) o en pacientes sometidas a FIV (Bosch E., 2010), pues el comportamiento de los ovocitos y embriones derivados es similar a pacientes controles (Martinez F., 2004). En un estudio en donantes de ovocitos se demuestra que los niveles elevados de progesterona en la fase folicular tardía inducen alteraciones significativas en el perfil de expresión génica del endometrio confirmando la teoría del impacto negativo de esta elevación precoz de la progesterona sobre el endometrio (Labarta E., 2012).

La relación entre la elevación prematura de la progesterona durante la fase folicular y la MEP en el momento de la extracción ovocitaria no siempre existe. Hay casos de MEP sin elevación de la progesterona (Ubaldi F., 1997).

Muy recientemente, el temor a que el endometrio se haga refractario a la implantación durante la estimulación ovárica ha cambiado la práctica clínica hasta el punto de plantear, mejores resultados de transferencias embrionarias en ciclos sustituidos con embriones congelados, comparados con ciclos estimulados y transferencia de embriones en fresco. En ese mismo sentido, se ha descrito una mayor tasa de embarazo ectópico en ciclos bajo efecto de la estimulación ovárica comparada con transferencias de embriones en ciclos sustituidos (Shapiro B., 2012).

Por lo tanto parece interesante analizar si la estimulación con LH, los niveles de progesterona durante la fase folicular o incluso los niveles endógenos de LH previos a la estimulación tienen alguna relación con la MEP.

JUSTIFICACIÓN

El endometrio durante la estimulación ovárica sufre los efectos de los niveles elevados de esteroides ováricos, así como el posible efecto directo de las propias gonadotropinas o de los análogos de la GnRH. Todo esto se ha traducido en una MEP que puede disminuir la tasa de implantación y explicar fracasos en técnicas de reproducción asistida que de otra forma no se podrían explicar. Esa maduración endometrial ha sido tradicionalmente asociada a la elevación prematura de la progesterona, sin embargo no parece necesaria la elevación previa de esta hormona para que esta suceda. El mecanismo por el que se desencadena el incremento de los niveles séricos de progesterona, está relacionado con una liberación prematura de la LH (Luteinización precoz), antes de la aplicación del hCG. Por lo tanto, el papel que la adición de LH exógena a la estimulación ovárica pueda tener en este proceso es de capital importancia y sin embargo, hasta el momento no ha sido estudiado.

El presente estudio pretende evaluar el efecto de la estimulación ovárica con y sin LH sobre el endometrio mediante la histología básica y la tecnología de microarrays especialmente dirigido a establecer la frecuencia de la MEP y la expresión génica endometrial así como su análisis genómico funcional.

OBJETIVOS

III. 1.General

Comparar la presencia de maduración endometrial prematura y los patrones de expresión génica endometrial entre dos protocolos de estimulación ovárica con y sin LH.

III. 2. Específicos:

- Bloquear los niveles endógenos de LH en la donante de ovocitos antes y durante toda la estimulación ovárica.
- Bloquear el funcionamiento ovárico del ciclo previo a la estimulación con el uso de anticonceptivos orales.
- Determinar los niveles séricos de estradiol, progesterona, testosterona y LH antes de empezar la estimulación ovárica y cada dos días durante la misma.
- Utilizar el GnRH-ant desde el primer día de estimulación ovárica para garantizar la ausencia de LH endógena.
- Aplicar a una misma donante dos tipos de estimulación con y sin LH con la misma dosis de FSH recombinante.
- Tomar dos biopsias de endometrio en una misma donante los días hCG +2 y hCG + 7.
- Analizar la presencia de cambios histológicos en el endometrio mediante tinción de hematoxilina eosina para datación endometrial.

OBJETIVOS

- Analizar la expresión de diferentes genes de receptividad endometrial mediante microarrays.
- Determinar los niveles séricos medios de progesterona en nuestras pacientes mediante análisis de media y dos desviaciones standard por encima de la media para determinar la luteinización prematura aplicable a nuestra población.
- Comparar mediante Clustering las diferencias en los genes expresados en día hCG + 2 vs hCG + 7.
- Comparar la expresión génica endometrial según la estimulación tuviera o no LH.
- Analizar los procesos biológicos comprometidos según el tipo de genes regulados al alza o a la baja en los endometrios de pacientes estimuladas con y sin LH.
- Determinar las vías metabólicas en el endometrio según los genes expresados de mujeres estimuladas con y sin LH.
- Comprobar nuestra principal hipótesis: la adición de LH a la estimulación no produce más maduración endometrial prematura ni diferente expresión génica endometrial que la estimulación con solo FSH.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. Diseño del estudio

Estudio prospectivo de 8 donantes de ovocitos sometidas cada una a dos ciclos de estimulación ovárica entre noviembre de 2006 y enero de 2008.

IV.2 Selección de la población

IV.2.a. Criterios de inclusión

Las donantes de ovocitos se seleccionaron de acuerdo con el cumplimiento estricto de los criterios contemplados en la ley de reproducción asistida española (Soares S., 2005) (Muñoz E., 2014).

- Mujeres de entre 18 y 36 años
- Ausencia de exposición reciente o pasada a la radiación, quimioterapéuticos o sustancias químicas peligrosas
- Ausencia de uso de drogas intravenosas
- Normalidad física
- Cariotipo normal
- Normalidad psíquica determinada por una Psicóloga.
- Ausencia de enfermedades de transmisión sexual
- Ausencia de historia familiar de enfermedades cromosómicas o hereditarias.
- Firma del consentimiento informado antes de ser incluidas en el estudio.
- Normalidad ginecológica: ecografía ginecológica; ausencia de miomas, endometriosis, pólipos, serometra o hiperplasia endometrial
- Las donantes debían tener niveles basales de FSH y LH < 10 UI/L y estradiol

de $<0 = 80$ pg/mL (tomadas al inicio de la estimulación, durante los primeros tres días del período menstrual).

Todas las donantes participantes en este estudio tenían gestaciones comprobadas tras un tratamiento de reproducción asistida, por lo que pudieron ser tomadas como individuos control desde el punto de vista de fertilidad.

IV.2. b. Criterios de exclusión.

Fueron excluidas donantes:

- Usuaris actuales o durante los tres meses previos al estudio de DIU.
- Cualquier enfermedad médica sistémica, anomalías endocrinas o metabólicas.
- Sangrado vaginal no diagnosticado
- Antecedente en los últimos tres meses de hábito de fumar con más de 20 cigarrillos por día.
- Hidrosalpinx diagnosticado por histerosalpingografía, ecografía o laparoscopia.
- Historia de enfermedad inflamatoria pélvica o sospecha clínica de endometritis.
- Endometriosis
- Cualquier hallazgo que haga sospechar patología endometrial en la exploración ecográfica.
- Anomalías Müllerianas.

El proyecto de investigación fue aprobado por nuestro comité ético y fue hecho de acuerdo con la declaración de Helsinki, la conferencia internacional sobre la buena práctica clínica según la cual se redactaron y firmaron el consentimiento y la hoja informativa adjuntos (Anexo 1 y 2).

IV. 3. Protocolos de estimulación

Las pacientes recibieron anticonceptivos orales durante el ciclo previo a la estimulación ovárica (Neogynona, Schering, España) y fueron aleatoriamente asignadas para recibir el protocolo de solo FSH recombinante (protocolo FSH) o FSH recombinante + LH recombinante (protocolo FSH + LH). Para la aleatorización usamos un sistema simple de asignación con dos letras distribuidas en grupos de cuatro asociaciones. En ambos protocolos se usó el GnRH- ant el primer día de estimulación. La misma donante fue sometida a un segundo ciclo de estimulación ovárica con el protocolo que no había recibido en el primer tratamiento.

Una donante sólo realizó un ciclo de estimulación y se retiró voluntariamente del estudio, por lo tanto sus datos no fueron analizados.

Protocolo FSH: Se realizó con FSH recombinante (Gonal F®; Merck-Serono, Madrid, España) y cetorelix (Cetrotide®; Merck-Serono, Madrid, España), iniciados el día dos del ciclo menstrual posterior a la toma de la Neogynona. Se usaron 187,5 UI/mL/d de FSHr más 0,25 mg/d de cetorelix. La dosis de FSHr se mantuvo fija hasta el 4to día de estimulación. El día 5to, en caso necesario, se modificó la dosis de FSH según la respuesta ovárica determinada por la foliculometría mediante ecografía transvaginal y los niveles séricos de estradiol.

Protocolo FSH + LH: Se utilizó la misma dosis y esquema de FSHr + cetorelix pero además se inició con 75 UI/d de LH recombinante (Luveris®, Merck-Serono, Madrid, España) desde el primer día de estimulación. Las dos gonadotropinas se modificaron en caso necesario al 5to día de estimulación según respuesta ovárica.

La ovulación se indujo en todo caso con 6500 UI de hCG recombinante (Ovitrelle®, Serono, Madrid, España) en dosis única cuando al menos tres folículos alcanzaron un diámetro medio de 17 mm. La recuperación de los ovocitos se llevó a cabo 36 horas más tarde mediante punción-aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal.

IV.4 Intervenciones

IV.4.a. Mediciones hormonales

Nosotros realizamos un medición de LH, estradiol, progesterona y testosterona en el día de la última píldora de anticonceptivo, al inicio de la estimulación, cada dos días durante la estimulación, el día de la aplicación del hCG, el día de la punción-aspiración folicular (hCG + 2) y cinco días después de la punción (hCG + 7). Las muestras séricas para la medición de las hormonas fueron tomadas siempre en horas de la mañana y fueron analizadas en el Access 2 Inmunoassays System (Beckman Isaza, Madrid, España), un analizador automático que mide una variedad amplia de inmunoassays en diferentes líquidos corporales.

Los inmunoassays son pruebas mediadas por enzimas en las que partículas paramagnéticas se unen a la muestra analizada y un campo magnético separa la muestra unida o no a la enzima mientras un sustrato quimioluminiscente detecta el análisis.

El Kit de estradiol sérico utilizado tiene una sensibilidad de 28 pg/mL y un coeficiente de variación intra e interobservador de 6,6 y 7,7% respectivamente. El kit de progesterona sérica tiene una sensibilidad de 0,2 ng/mL, con una

variación intra e interobservador de 9,6 y 3,9% respectivamente.

Las pacientes recibieron un soporte de fase lútea con la administración diaria de 90 mg de progesterona intravaginal en gel (Crinone®, Merck-Serono, Madrid, España) por los cinco días siguientes a la punción para simular la misma pauta que se utiliza en pacientes de FIV cuando se van transferir embriones.

Las ecografías fueron realizadas por el mismo ginecólogo y además de la foliculometría se evaluó el crecimiento y patrón ecográfico del endometrio.

IV.4.b. Biopsia de endometrio

La recogida de muestras de endometrio se realizó mediante una biopsia endometrial, procedimiento por el cual se toma una muestra de tejido bajo condiciones estériles mediante aspiración del endometrio con una cánula de biopsia (Gynetics, # 4164 Probet-Endometrial Curette-Hamont-achel, Bélgica). Inmediatamente se introdujo a 4°C en una solución tamponada de fosfato (PBS, Sigma), hasta el momento de la manipulación. Las muestras fueron tomadas al momento de la punción-aspiración folicular (hCG + 2) y cinco días después (hCG + 7).

IV.4.b.i. Análisis histopatológico

Las muestras de tejido endometrial fueron fijadas inmediatamente en solución de formalina al 10% para ser analizadas tanto para datación histológica (Criterios de Noyes et al, 1950) como para descartar cualquier patología endometrial (infecciones, etc).

IV. 4.b.ii. Estudio de microarrays.

Los patrones de expresión génica del endometrio en los días hCG + 2 y hCG + 7 se analizaron mediante microarrays (Simón C., 2005).

Se ha procedido a la extracción del RNA de 24 muestras procedentes de las biopsias endometriales. Las muestras procedían de 6 pacientes a las que se les practicaron dos biopsias en los días hCG+2 y hCG+7 en un ciclo de estimulación con solo FSH y otras dos biopsias de un segundo ciclo de estimulación con FSH + LH exógena.

Con respecto al número de pacientes incluidas en cada grupo, en estudios de microarrays el tamaño calculado de la muestra necesario por el método de permutación propuesto asegura al menos tener la sensibilidad deseada con 95% de probabilidad. El método está demostrado para conseguir resultados con una muestra real usando la base de datos de un estudio piloto con 4 a 6 muestras (Lin W.J., 2010) (Humaidan P., 2012)

El diseño del estudio es pues de muestras emparejadas de una misma paciente.

IV.4.b.ii.1. Extracción de ARN total

La parte de las muestras que fueron destinadas al análisis de la expresión génica fueron sometidas en un primer momento a extracción de ARN. Para ello fueron rápidamente resuspendidas en TRIzol (Invitrogen, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones de fabricación, y almacenadas en nitrógeno líquido a -80°C. Para continuar con la extracción del ARN total de dichas muestras, se procedió como se indica en el protocolo.

Tras la adición del TRIzol se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de TRIzol para separar el ARN total del ADN y de las proteínas. Se agitó vigorosamente durante 15 seg. Tras una centrifugación a 13.000 r.p.m durante 15 min y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo donde se le añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de TRIzol utilizado en el paso previo. Se dejó precipitar mediante incubación con isopropanol toda la noche a -20°C. Transcurrida toda la noche centrifugamos la muestra a 13.000 r.p.m durante 12 min a 4°C y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) en agua con dietilpirocarbonato (DEPC). Se volvió a centrifugar por última vez en las condiciones anteriores y el pellet, finalmente, se resuspendió en 30 µL de agua DEPC.

IV.4.b.ii.2. Análisis de la cantidad e integridad del ARN

Terminada la fase de extracción del ARN total, se procedió a la cuantificación y valoración de la integridad del mismo.

Para ello se analiza mediante microgeles una pequeña porción de la muestra. El *software* del bioanalizador genera un electroferograma y una imagen similar a la que se hubiese obtenido al correr un gel de agarosa para comprobar su integridad. Además, proporciona información como la concentración de la muestra y un valor objetivo de calidad conocido como RIN (*RNA Integrity Number*) (Schroeder y cols., 2006). La calidad e integridad del ARN aislado fue evaluada mediante la utilización del kit comercial ARN 6000 Nano LabChip®, usando posteriormente el *software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)* para su cuantificación.

El RIN permite una clasificación del ARN total, basada en un sistema

numérico del 1 al 10, siendo el 1 el más degradado y el 10 el más íntegro. Este sistema permite comparar cuantitativamente la integridad de todas las muestras de ARN del experimento, ya que para que los resultados de microarrays sean comparables todas las muestras deben tener una calidad similar.

Solo las muestras con un RIN superior a 7.0 fueron utilizadas en los experimentos posteriores.

Una muestra de la biopsia endometrial en día hCG +2 tuvo un RIN menor de 7.0 por lo tanto la donante fue excluida del estudio.

IV.4.b.ii.3. Hibridación con microarrays

Una vez obtenidos los RNAs de muy buena calidad fueron hibridados en microarrays personalizados de oligonucleótidos sintéticos de alta densidad para una subpoblación de genes previamente descritos en el endometrio humano (Díaz-Gimeno P., 2011) (*Agilent Technologies*, Madrid, España) que abarcan 238 genes. Los protocolos para la preparación e hibridación de las muestras de endometrio fueron adaptados a partir del protocolo de un color del manual técnico de Agilent. (http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040_One-Color_GE_5.7.pdf).

En resumen, el ADNc de cadena simple fue transcrito a partir de 1 ug de ARN total utilizando como cebador el promotor T7-oligo-dT. Las muestras fueron transcritas *in vitro* y marcadas con Cy-3 (kit de marcaje Quick-AMP de *Agilent Technologies*, Madrid, España). El ARN transcrito a partir del ADNc se denomina ARNc (ARN complementario) y la síntesis genera entre 10 y 15 ug de ARNc. Seguidamente, se realizó una ronda de limpieza con el kit de QIAGEN (QIAGEN, Barcelona, España), y el ARNc se fragmentó en trozos con un rango de 35 a 200 bases, lo cual fue confirmado por el *software*

Agilent 2100 Bioanalyzer technology. Las muestras de ARNc fragmentado (1,65 ug) fueron hibridadas con los microarrays por incubación con rotación constante durante 17 horas a 65°C. A continuación, los microarrays fueron lavados en dos pasos de 1 min y con dos tampones de lavado, con el fin de eliminar los ARNc no unidos de forma específica (solo las moléculas que hibridan permanecerán unidas a su sonda específica en el microarray). Los microarrays hibridados con los ARNc marcados, fueron escaneados en el escáner óptico Axon 4100A (*Molecular Devices*, Sunnyvale CA, EE.UU.) y los datos fueron extraídos con el *software* GenePix Pro 6.0 (*Molecular Devices*, Sunnyvale CA, EE.UU).

IV.4.b.iii. Análisis de datos

IV.4.b.iii.1. Obtención de datos

El *software* GenePix Pro 6.0 se utilizó para el análisis de imagen de los microarrays y el cálculo de las medidas de intensidad de los *spots* (cada uno de los puntos que contiene un conjunto de sondas iguales) los cuales son considerados datos en bruto.

IV.4.b.iii.2. Pre-procesado y normalización de la matriz de datos

El pre-procesado se realizó teniendo en cuenta la mediana de intensidad de cada *spot* sin la substracción del ruido del *background*, para que la tasa de cambio (FC, *Fold Change*) fuera más robusta. Posteriormente,

se hizo una transformación a escala logarítmica (\log_2) de dichos datos. Previo a la normalización, los datos fueron representados en diagramas de cajas para conocer su distribución y eliminar datos microarrays anormales.

La normalización entre los microarrays fue hecha utilizando el método de los cuantiles, implementado con *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/>) "*limma*" *Packaged version 2.14.7*, en R *software* versión 2.7.1 (<http://www.r-project.org/>). A continuación, se hizo la media de las réplicas de la misma sonda, y luego se realizó la media de las sondas pertenecientes a un mismo gen, obteniendo así una matriz de datos con tantas columnas como muestras, y tantas filas como genes originándose una matriz final lista para ser utilizada en los sucesivos estudios.

El *software* del sistema estadístico R fue utilizado como herramienta para estos propósitos y análisis posteriores. El perfil de expresión génica fue determinado mediante la comparación 2 a 2 de los distintos días biopsiados y los diferentes protocolos de estimulación con test no-paramétricos utilizando un criterio para definir los genes que habían alterado la abundancia del ARNm entre los diferentes conjuntos de muestras: una tasa de cambio absoluta de 2,0 o mayor.

IV.4.b.iii.3. Análisis jerárquico

Los datos de expresión se normalizaron por Z-score. La agrupación jerárquica se realizó con el *software* MeV 4.2.02 (<http://www.tm4.org/>) (Saeed A.I., 2003), con un algoritmo de *clustering* jerárquico de unión completa y visualizado mediante el mismo *software*. El algoritmo de correlación de Pearson fue elegido como la medida de similitud.

IV.4.b.iii.4. Análisis funcional de los resultados

Para detectar sobre o infra-representación de los genes diferencialmente expresados con las distintas funcionalidades o rutas biológicas se utiliza la base de datos DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (Dennis G., 2003), un algoritmo basado en un conjunto de genes, el cual detecta genes funcionalmente relacionados y representados de forma significativa en listas de genes ordenados mediante su expresión diferencial. La base de datos DAVID puede buscar bloques de genes funcionalmente relacionados a través de diferentes criterios, tales como los términos del *Gene Ontology* (GO) de los procesos biológicos (BP), las funciones moleculares, (MF), y los componentes celulares (CC), además de las rutas metabólicas (KEGG *pathways*), entre otros (Dennis G., 2003).

IV. 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, SPSS versión 17.0 (SPSS® *Statistical software, an IBM Company, USA*).

Se calcularon las medidas, desviaciones estándar, medianas y rangos de las variables de estudio. Dado el limitado número de casos en algunos grupos, y tras aplicar el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov que demostró la ausencia de distribución normal, para comparar las variables se utilizaron pruebas no paramétricas, U Mann-Whitney para las variables

cuantitativas. Para la comparación de variables categóricas, se calcularon las proporciones y se utilizó el test de χ^2 . Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$ y muy significativo un $p < 0,001$.

RESULTADOS

De las 8 donantes incluidas finalmente analizamos las muestras de 6 donantes, una fue excluida porque voluntariamente se retiró del estudio y sólo realizó un ciclo de estimulación y otra por una muestra de baja cantidad de ARN total (RIN < 7.0).

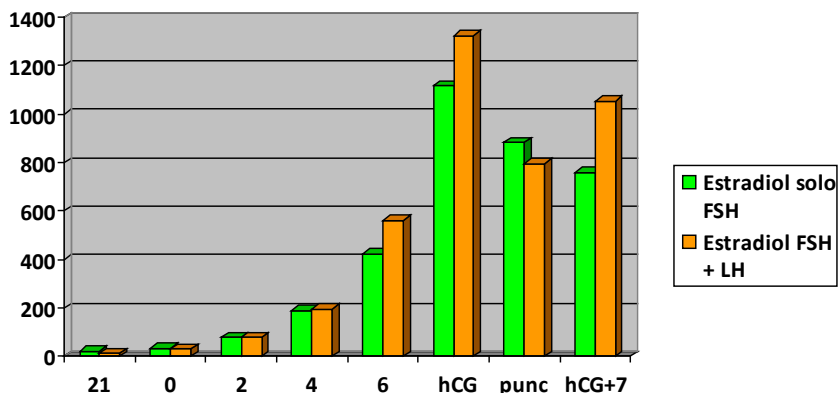
Dado el diseño del estudio donde cada paciente era su propio control, se eliminaron sesgos que pudieran intervenir de la variabilidad intrasujeto. No encontramos diferencias en los niveles de estradiol, progesterona, testosterona o LH entre las estimulaciones llevadas a cabo con FSH sola o con FSH + LH, ni al inicio de la estimulación (día cero), el día de hCG o el día de la punción (tabla 2).

Tabla 2. Valores de esteroides en diferentes días según protocolo con o sin LH

	FSH sola	FSH + LH	P
Estradiol día 0(pg/mL)	33.29 ± 12.98	31.25± 22.78	0.45
Progesterona día 0 (ng/mL)	0.43 ± 0.42	0.88 ± 0.86	0.28
Testosterona día 0 (nmol/l)	0.25 ± 0.1	0.27 ± 0.09	1
LH día 0 (UI/mL)	2.29 ± 2.15	1.38 ± 1.19	0.27
Estradiol hCG (pg/mL)	1117.67 ±437.5	1324 ± 512	0.6
Progesterona hCG (ng/mL)	1.17 ± 0.4	1.25 ± 1.07	0.94
Testosterona hCG (nmol/l)	0.42 ± 0.1	0.45 ± 0.1	1
LH hCG(UI/mL)	0.67 ± 0.57	0.38 ± 0.36	0.93
E2 punción (pg/mL)	883.50± 424.46	797 ± 246.6	0.89
P4 punción (ng/mL)	44.67± 40.24	12.63± 7.97	0.12
T punción (nmol/l)	0.52 ±0.2	0.6± 0.1	1
LH punción(UI/mL)	0.4 ± 0.3	0.25± 0.22	0.20

Tampoco encontramos diferencias en los niveles de estradiol (Figura 8), progesterona (Figura 9), LH (Figura 10) o testosterona (Figura 11); en las mediciones realizadas cada dos días durante la estimulación ni antes del inicio de la estimulación (día 21 del ciclo previo).

Figura 8. Niveles de estradiol sérico durante la estimulación según protocolo. (pg/mL)



Los valores se mantuvieron muy similares durante toda la estimulación hasta el día de la punción.

Figura 9. Niveles de progesterona sérica durante la estimulación según protocolo. (ng/mL)

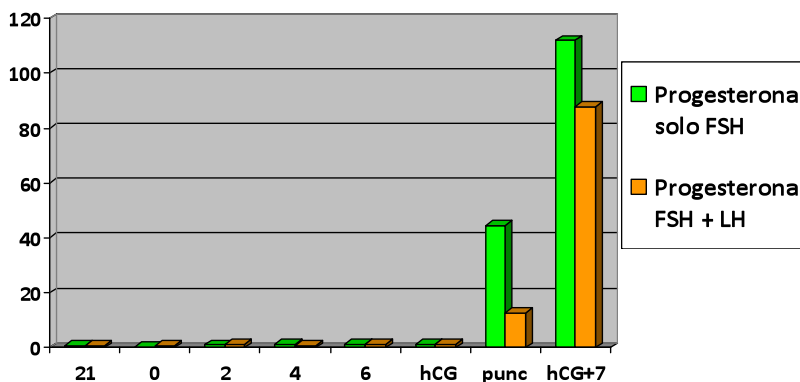


Figura 10. Niveles de LH sérica durante la estimulación según protocolo. (UI/L)

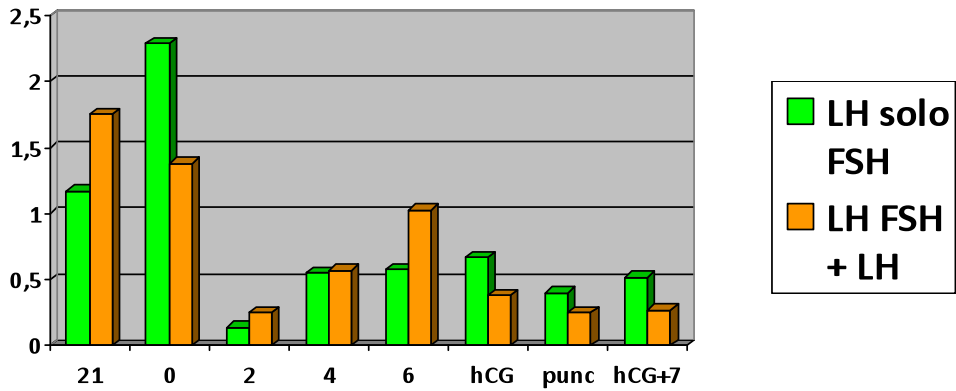
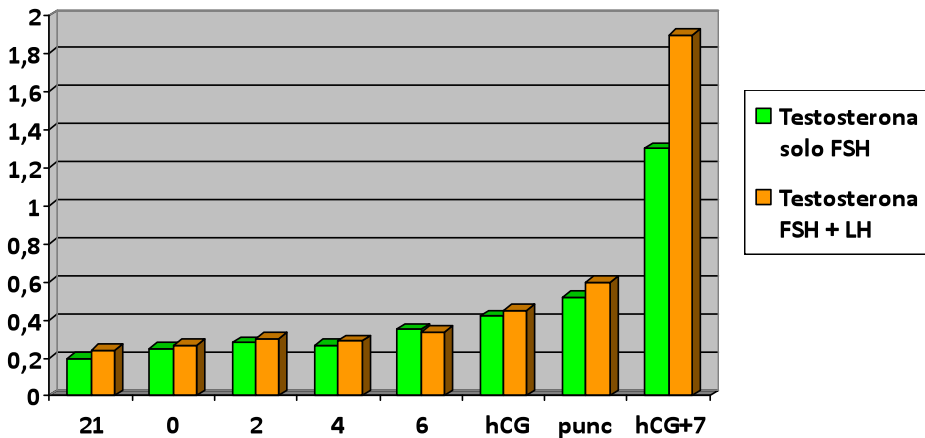


Figura 11. Niveles de Testosterona sérica durante la estimulación según protocolo. (nmol/L)



Finalmente, medimos los niveles de hormonas esteroideas a los 7 días después de la aplicación del hCG coincidiendo con la segunda biopsia de endometrio sin diferencias significativas entre los dos grupos como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 3. Niveles hormonales séricos 7 días después de la aplicación del hCG según protocolo.

	FSH sola	FSH + LH	P
Estradiol (pg/mL)	759.83±443.87	1053.38 ± 518.85	0.19
Progesterona (ng/mL)	112 ± 70.74	87.83± 64.07	0.36
LH (UI/mL)	0.52± 0.09	0.27 ± 0.12	0.46
Testoterona (nmol/L)	1.3 ± 0.3	1.9 ± 0.2	0.593

La dosis total de FSH recibida en los dos grupos no fue diferente, 1617.71 ± 119.33 UI en el grupo de solo FSH y 1668.5 ± 209.24 UI en el grupo de FSH + LH, mientras que la dosis total de LH recibida en el grupo de estimulación combinada fue de 562.5 ± 98.19 UI.

Los días de estimulación fueron similares cuando se usó solo FSH (10 ± 1.15) como cuando se usó FSH + LH (10.75 ± 0.88). El número de ovocitos obtenidos según el protocolo usado tampoco mostró diferencias (19.33 ± 9.07 vs 20.38 ± 7.09 ovocitos, respectivamente).

Las receptoras esperaron la donación similar número de días cuando sus donantes se estimularon solo con FSH o cuando se usó FSH + LH (10.3 ± 1.3 y 15.8 ± 8.4 días respectivamente) y recibieron un número similar de embriones transferidos (1.83 ± 0.4 grupo solo FSH vs 1.75 ± 0.4 grupo FSH + LH).

La tasa de gestación conseguida con los dos protocolos fue similar, 9 gestaciones de 14 donaciones (64.28 % de gestación).

El análisis de datación endometrial mostró que la maduración endometrial prematura es un fenómeno universal el día hCG +2 con una media de adelanto de la madurez de 4.3 días (Día 14 del ciclo: datación endometrial: 18.3 ± 0.4 días) en el grupo de pacientes estimuladas solo con FSH y de 3.8 días (17.8 ± 1.0 días) en las mismas 6 pacientes cuando se estimularon con FSH + LH. Sin embargo, ese adelanto de la madurez desaparece al día hCG +7 en ambos grupos. Hay un adelanto de maduración de 0.5 días (19.5 ± 0.6 días) en el grupo de estimulación con solo FSH y de 1.5 días (20.5 ± 2.0 días) en el grupo de estimulación con FSH más LH.

Los valores de datación endometrial encontrados en las biopsias según el análisis histopatológico del endometrio aplicando los criterios de Noyes son presentados en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Datación endometrial en pacientes estimuladas con solo FSH en días hCG + 2 y + 7.

	hCG + 2	hCG + 7
Paciente1	18 – 19	19 – 20
Paciente 2	17 – 18	19 – 20
Paciente 3	18 – 19	20 – 21
Paciente 4	18 – 19	18 – 19
Paciente 5	18 – 19	19 – 20
Paciente 6	18 – 19	19 – 20

Tabla 5. Datación endometrial en pacientes estimuladas con FSH más LH en días hCG + 2 y + 7.

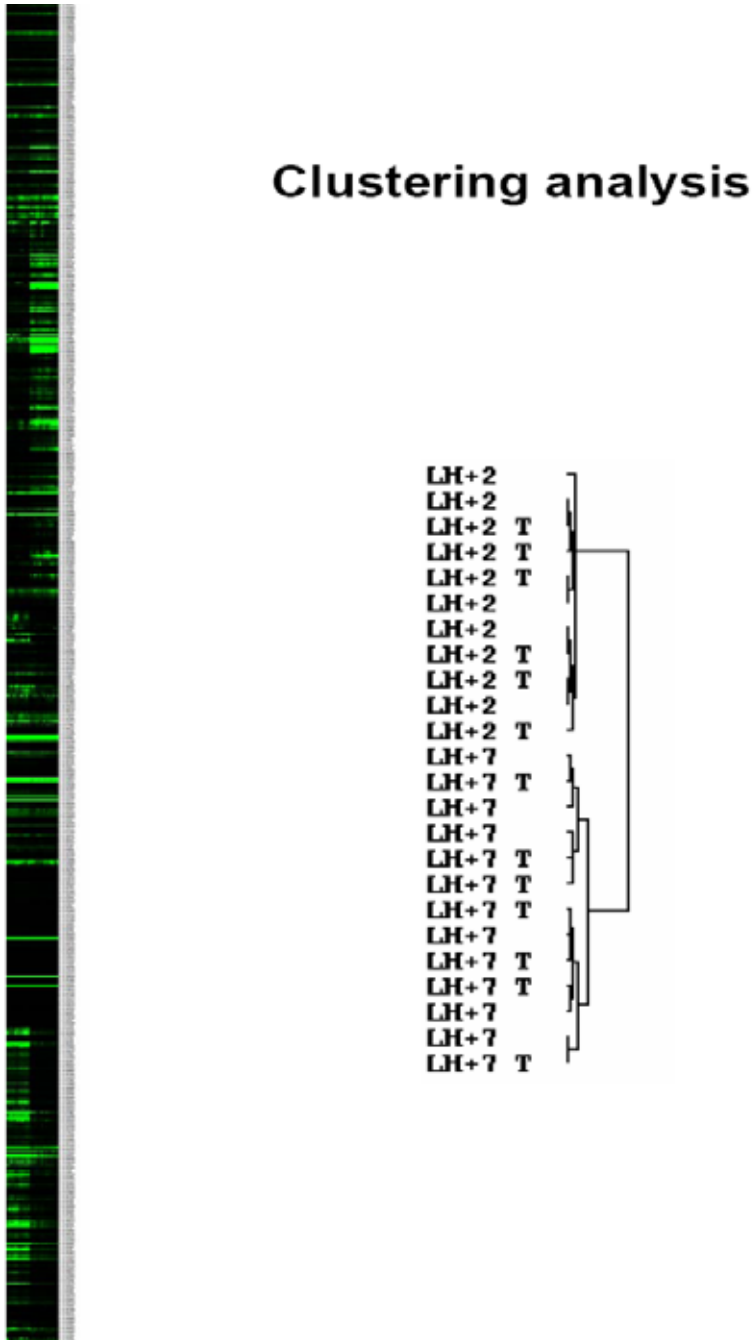
	hCG + 2	hCG + 7
Paciente 1	16 – 17	19 – 20
Paciente 2	18 – 19	18 – 19
Paciente 3	18 – 19	25 – 26
Paciente 4	18 – 19	20 – 21
Paciente 5	16 – 17	18 – 19
Paciente 6	18 – 19	20 – 21

El análisis estadístico comparando la media de días entre los dos protocolos según sean hCG + 2 o hCG + 7 no muestran diferencias estadísticas con una $p=0.296$ el día hCG + 2 y una $p=0.383$ el día hCG + 7.

El análisis genómico realizado mediante microarrays mostró que no existen diferencias entre los dos protocolos (con y sin LH) cuando analizamos paciente a paciente ni el día hCG + 2 ni el día hCG + 7, como tampoco cuando analizamos la suma de los dos días en conjunto. Cuando analizamos el número de genes regulados al alza entre los días hCG +2 comparado con hCG + 7 en los ciclos con solo FSH encontramos 113 genes regulados al alza y 87 genes regulados a la baja. En el ciclo de las pacientes cuando recibieron FSH + LH fueron 114 genes regulados al alza y 94 a la baja.

Cuando el análisis se realizó no paciente a paciente sino todas en conjunto tampoco encontramos diferencias entre los genes hCG + 2, hCG + 7, entre los dos protocolos, pero si es clara la modificación de genes desde el día 2 al 7 después del hCG, como se observa en la figura 12 (Clustering analysis).

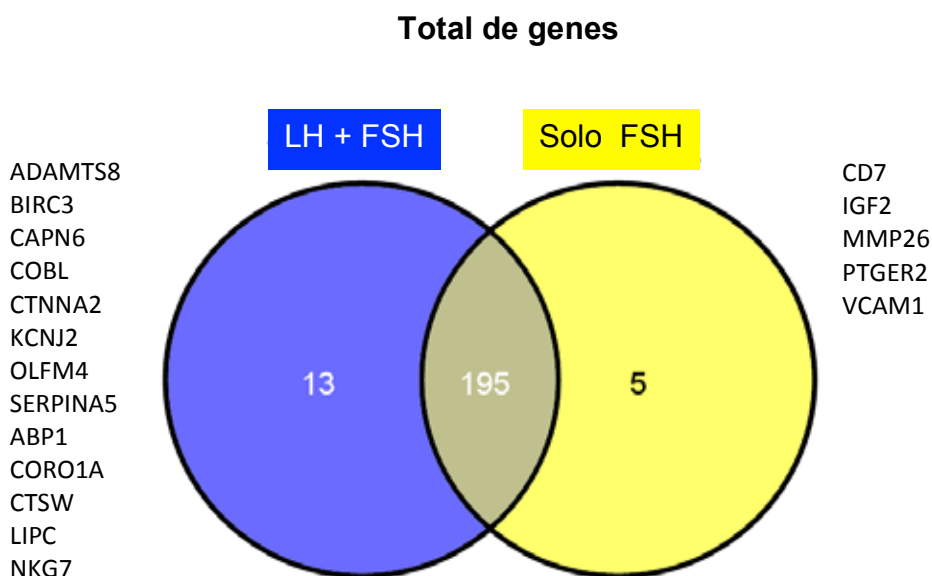
Figura 12. Análisis agrupado de expresión de genes comparados entre los días hCG+2 vs hCG + 7.



RESULTADOS

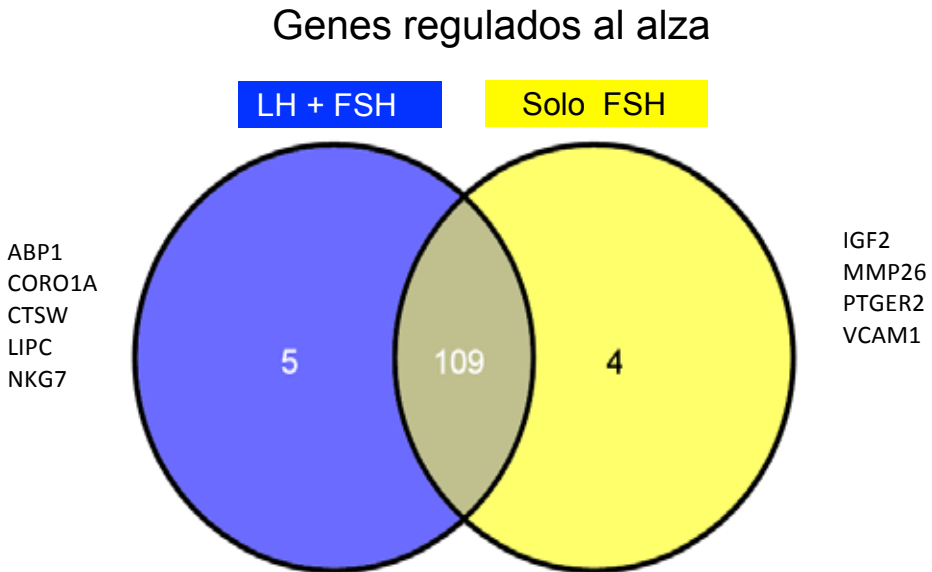
Cuando analizamos el total de genes que se modifican comparando hCG + 2 con hCG +7, en función de si las donantes recibieron o no LH encontramos una coincidencia en 195 genes, mientras que 13 se expresaron solo cuando las pacientes habían recibido LH y 5 cuando solo se habían estimulado con FSH. (Figura 13)

Figura. 13. Total de genes expresados en el endometrio según protocolo con y sin LH



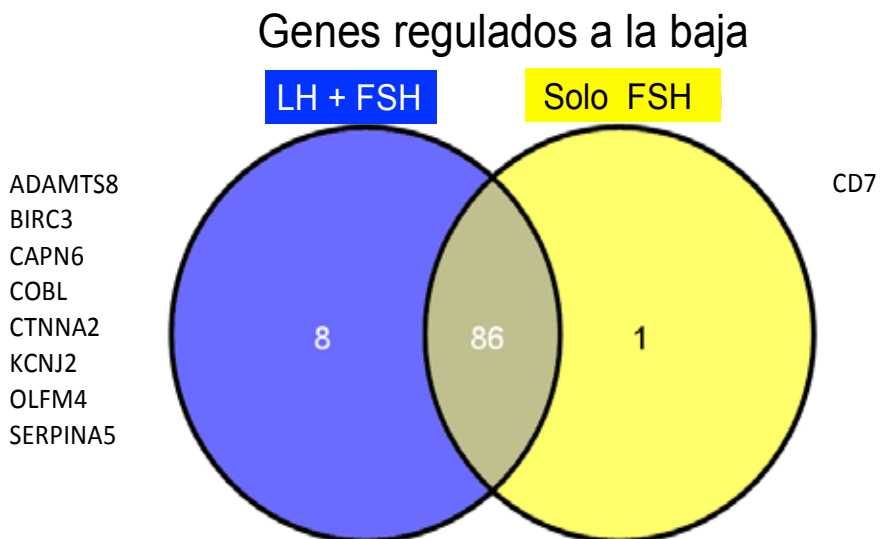
Cuando analizamos los genes regulados al alza encontramos una coincidencia entre los dos protocolos en 109 genes, mientras 5 de ellos solo se presentan cuando estimulamos con LH y 4 cuando lo hacemos solo con FSH (Figura 14)

Figura.14. Genes endometriales regulados al alza según protocolo con y sin LH.



Si analizamos los genes que se regulan a la baja, encontramos una coincidencia de 86 genes, mientras 8 se expresan a la baja solo cuando estimulamos con LH y 1 cuando estimulamos solo con FSH (Figura 15)

Figura 15. Genes endometriales regulados a la baja según protocolo con y sin LH



Utilizando la ontología génica implementada en DAVID nosotros investigamos la sensibilidad biológica de los genes diferencialmente regulados cuando se estimula solo con FSH o cuando se hace con FSH + LH comparando el endometrio en hCG+2 con hCG+7. Analizamos los procesos biológicos, el componente celular, las funciones moleculares y las vías KEGG.

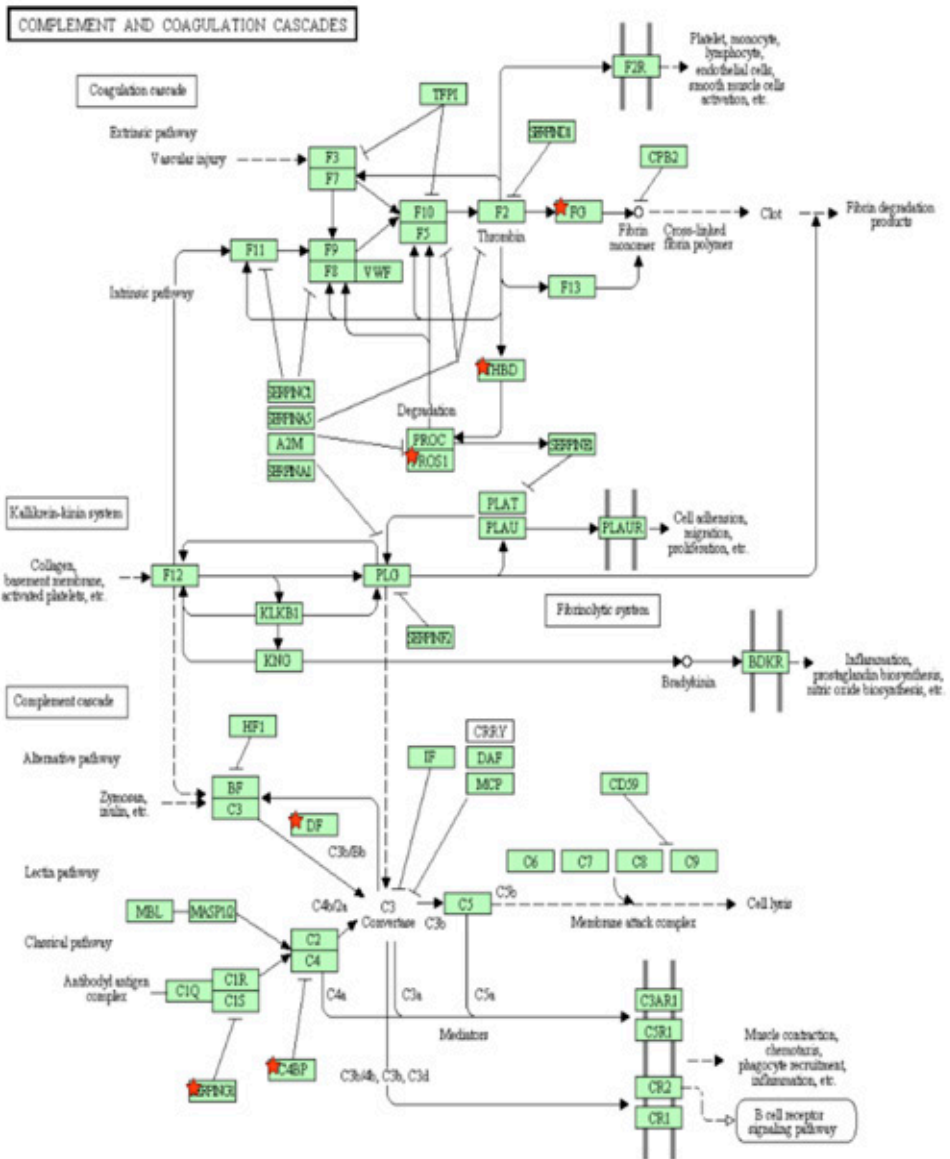
Descubrimos varios procesos sobrerrepresentados con significancia estadística en el caso de estimulación con solo FSH incluyendo; regulación negativa de procesos biológicos, regulación negativa a procesos celulares, respuesta al stress, procesos del sistema inmune, regulación del ciclo celular y respuesta al nivel de nutrientes, entre otros (Tabla 6).

De la misma manera, se expresaron de forma significativa componentes celulares de la región extracelular, la matrix proteínica extracelular, lumen granulocítico plaquetario alfa, el huso meiótico, microtúbulos del citoesqueleto, entre otros (Tabla 6).

Dentro de las funciones moleculares destacan la adhesión por el receptor, la adhesión de las citoquinas y la actividad de la citoquina (Tabla 6).

En el caso de las vías KEGG se sobreexpresa la cascada del complemento y la coagulación, la cual describimos en la Figura 16.

Figura 16. Cascada del complemento y de la coagulación cuando se estimula con solo FSH.



04/10 4/09
(c) Kallestas Laboratories

En el caso de las pacientes tratadas con FSH + LH destacan los procesos biológicos de regulación negativa y la regulación negativa de los procesos celulares, el resto son similares a los descritos en el caso de estimulación solo con FSH (Tabla 7).

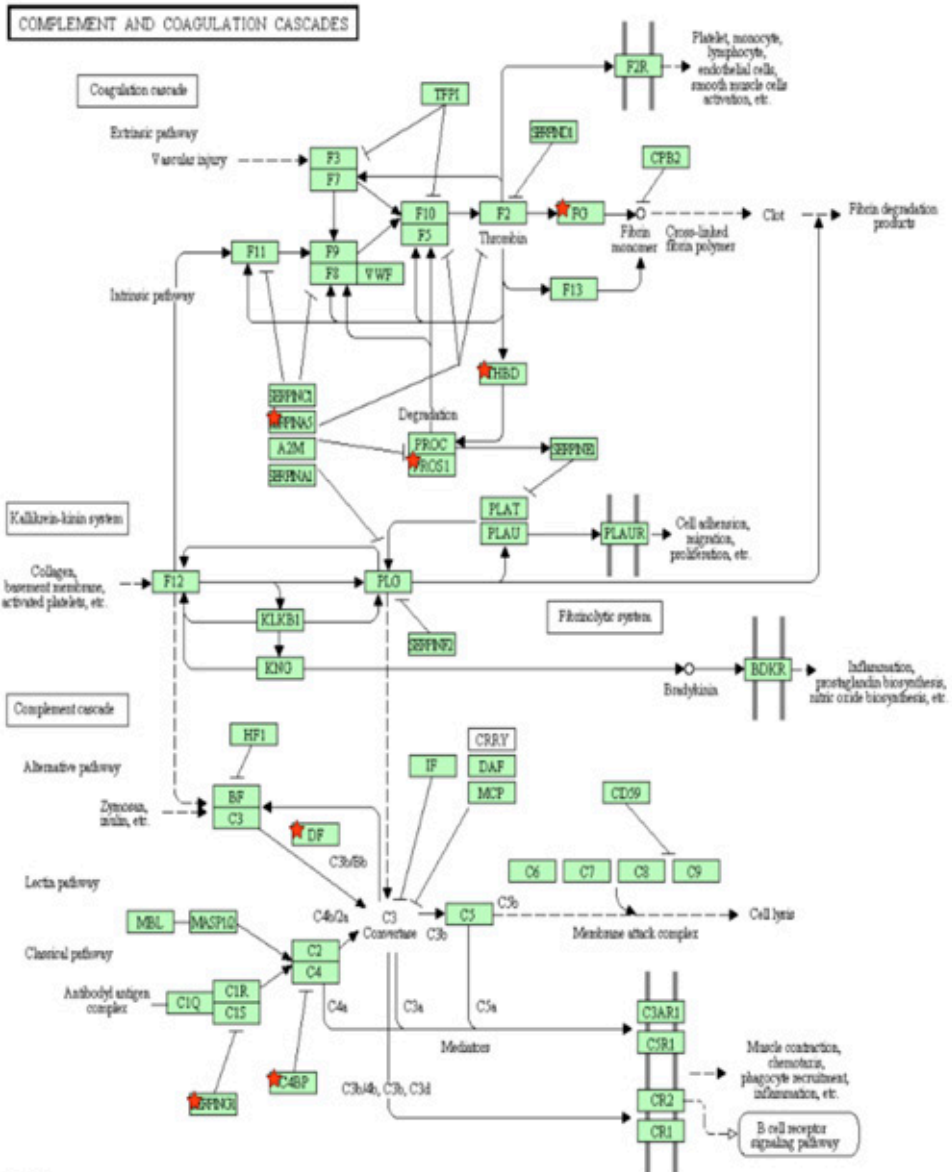
En el mismo sentido, los componentes celulares son los mismos que en caso de estimulación con solo FSH, con ligera variación en el número de genes comprometidos en cada tipo de estimulación (122 genes entre los tres componentes en caso de estimulación con solo FSH y 126 cuando se estimula con FSH + LH) (Tabla 7).

Dentro de las funciones moleculares destacan, la unión a la heparina, la unión al glicosaminoglican, unión a carbohidratos y unión a coenzimas (Tabla 7).

En el caso de las vías KEGG se sobreexpresa la cascada del complemento y la coagulación, con solo una diferencia en el proceso comparado con la estimulación con solo FSH tal como se evidencia en la figura 17.

Un resumen de los distintos genes implicados en los procesos biológicos, los componentes celulares, funciones moleculares y vías metabólicas es presentado en las tablas 6 y 7 de manera discriminada según hayan sido las pacientes estimuladas con FSH sola o la asociación de FSH y LH.

Figura 17. Cascada del complemento y de la coagulación cuando se estimula con FSH + LH



04/10 40/09
© Kaelin Laboratories

Tabla 6. Genes implicados en los procesos biológicos, los componentes celulares, las funciones moleculares y vías metabólicas en pacientes estimuladas con solo FSH.

Categoría	Término	Genes	FDR
Procesos biológicos	negative regulation of biological process	45	0.0
Procesos biológicos	regulation of biological quality	38	0.0
Procesos biológicos	immune system process	27	0.1
Procesos biológicos	response to stimulus	61	0.5
Procesos biológicos	regulation of cell proliferation	21	1.1
Procesos biológicos	cytoskeleton organization	14	2.5
Procesos biológicos	cell differentiation	33	2.6
Procesos biológicos	female pregnancy	7	2.7
Procesos biológicos	enzyme linked receptor protein signaling pathway	12	3.2
Procesos biológicos	regulation of cellular localization	10	3.6
Procesos biológicos	negative regulation of apoptosis	12	4.1
Componentes celulares	extracellular space	27	0.0
Componentes celulares	cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	6	0.1
Componentes celulares	vesicle lumen	6	0.2
Componentes celulares	microtubule cytoskeleton	16	0.9
Componentes celulares	spindle	8	1.2
Componentes celulares	cell fraction	24	1.2
Componentes celulares	secretory granule	8	3.7
Funciones moleculares	receptor binding	26	0.0
Funciones moleculares	coenzyme binding	10	0.2
Funciones moleculares	cytokine activity	10	0.4
Funciones moleculares	cofactor binding	10	2.2
Funciones moleculares	protein binding	108	2.7
Pathways	Complement and coagulation cascades	6	4.4

Tabla 7. Genes implicados en los procesos biológicos, los componentes celulares, las funciones moleculares y vías metabólicas en pacientes estimuladas con FSH y LH

Categoría	Término	Genes	FDR
Procesos biológicos	negative regulation of biological process	49	0.0
Procesos biológicos	regulation of biological quality	39	0.0
Procesos biológicos	developmental process	59	0.3
Procesos biológicos	immune system process	26	0.5
Procesos biológicos	response to stimulus	62	0.8
Procesos biológicos	cytoskeleton organization	15	1.1
Procesos biológicos	female pregnancy	7	3.3
Procesos biológicos	regulation of cell proliferation	20	4.1
Procesos biológicos	Chemotaxis	8	4.9
Componentes celulares	extracellular space	28	0.0
Componentes celulares	cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	6	0.1
Componentes celulares	vesicle lumen	6	0.2
Componentes celulares	microtubule cytoskeleton	16	1.3
Componentes celulares	spindle	8	1.5
Componentes celulares	cell fraction	23	4.3
Componentes celulares	secretory granule	8	4.5
Funciones moleculares	pattern binding	11	0.0
Funciones moleculares	receptor binding	25	0.1
Funciones moleculares	carbohydrate binding	14	0.3
Funciones moleculares	coenzyme binding	10	0.3
Funciones moleculares	cytokine activity	10	0.5
Funciones moleculares	cofactor binding	11	0.7
Funciones moleculares	protein binding	114	0.7
Funciones moleculares	copper ion binding	6	1.5
Pathways	Complement and coagulation cascades	7	0.8

DISCUSIÓN

Nosotros hemos realizado un estudio comparativo de la incidencia de la MEP y hemos analizado la expresión génica endometrial en una misma paciente sometida a dos estimulaciones con y sin LH exógena después de asegurarnos la ausencia del efecto LH endógeno desde el primer día de estimulación ovárica, sin haber encontrado diferencias significativas en su endometrio.

El efecto de las gonadotropinas sobre el endometrio es considerado indirecto, mediado por los cambios que éstas inducen en los estrógenos y la progesterona del ovario. Este concepto se confirma con la experiencia de la donación de ovocitos, en la que se consiguen altas tasas de implantación y gestación en ausencia inducida de gonadotropinas y sólo con la administración de estrógenos y progesterona (Muñoz E., 2015). Sin embargo, el posible efecto directo de la LH sobre el endometrio durante el ciclo ovárico es descrito por algunos autores (Rao C.V., 2001; Shemesh M., 2001).

La MEP es un fenómeno universal en día hCG +2 y se presentó en porcentajes similares cuando se estimula el ovario con solo FSH o con FSH más LH y no encontramos diferente expresión génica en el endometrio entre los dos tipos de estimulación, por lo tanto, podemos afirmar que la adición de LH a la estimulación ovárica no está relacionada con la MEP, pues ésta es un fenómeno universal en nuestras pacientes incluso cuando se estimula exclusivamente con FSH. También podemos concluir que la adición de LH no modifica el patrón génico endometrial comparado con la estimulación con solo FSH. Sin embargo, esa MEP no se mantiene 5 días después (día hCG + 7) sino lo contrario, hay un retraso en madurez del endometrio que tampoco difiere entre los dos protocolos de estimulación. Este hallazgo no

ha sido previamente descrito y desconocemos el mecanismo por el cual se produce, aunque debemos considerar que el endometrio ya no está expuesto a tan altos niveles de esteroides en la primera parte de la fase lútea comparado con la parte final de la fase proliferativa y probablemente el endometrio tenga un mecanismo de autorregulación de su madurez, pero esto permanece solo como una especulación.

La coordinación entre en el embrión y endometrio es un factor clave en el proceso reproductivo. Una coordinación que implica el embrión desarrollado en estado de blastocisto y el correcto desarrollo del endometrio producto del efecto de las hormonas esteroideas. Esta coordinación sucede durante un reducido período de tiempo conocido como la ventana de implantación. Sucede en la mitad de la fase lútea desde el día 19 al 24 del ciclo menstrual y es durante este período cuando ocurre la implantación, (Bergh P., 1992). Esta ventana de implantación parece verse modificada bajo el efecto de la estimulación ovárica para técnicas de reproducción asistida (Martinez-Conejero J., 2007). Como en trabajos previos, nosotros hemos visto claramente una transformación de la expresión génica del endometrio entre los días hCG +2 y los días hCG +7 en ciclos naturales, algo que ha ayudado recientemente a establecer un grupo de genes que solo se expresan durante la ventana de implantación en un endometrio receptivo (Díaz-Gimeno P., 2011). El endometrio se prepara para recibir el embrión mediante el efecto de la progesterona, sufriendo una transformación de su epitelio y una decidualización del estroma (Domínguez F., 2003).

Pero también el endometrio responde a moléculas liberadas por el propio embrión muchas de las cuales han sido extensamente descritas (Krüssels J.S., 2003) tales como las integrinas, las interleukinas, etc. y

hacen que el resultado de este trabajo sea limitado, pues el endometrio no está expuesto al embrión y los genes que se modifican por la presencia del embrión no podemos estudiarlos. Sin embargo, el objetivo de demostrar los cambios de madurez endometrial antes de la teórica exposición al embrión (el día de la punción ovárica) carece de ese sesgo.

La estimulación ovárica se consigue mediante el uso de gonadotropinas asociado al uso agonistas de la GnRH (que actúan como inhibidores de la liberación de la GnRH) para prevenir que los niveles elevados de estrógenos induzcan de forma prematura la liberación de GnRH y la elevación secundaria de LH que produce la ovulación y la transformación de las células de la granulosa en secretoras de progesterona. Estas gonadotropinas clásicamente contienen FSH o FSH más efecto LH. El efecto LH se consigue usando gonadotropina menopáusica humana (hMG) (especialmente derivado de su contenido de hCG) o más recientemente con LH recombinante libre de otros compuestos o efecto hCG (Muñoz E., 2012). El uso de la LH durante la estimulación no está exento de controversia, por una parte se plantea que beneficia cierto grupo de pacientes con edad avanzada (Mochtar M.H., 2007), baja respuesta a la estimulación (De Placido G., 2005) mientras otros grupos no encuentran beneficio en su uso (Kolibianakis E., 2007). El beneficio que la LH puede tener en la estimulación ovárica se fundamenta en la posibilidad de mejorar la esteroidogénesis favoreciendo el correcto aporte de estrógenos desde las células de la granulosa hacia el ovocito, regulando la foliculogénesis al favorecer el crecimiento de folículos de forma sincrónica e inducir la atrofia de los folículos menos desarrollados (Filicori M., 2002a). Recientemente se describe que disminuye los niveles de progesterona sérica evitando la elevación prematura de la misma durante

la fase folicular (Andersen A., 2006), algo que en nuestro estudio no se observa, dado que los niveles de progesterona sérica fue similar en ambos grupos.

En un trabajo aleatorio ciego, que buscaba evaluar los resultados de estimulación ovárica con y sin efecto LH, estudiaron 731 mujeres sometidas a FIV. Un grupo recibió gonadotropina altamente purificada (n: 363) y otro grupo recibió FSH recombinante (n: 368). Los niveles de estradiol fueron más bajos y los de progesterona ($p < 0,001$) más altos en el día de aplicación del hCG en el grupo de FSH recombinante comparado con el grupo de hMG que a diferencia de la FSH recombinante, posee actividad LH. Los niveles de progesterona sérica son importantes porque explicarían en teoría, al menos de forma parcial, la madurez que precozmente sufre el endometrio durante la parte final de la fase folicular o secretora temprana cuando se expone a la estimulación ovárica. En este trabajo se plantea la hipótesis que la progesterona en la fase folicular es producida tanto en las células de la Teca como de la Granulosa y que la progesterona producida en las células de la Granulosa en respuesta a la FSH, en ausencia de LH no puede ser metabolizada a andrógenos y es derivada a la circulación. Mientras, la progesterona producida en las células de la Teca, continuarán su metabolismo a andrógenos para su posterior aromatización a estrógenos (Andersen A., 2006).

Otra teoría que pretende explicar la elevación de la progesterona de forma prematura, es que se deba a un excesivo número de folículos y que cada uno produzca una cantidad normal de progesterona durante la fase folicular tardía sin que se haya producido una luteinización prematura en las células de la granulosa (Venetis C.A., 2007). La producción de progesterona

de forma precoz, no parece estar relacionada con el tipo de análogo de la GnRH (agonista o antagonista) que se utilice, como ha sido demostrado recientemente (Papanikolaou E, 2013).

Por otra parte, se podría plantear que la adición de LH se tradujera en un mayor riesgo de “luteinización prematura inducida” por el aporte LH exógeno algo que de acuerdo con nuestros hallazgos, no se confirma no solo porque no hay diferencias en los niveles séricos de progesterona sino porque en ningún caso se elevó la progesterona por encima del umbral de luteinización. Los niveles de LH sérico no difieren con la adición de LH exógena (a esta dosis) y además el efecto endometrial en términos de MEP o expresión génica no difiere cuando se estimula con o sin LH. El término “luteinización prematura” no parece ser adecuado, como se demostró previamente ya que el incremento de progesterona sérica puede suceder con niveles disminuidos de LH sérica (Bosch E., 2003) (Schoolcraft W., 1991) y en nuestro caso además se demuestra que el impacto de la estimulación ovárica sobre la MEP, no requiere de la elevación de la LH ni de la progesterona, coincidiendo con otros autores (Marchini M., 1991). Nosotros demostramos que aún en ausencia de elevación de la progesterona sérica la MEP es un fenómeno muy frecuente que no se ve influida por la asociación o no de LH a la estimulación ovárica. De tal manera que podemos especular con dos posibilidades, la MEP depende solo de la elevación del estradiol haciendo que los receptores de progesterona se hagan más sensibles a la progesterona como ya ha sido planteado (Jacobs H.M., 1987) o las gonadotropinas por sí mismas actúan sobre el endometrio madurándolo de forma prematura, esto es poco probable por la ausencia de pruebas concluyentes. El efecto endometrial directo que tienen las gonadotropinas está poco estudiado pues

la mayoría de los estudios se centran en el efecto indirecto mediado por los esteroides ováricos secundarios a la propia estimulación. Están descritos receptores de la LH además de en las diferentes células del ovario (Teca, Granulosa, células intersticiales), en el endometrio, cérvix y epitelio tubárico, pero su funcionalidad es poco conocida (Kornyei J., 1993).

En estudios de experimentación con ratones knockout para receptores de LH se demuestra que el útero no puede prepararse para el embarazo (Lei Z.M., 2001), por lo tanto el efecto que tiene la LH sobre el endometrio es evidente, pero durante la estimulación ovárica permanece como un enigma. En busca de la aplicación clínica que pueda tener la LH sobre el endometrio, un trabajo realizado en receptoras de ovocitos demuestra que la administración de hCG incrementa el grosor endometrial y favorece la implantación embrionaria (Tesarik J., 2003). Sin embargo este estudio es realizado con hCG, que a pesar de actuar sobre el mismo receptor, no es exactamente la misma hormona que la LH. Por otra parte la exposición prolongada a hCG afecta negativamente la receptividad endometrial como lo demuestra la regulación a la baja de los receptores LH-CG en células epiteliales de endometrio expuestas a dosis bajas de hCG (Evans J., 2013). La adición de dosis bajas de hCG en casos de supresión profunda de LH en protocolos con GnRH-ant parece mejorar las tasas de implantación y los autores especulan con un doble efecto, mejorando la competencia ovocitaria y por una reducción de la apoptosis de células estromales endometriales (Prost A., 2011).

En un estudio del efecto de la estimulación ovárica para FIV sobre la histología del endometrio y la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona en 11 mujeres infértiles a quienes se les tomó biopsia endometrial en ciclo natural (al inicio del pico de LH) y en el ciclo de

estimulación el día de la hCG, demuestra que la expresión de los receptores de progesterona en el ciclo estimulado, están regulados al alza comparado con el ciclo natural tanto en el epitelio como en el estroma. No se observaron cambios secretorios en endometrio estimulado, pero si un adelanto en la maduración similar al correspondiente a los primeros días de la fase lútea del ciclo natural. Por lo tanto, se deduce que el efecto endometrial de la estimulación altera el perfil de los receptores esteroideos, facilitando una MEP en ausencia de elevaciones de la progesterona (Papanikolaou E., 2005).

Por otra parte, nosotros hemos utilizado un esquema de estimulación con GnRH-ant de forma diferente a los dos convencionales en los que el antagonista se adiciona a la estimulación ovárica en dosis diarias o dosis única cuando el folículo dominante alcanza los 14 mm o de forma fija al 6to día de estimulación. Nosotros hemos empezado con el GnRH-ant desde el primer día de estimulación (Kolibianakis E., 2003, 2004b) y aunque este protocolo no difiere de los convencionales en tasas de fecundación, implantación y embarazo evolutivo (Kolibianakis E., 2003), no hay estudios que describan el efecto endometrial de este protocolo. Esto es especialmente relevante si consideramos que el endometrio tiene receptores para la GnRH (Grundker, 2002) y que la histología del endometrio el día de la recuperación de ovocitos está relacionada con los niveles de LH al inicio de la estimulación y con la duración de la estimulación con FSH antes de la adición del GnRH-ant (Kolibianakis, E., 2002a). En nuestro estudio los niveles de LH fueron controlados por el efecto de los antagonistas y por la luteólisis inducida por los anticonceptivos orales durante el ciclo previo a la estimulación y la duración de la estimulación antes de la adición del antagonista fue nula porque

empezamos simultáneamente la estimulación con el GnRH-ant, a pesar de ello seguimos encontrando una alta frecuencia de MEP. Los niveles de LH y estradiol antes de la adición del antagonista parecen relevantes como se demostró en un estudio donde se correlacionaron negativamente con la tasa de gestación evolutiva (Kolibianakis, E. 2003a). Hay actualmente un amplio debate sobre la conveniencia o no de usar anticonceptivos orales durante el ciclo previo a la estimulación. Una de las razones es el impacto negativo que pueda tener sobre el endometrio. Un reciente estudio demuestra que no existe diferencia en el endometrio en el incremento o disminución de la expresión génica con el uso o no de anticonceptivos orales (Bermejo A., 2014). Este estudio utilizó el test ERA como medio de evaluación de la receptividad endometrial (Ruiz-Alonso M., 2014)

Un estudio de histología endometrial en fase lútea y niveles de progesterona antes de la recuperación de los ovocitos demostró que no existe diferencia entre el uso de agonistas y GnRH-ant (Saadat P., 2004). La receptividad endometrial no parece alterarse por el uso de los análogos de la GnRH (ago o antagonistas) como se ha comprobado al demostrar la ausencia de modificación en la expresión in vivo de HOXA 10 en células endometriales de mujeres sometidas a estimulación ovárica (Taylor H.S., 1998) y en un estudio piloto en el que se administró cetorelix en un ciclo natural modificado (estimulando con 150 UI de FSH al mismo tiempo que con el antagonista GnRH) y se consiguió una tasa de gestación por transferencia del 32% descartando un efecto adverso de los antagonistas sobre la receptividad endometrial (Rongières-Bertrand C., 1999). Aunque está demostrada una variación de la expresión génica cuantitativa de la GnRH en el endometrio durante el ciclo menstrual (Raga F., 1998), parece

que los antagonistas no activan el receptor de GnRH (Mannaerts B., 2000) y no tienen un efecto directo sobre las células endometriales en cultivo in vitro (Meresman G.F., 2003).

Recientemente, se ha demostrado que la administración de GnRH-ant en la preparación del endometrio de receptoras de ovocitos consigue similares resultados que la preparación con agonistas de depósito, confirmando que los antagonistas no afectan la receptividad del endometrio cuando se aplican durante los primeros días de preparación endometrial que coincidirían en nuestro caso con la fase folicular (Prapas N., 2009).

Los niveles de LH en suero durante la estimulación no correlacionan con la probabilidad de gestación evolutiva, como quedo demostrado en un estudio reciente de 96 pacientes sometidas a estimulación ovárica con GnRH-ant a quienes se les midió los niveles séricos de LH los días 3, 6, 8 y el día de la aplicación del hCG demostrando que ni la implantación ni la gestación se modifican en relación con los niveles de LH.(Bosch E., 2005). La teoría de las dos células, dos gonadotropinas podría explicar por qué altos niveles de LH puedan llevar a una MEP el día de la aplicación del hCG con base en los mecanismos de activación operantes entre el ovario y el endometrio (de Ziegler D., 1995). Una incrementada concentración de LH al inicio de la estimulación lleva a unos niveles incrementados de estrógenos producidos en las células de la granulosa gracias a la FSH, una aumentada producción de andrógenos por las células de la Teca, lo que se traduce en un aparición temprana de receptores de progesterona en el endometrio (Bouchard P., 1991). En nuestro estudio donde bloqueamos la LH endógena desde el inicio de la estimulación, no encontramos diferencias entre los dos grupos en sus niveles de LH sérica durante la estimulación, el

día de la extracción de los ovocitos, el día de la punción (hCG +2) o cinco días después (hCG + 7). Por lo tanto, podemos especular que la adición de LH en la dosis de 75 UI/d no modifican los niveles séricos de LH como previamente ha sido demostrado (Bosch E., 2005). Estudios previos han demostrado una correlación entre los niveles de LH y la progesterona sérica durante la estimulación ovárica (Hugues J.N., 2011), sin embargo otros no encuentran dicha correlación (Bosch E., 2003), aunque no se debe olvidar que la medición sérica no siempre es reflejo de la bioactividad de la hormona.

Los niveles de progesterona más bajos durante el ciclo ovárico coinciden con la menstruación debido a la luteólisis. Sin embargo, una luteólisis incompleta puede verse en el 5% de las pacientes y en este caso su estimulación está asociada a niveles más altos de progesterona durante la fase folicular, niveles más bajos de estradiol y una tasa de gestación más baja como se demostró en un estudio de 20 pacientes en los que el inicio de la estimulación se retrasó hasta dos días en espera que disminuyera la progesterona sérica, sin que se consiguiera mejorar los resultados de gestación (Kolibianakis, 2004a). Nosotros nos aseguramos la luteólisis mediante el uso sistemático de anticonceptivos orales durante el ciclo previo a la estimulación ovárica y en ningún caso encontramos progesterona elevada al terminar los anticonceptivos orales y aunque los niveles de estradiol rozaron la significancia estadística al comparar los dos grupos, en ningún caso se preservó la actividad del cuerpo lúteo pues la progesterona fue menor de 0.8 ng/mL en ambos grupos y el estradiol no superó los 87 pg/mL. Pero más importante aún es que el día de la estimulación ovárica en ambos grupos el estradiol estuvo por debajo 23 pg/mL, algo que confirma la ausencia de actividad ovárica residual del ciclo previo.

La dosis de FSH utilizada fue similar en ambos grupos y aunque algunos grupos plantean que la luteinización precoz es un fenómeno asociado a la dosis de FSH (Filicori M., 2002, Bosch E., 2010) o la duración de la estimulación previa a la administración del GnRH-ant (Kolibianakis E., 2004), en un metanálisis acerca del valor de la elevación de la progesterona el día de la administración de la hCG, no se encontró diferencias en la dosis de FSH ni la duración de la estimulación en los grupos de pacientes con y sin luteinización precoz (Venetis C.A., 2007). Sin embargo, en ese mismo metanálisis encuentra que los niveles de estradiol están significativamente elevados en los pacientes que presentan luteinización precoz comparado con aquellos que no. Nosotros no encontramos diferencias en los niveles de estradiol entre los dos tipos de estimulación, aunque hubo una ligera tendencia a mayores niveles cuando se estimula con solo FSH el día de la aplicación del hCG y durante los días previos sucedía justamente al contrario. Los niveles de estradiol eran ligeramente mayores en el grupo de FSH + LH durante los días de estimulación previos a la aplicación del hCG, pero en ningún caso con diferencias estadísticas, algo especialmente importante porque en los dos grupos se usó la misma dosis diaria de FSH (187.5 UI/d). Por lo tanto podemos confirmar que la adición a mayores de 75 UI/d de LH no modifica los niveles de estradiol. Tampoco hubo diferencias en los niveles de progesterona sérica el día de la administración de hCG entre ambos grupos, en ninguno de los casos encontramos niveles de progesterona por encima de 1,96 ng/mL. Los valores de estradiol fueron contrarios a los descritos en un estudio comparativo aleatorio ciego con un mayor número de pacientes en el que encontraron que después de administrar 225 UI diarias durante 5 días de rFSH tenían niveles más altos que con 225 UI de HP-hMG en protocolo

de agonistas de la GnRH, y al final de la estimulación sucedió al contrario. De cualquier manera ese trabajo es diferente en aspectos como el tipo de fármacos o el protocolo utilizado (agonistas de GnRH y HP-hMG) (Andersen A., 2006). Nosotros escogimos la dosis de 187.5 UI/d, un poco mayor a las 150 UI/d recomendada en pacientes con un adecuado recuento de folículos antrales basados en el temor de una mayor supresión ovárica inducida por el comienzo precoz del GnRH-ant y según experiencias previas (Kolibianakis E., 2003, 2004b). Esta decisión parece haber sido acertada porque no cancelamos ninguno de los ciclos, el resultado de los ciclos de estimulación en cuanto al número de ovocitos recuperados, días de estimulación, niveles de estradiol o frecuencia de síndrome de hiperestimulación ovárica, así como la tasa de gestación alcanzada en las receptoras de estas donantes no fue diferente al descrito en nuestra experiencia con protocolos convencionales (Melo M.A, 2006).

La elevación prematura de la progesterona ha sido asociada a un incremento en los niveles de andrógenos en plasma en respuesta a la estimulación con hMG y debida a su efecto sobre las células de la Granulosa y de la Teca (Cedars M.I., 1990). En ese mismo sentido, se ha demostrado un incremento en los niveles de andrógenos de forma transitoria después de la administración de hMG que culmina 12 a 15 horas después de la misma, asociado a un incremento de los niveles séricos de progesterona. (Fanchin R., 1995). Sin embargo, este estudio es solo con 9 pacientes y con un control histórico para determinar los valores de corte para la progesterona sérica. Además, toman como punto de corte para la elevación sérica de progesterona niveles de 0.9 ng/mL sin que se determine si efectivamente ese valor se corresponde con un valor estadísticamente alejado de la media. En

nuestro estudio no encontramos diferencias en los niveles de testosterona durante toda la estimulación cuando se estimulaba con FSH + LH o cuando se hacía solo con FSH y nosotros usamos GnRH-ant, mientras el estudio referido usaba agonistas de la GnRH.

La importancia de los andrógenos séricos o en líquido folicular, radica en que son metabolitos intermedios en la biosíntesis de los estrógenos y gestágenos, sin embargo, podrían ellos por si mismos actuar sobre el endometrio a través de su propio receptor. En un estudio sobre la expresión de los receptores de andrógenos en el endometrio fueron estudiados en 30 muestras durante diferentes fases del ciclo menstrual. La expresión de los receptores en las células estromales disminuyó gradualmente desde la fase proliferativa temprana hasta la fase secretora media y aunque en la fase secretora tardía estaba presente en todas las células endometriales parece que existiera una menor expresión de los mismos (Mertens H.J., 2001). Debido a la falta de variación en las concentraciones de testosterona entre los dos protocolos nos es imposible determinar si los niveles de éste andrógeno están implicados en la MEP.

El valor de progesterona por encima del cual debe considerarse una luteinización prematura debe ser calculado según la sensibilidad y especificidad del método empleado para determinar los niveles séricos de progesterona, además de calcular la media de progesterona en una muestra representativa. Aquellos valores que excedan dos desviaciones standard por arriba de la media se consideran elevados y en nuestro estudio después de analizar 2144 muestras de pacientes de nuestra clínica usando el Access 2 Inmunoassays System (Beckman Isaza, Madrid, España) encontramos como media de progesterona sérica; 1.17 ng/mL como desviación standard;

0.654, por tanto dos desviaciones standard y valor encima del cual debemos considerar una luteinización precoz es de 1.96 ng/mL.

Las pacientes recibieron la progesterona en las dosis convencionales como suplemento durante la fase lútea similar al usado en un ciclo de FIV convencional, de esta forma podíamos medir el efecto de la estimulación como si se tratara de pacientes que iban a recibir embriones fresco durante una FIV (Fatemi H.A., 2007) (Muñoz E., 2013).

El endometrio puede evaluarse mediante diferentes métodos incluyendo la biopsia de endometrio en el que se estudian marcadores morfológicos para estudiar el fechado o datación endometrial, marcadores bioquímicos o patrones de expresión génica. También se puede estudiar mediante imágenes con la ecografía bi o tridimensional (Raga F., 1999) o de forma directa mediante la histeroscopia o mediante el lavado uterino.

La interpretación de la biopsia de endometrio mediante la anatomía patológica convencional en busca de marcadores de datación endometrial es muy cuestionada como se demuestra en un estudio reciente en mujeres fértiles e infértiles (Coufaris, 2004). La datación histológica del endometrio basada en el estudio de tejido obtenido a través de la biopsia no parece útil en la evaluación de las parejas estériles según las recomendaciones del comité practico de la ASRM.(The Practice committee of ASRM, 2006). Sin embargo, muchos trabajos previamente han usado esta técnica para evaluar el efecto que sobre el endometrio tiene la estimulación ovárica (van der Gaast M.H, 2009). En estos casos, el día de la recuperación de los ovocitos, coincidiría con la ovulación y por tanto se considera el día 14 del ciclo de menstrual (Lass M., 1998).

La MEP se define como un adelanto en la maduración convirtiendo

un endometrio proliferativo en secretor o un secretor inicial en secretor medio lo cual se traduce en algunos casos en imposibilidad para conseguir la gestación como se ha descrito en varios estudios (Ubaldi F., 1997; Lass A., 1998, Kolibianakis E., 2002a). El efecto que la estimulación ovárica con FSH sobre la madurez del endometrio ha sido descrito hasta en el 100%, como en el estudio de 55 pacientes a quienes se les tomó una biopsia de endometrio el día de la recuperación de los ovocitos encontrando una media de $2,5 \pm 0,1$ días y una asociación con altos niveles de LH al inicio de la estimulación y una mayor duración de la estimulación con FSH antes de la adición del GnRH-ant (Kolibianakis E., 2002a). En este mismo trabajo clasifican la MEP según el número de días de avance en la madurez y describen que en caso de maduración endometrial superior a 3 días (extreme endometrial advancement), no se consigue gestación, de acuerdo con otros autores (Ubaldi F., 1997). Si bien, el avance en la maduración endometrial se ha descrito desde antes de la aplicación del hCG (Marchini M., 1991), nosotros desconocemos en nuestro estudio a partir de qué momento empieza a desencadenarse ese aumento de la MEP. En caso de transferencias embrionarias en día 2-3 de vida del embrión, en las que el endometrio podría estar prerreceptivo, esta MEP puede ser beneficiosa como se plantea en un estudio de 22 pacientes normales estimuladas con HMG pero en quienes la transferencia embrionaria no se realizó. En la biopsia de endometrio se encontró que en 11 de ellas había un patrón endometrial avanzado, lo que teóricamente facilitaría la implantación embrionaria (García J., 1984).

La frecuencia de la MEP es variable según un estudio de 33 pacientes en quienes después de una estimulación para FIV, el ciclo debió ser cancelado por la presencia de un pólipo endometrial, que permitió el

análisis del endometrio para datación. En 15 pacientes (45,5%) el endometrio estaba en fase, en 15 (45,5%) el endometrio estaba avanzado en 2-4 días y en 3 (9%) el endometrio estaba retrasado. En este trabajo, la menor edad y el mayor número de ovocitos recuperados, correlacionó con el endometrio avanzado (madurado tempranamente) (Lass A., 1998). La MEP no parece relacionada con la calidad embrionaria como quedó demostrada en donantes de ovocitos en ciclos estimulados con agonistas de la GnRH sin afectar la viabilidad endometrial (Chetkowski R.J., 1997). Un estudio usando diferentes protocolos de inducción de ovulación demostró una MEP en el 85% de los casos y asociado a la elevación de la progesterona sérica (Sharma V., 1990). Por el contrario, el retraso en la maduración del endometrio está menos descrita, aunque estuvo asociada en dos estudios a la edad avanzada de la mujer (Sterzik K., 1988 y Lass A., 1998).

Un aspecto interesante es ver cómo se comporta el endometrio durante la fase lútea en los días siguientes a la recuperación de los ovocitos (hCG +2 en adelante). Nosotros evaluamos dos momentos del ciclo endometrial desde un estado prerreceptivo (hCG +2) y uno receptivo (hCG +7). En este sentido si vemos una MEP en porcentajes tan altos como en el 100% de los casos (Kolibianakis, 2002a), no es fácil de explicar que haya un porcentaje alto de implantaciones embrionarias o de gestaciones evolutivas a pesar de ello. Nosotros analizamos el comportamiento del endometrio a los 7 días de la hCG, y observamos que el porcentaje de MEP descrito al día hCG + 2, prácticamente desaparece. Hubo solo una paciente (de 6) en el grupo de estimulación con solo FSH y dos (también de 6) en el grupo estimulación con FSH + LH que tuvieron el endometrio con un adelanto de la madurez de un día. Una paciente del grupo de estimulación con FSH

+ LH tuvo un adelanto de la madurez superior a dos días. En el resto de pacientes (5 en el grupo de solo FSH y 3 en el de FSH + LH), el endometrio se encontraba en fase de receptividad.

En un trabajo previo describen la desaparición de la MEP cuando se evaluó el endometrio en la misma paciente 7 días después de la recuperación de ovocitos (Kolibianakis E., 2003b). Mientras que otros grupos describen que la MEP el día de la recuperación de ovocitos tiene un efecto directo en el estado endometrial durante la ventana de implantación (Saadat P., 2004). Nosotros vimos que algunas las biopsias tomadas 5 días después de la extracción de los ovocitos (hCG + 7) se encontraban en fase y en aquellas que no lo estaban, ese adelanto de la madurez había desaparecido. Al igual que otros grupos, encontramos que la MEP parece ser un fenómeno transitorio o menos relevante al momento de la implantación embrionaria.

Con la idea de bloquear el efecto de la LH endógena nosotros utilizamos un protocolo diferente al convencional administrando el GnRH-ant desde el primer día de estimulación ovárica. Demostramos que este protocolo no interfiere con las tasas de recuperación de ovocitos y su funcionamiento en el laboratorio (tasa de fecundación y división embrionaria similar a descrita en otros estudios) así como las tasas de gestación en las receptoras de esos ovocitos. Esto coincide con otros estudios que comparan el protocolo de agonistas de la GnRH con el inicio desde el primer día de estimulación del GnRH-ant en pacientes con ovario poliquístico (Lainas T., 2007).

El negativo impacto que la estimulación ovárica tiene sobre el endometrio está demostrado a nivel endocrinológico durante la fase lútea (Beckers N., 2003), a nivel de histología endometrial periovulatoria (Devroey P., 2004), a nivel de implantación embrionaria (Simon C., 1995), a nivel de marcadores tisulares

de receptividad endometrial (van der Gaast M., 2008) y más recientemente a nivel génico (Martinez-Conejero J., 2007). Un trabajo con 21 pacientes normo-respondedoras a quienes se les practicaron biopsias endometriales en ciclos naturales (LH+2 y +7) y en ciclos estimulados (hCG + 2 y +7), demuestra que bajo estimulación ovárica el endometrio tiene un perfil de receptividad alterado y altera funciones biológicas como la señal del TGF β , la migración transendotelial de los leucocitos y el ciclo celular (Haouzi D., 2009).

Nosotros ampliamos nuestro objetivo con el uso de la tecnología de microarrays en el análisis del endometrio. El contar con una misma paciente a quien se le tomó dos biopsias (hCG +2 y + 7), sometida a dos protocolos distintos con la misma dosis de FSH hace de este análisis exento de variabilidad intersujeto.

Cada fase del ciclo endometrial está controlada por muchos genes que son regulados por factores paracrin, endocrin y autocrin. Los genes alterados incluyen diferentes funciones biológicas: transcripción y biosíntesis. En el presente estudio nosotros no encontramos diferencias en la expresión global ni individual de los genes en el endometrio previamente descritos como clave en la implantación embrionaria cuando las pacientes son estimuladas con FSH o FSH más LH.

Un estudio previo de 47 pacientes a quienes se les tomó una biopsia el día de la recuperación de ovocitos demuestra que en todas las pacientes se observa un adelanto de la madurez endometrial entre 2 a 4 días y además hacen un análisis de expresión génica endometrial en 11 pacientes en el que buscan relacionar el adelanto de día 2-3 comparado con día 4. Este trabajo demuestra que hay un patrón de expresión génica distinto entre los endometrios con MEP de días 2-3 comparado con los que tienen 4 días

de adelanto. Concluyen que el análisis de expresión génica endometrial permite diferenciar si hay una MEP superior a 3 días (Van Vaerenbergh I., 2009). Como en trabajos previos (Kolibianakis E., 2002a), en ninguna de las 6 pacientes que tuvieron una MEP mayor de 3 días, se consiguió gestación.

El desarrollo endometrial de donantes de ovocitos tratadas con altas dosis o dosis convencionales de GnRH-ant comparado con ciclos naturales o ciclos con agonistas de GnRH ha sido estudiado mediante técnica de microarrays. Este trabajo demuestra una menor alteración del endometrio en ciclos con GnRH-ant comparado con el de agonistas de la GnRH. Se encontró que el ciclo con GnRH-ant simula más un endometrio en un ciclo natural que cuando se usa agonistas de la GnRH. (Simón C. 2005).

Un estudio de 12 donantes de ovocitos, 6 de ellas con una progesterona sérica superior a 1,5 ng/mL y las otras 6 con una progesterona menor, se les practicó una biopsia de endometrio en el día hCG + 7. En el grupo de pacientes con progesterona elevada se identificaron 140 genes significativamente disregulados, los cuales estaban asociados a la adhesión celular, procesos de desarrollo y sistema inmune (Labarta E., 2011).

Por nuestra parte, en este estudio hemos analizado la expresión génica en todas las situaciones expuestas, tanto en estimuladas con sólo FSH y en estimuladas con FSH y LH y tanto en día 2 después de la estimulación como en día 7 después de la ovulación (en fase pre-receptiva y en fase receptiva respectivamente). En estas comparativas hemos encontrado que los patrones de expresión génica no mostraban diferencias estadísticamente significativas cuando se comparaban entre si las fases pre-receptivas, y lo mismo ocurría al comparar ambas fases receptivas entre sí. Como era de esperar, las diferencias encontradas fueron al comparar entre las fases pre-

receptiva y receptiva dentro del mismo tipo de estimulación. La adición de LH no modifica de forma significativa el patrón de expresión génica endometrial y esto coincide con estudios previos que analizan el patrón endometrial después de la aplicación de dosis bajas de hCG en la fase folicular comparada con ciclos de estimulación convencional (Blockeel C., 2011).

Una vez obtenidas las listas de genes diferencialmente expresados, lo realmente interesante es ver si estos genes se agrupan en categorías funcionales y si estas categorías están más representadas en nuestra lista de genes de lo que esperaríamos para el conjunto de los mismos. Así, una categoría funcional concreta aparece como diferencialmente expresada si el porcentaje de genes de nuestra lista de genes disregulados que pertenecen a esa categoría es mayor al esperado para el genoma completo.

Para la expresión génica del endometrio en los estados pre y receptivo en mujeres sanas bajo efecto de la estimulación ovárica con FSH recombinante asociada a la supresión hipofisiaria desde el inicio de la estimulación con GnRH ant, de acuerdo con la adición o no de LH recombinante y haciendo este tipo de análisis de enriquecimiento funcional, ya hemos visto en la sección de resultados que existen una serie de términos funcionales sobrerrepresentados. Así, en las mujeres bajo el efecto de la estimulación ovárica con sólo FSH, se descubren varios procesos sobrerrepresentados con significancia estadística (Tabla 6) entre los que destacan: procesos del sistema inmune ya que el papel del sistema inmune es de gran importancia en el proceso de la receptividad endometrial como se ha demostrado previamente (Zhang D., 2012); También destaca la respuesta a estímulos, como en este caso a estímulos hormonales, puesto que el desarrollo endometrial y la receptividad endometrial están regulados por hormonas (Dey S., 2004); regulación de la

proliferación celular que es coherente con el hecho de que este tejido está proliferando y desarrollándose para alcanzar el máximo desarrollo durante ese periodo; la organización del citoesqueleto que está en la misma línea que el proceso anterior puesto que las células para completar el ciclo celular deben tener muy organizado el citoesqueleto y así poder completar la mitosis; la diferenciación celular ya que las células no sólo deben multiplicarse en número si no que deben adquirir el fenotipo funcional propio del endometrio y la capacidad de receptividad; también se han visto genes implicados en embarazo; regulación de la localización celular o la regulación negativa de la apoptosis (Tabla 6) entre otros, los cuales pueden afectar el endometrio y el proceso de implantación (Labarta E.,2011).

En el caso de los componentes celulares destaca la región extracelular que indica que hay muchos genes cuyos productos terminan secretados y con función en la matriz extracelular o simplemente proteínas secretadas; genes del huso meiótico y algunos genes como receptores de membrana, entre otros. Dentro de las funciones moleculares destacan principalmente los genes de tipo receptor, de unión a otras proteínas o tipo citoquinas. Procesos necesarios para obtener un endometrio funcional y receptivo. Funciones que ya han sido previamente descritas en estudios de este tipo comparando estadíos pre-receptivos y receptivo del endometrio humano (Horcajadas, J., 2007).

Y por último, las vías KEGG (de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (base de datos web)) se ha visto que se sobreexpresa la cascada del complemento y la coagulación con 6 genes diferencialmente expresados. Ruta que además está muy implicada con la receptividad endometrial (Martinelli I., 2003).

En el caso de las pacientes tratadas con FSH + LH destacan, prácticamente, los mismos procesos biológicos descritos en el caso de estimulación solo con FSH con pequeñas variaciones en cuanto al número de genes diferencialmente expresados incluidos en cada uno de los términos. En el mismo sentido, los componentes celulares son los mismos que en caso de estimulación con solo FSH, con igualmente una pequeña variación en el número de genes comprometidos en cada tipo de estimulación (122 genes entre los tres componentes en caso de estimulación con solo FSH y 126 cuando se estimula con FSH + LH).

Dentro de las funciones moleculares destacan, como diferencia entre ambos, un pequeño grupo de genes de unión a cobre y a carbohidratos tipo la heparina o el glicosaminoglicano. Y en el caso de la ruta de la cascada del complemento y la coagulación, simplemente hay un gen más incluido en esta categoría.

Todo esto indica que el desarrollo endometrial ha sido prácticamente el mismo en ambos tipos de estimulación. Aunque se debe tener en cuenta que el número de genes estudiados está limitado a 238 y quizá se haya perdido algo de información durante el camino puesto que el estudio se ha limitado a los genes que previamente habían sido descritos como importantes en el proceso de desarrollo endometrial y se han obviado el resto de genes del genoma.

Por lo tanto, podemos concluir que no existe una diferenciación ni génica ni de funciones metabólicas inducidas a nivel endometrial con la adición de la LH durante la estimulación ovárica.

CONCLUSIONES

1. Los estrógenos séricos durante la estimulación ovárica, una vez bloqueada la LH endógena no son diferentes cuando se usa FSH con o sin LH
2. Los niveles de progesterona sérica no están relacionados con la adición de LH
3. El endometrio presenta un adelanto de su madurez en todos los ciclos de estimulación ovárica al segundo día después de la aplicación de la hCG y esto no depende de la adición de LH a la estimulación.
4. La MEP parece ser una situación transitoria en día hCG +2 en algunos casos y en todo caso menor en el día hCG + 7, pues 5 días después la maduración endometrial es menor y se corrige en la mayoría de las pacientes.
5. La adición de GnRH-ant desde el primer día de estimulación es un protocolo que parece ser seguro en donantes de ovocitos.
6. La expresión génica del endometrio no difiere cuando la estimulación ovárica se realiza con o sin LH.
7. Existe un cambio del patrón endometrial evidente génicamente cuando se pasa del segundo (estado prerreceptivo) al séptimo día (estado receptivo) después de la hCG, aunque este cambio no es diferente cuando se usa solo FSH o FSH + LH en la estimulación ovárica.
8. El uso de LH exógena a dosis de 75 UI/d no se correlaciona con sus niveles séricos durante la estimulación.
9. La MEP no requiere de la elevación de la LH o de la progesterona sérica durante la fase folicular o al momento de la aplicación del hCG.

CONCLUSIONES

10. No existen diferencias en los procesos biológicos, componentes celulares o funciones moleculares expresados a nivel endometrial cuando se estimula los ovarios con solo FSH comparado con la estimulación con FSH más LH.
11. La vía metabólica de la cascada de coagulación y el complemento se expresa de forma significativa durante la estimulación ovárica a nivel endometrial, pero no de forma diferencial cuando se estimula con FSH comparado con la estimulación con FSH más LH.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, A.A., Elberger, L., Borghi, M., Calamera, J.C., Chemes, H., Doncel, G.F. et al. 2000. "Endometrial dating and determination of the Window of implantation in healthy fertile women". *Fertil Steril* **73**: 788-98.

Alviggi, C., Clarizia, R., Mollo, A., Ranieri, A., De Placido, G. 2006 "Who needs LH in ovarian stimulation?" *Reprod Biomed Online* **12**:599-607

Andersen, A.N., Devroey, P., Arce, J.C. 2006. "Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial". *Human Reprod* **21**:3217-3227

Ancelin, M., Buteau-Lozano, H., Meduri, G. et al. 2002. "A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus". *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:6023-8.

Arnett-Mansfield, R.L., DeFazio, A., Wain, G.V., et al. 2001. "Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium". *Cancer Res* **61**:4576-82.

Basir, G., O, W., Ng, E., Ho, P. 2001 "Morphometric analysis of peri-implantation endometrium in patients having excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation". *Hum Reprod* **16**:435-40

Barent, R.L., Nair, S.C., Carr, D.C. et al. 1998. "Analisis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hp90 binding and association with progesterone receptor complexes". *Mol Endocrinol* **12**:342-54.

Bartol, F.F., Wiley, A.A., Coleman, D.A. et al. 1988. "Ovine uterine morphogenesis: effects of age and progestin administration and withdrawal on neonatal endometrial development and DNA synthesis". *J Anim Sci* 66:3000-9.

Beckers, N.G., Macklon, N., Eijkemans, M.J. 2003. "Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone or gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. *J. Clinical Endocrinology Metabolism* 88:4186-4192.

Benirschke, K., Kaufmann, P. 1991. "Early development of the human placenta" in: Benirschke, K., Kaufmann, P., eds. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer-Verlag. 13-21.

Bentin-Ley, U., Sjögren, A., Nilsson, L., Hamberger, L., Larsen, J.F., Horn, T. 1999. "Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in Vitro". *Hum Reprod* 14:515-520.

Bergh, P., Navot, D. 1992. "The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation". *Fertil Steril* 58:537-42

Bermejo A., Cerrillo M, Ruiz-Alonso M, Blesa D., Simón C., Pellicer A., García Velasco J. 2014. "Impact of final oocyte maturation using gonadotropin-releasing hormone agonist triggering and different luteal support protocols on endometrial gene expression". *Fertil Steril*. 101:138-146

Bermejo A., Iglesias C., Ruiz-Alonso M., Blesa D., Simón C., Pellicer A., García Velasco. 2014. "The impact of using the combined oral contraceptive pill for cycle scheduling on

gene expression related to endometrial receptivity" *Hum Reprod* **29**:1271-1278

Blockeel C., Van Vaerenbergh I., Fatemi H., Van Lommel L., Devroey P., Bourgain C. 2011. "Gene expression profile in the endometrium on the day of oocyte retrieval after ovarian stimulation with low-dose hCG in the follicular phase" *Mol Hum Reprod* **17**:33-41

Boettger-Tong, H.L., Murthy, L., Stancel, G.M. 1995. "Cellular pattern of c-fos induction by estradiol in the immature rat uterus". *Biol Reprod* **53**:1398-406.

Bosch, E. 2011. "Recombinant human follicular stimulating hormone and recombinant human luteinizing hormone in a 2:1 ratio combination. Pharmacological characteristics and clinical applications". *Expert Opin Biol Ther.*, **10**:1001-1009.

Bosch, E.; Escudero, E.; Crespo, J.; Simón, C.; Remohí, J.; Pellicer, A. 2005. "Serum luteinizing hormone in patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropin-releasing hormone antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone and its relationship with cycle outcome". *Fertil Steril.*, **84** :1529-32.

Bosch, E.; Valencia, I.; Escudero, E.; Crespo, J.; Simón, C.; Remohí, J.; and Pellicer, A. 2003 "Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome" *Fertil Steril* **80**:1444-1449.

Bosch, E.; Labarta, E.; Crespo, J.; Simón, C.; Remohí, J.; Jenkins, J.; Pellicer, A. 2010 "Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles". *Hum Reprod.* **25**: 2092-100.

Bouchard, P., Marraoui, J., Massai, MR., Medalie, D.A., De Ziegler, D., Perrot-Aplanat, M., et al. 1991. "Immunocytochemical localization of oestradiol and progesterone

receptors in human endometrium: a tool to assess endometrial maturation" *Ballieres Clin Obstet Gynaecol* **5**: 107-15.

Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., et al. 2004. "Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse". *Mol Endocrinol* **18**:1411-27.

Broekmans F., Verweij P., Eijkemans M., Mannaerts B., Witjes H. 2014. "Prognostic models for high and low ovarian responses in controlled ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol" *Hum Reprod* **29**:1688-97.

Casper, R. 2011. "It's time to pay attention to the endometrium". *Fertil Steril* **96**:519-21.

Cedars, M.I., Surey, E., Hamilton, F., Lapolt, P., Meldrum, D.R. 1990. "Leuprolide acetate lowers circulating bioactive luteinizing hormone and testosterone concentrations during ovarian stimulation for oocyte retrieval". *Fertil Steril* **53**:627-631

Cermik, D., Arici, A., Taylor, H.S. 2002. "Coordinated regulation of HOX gene expression in myometrium and uterine leiomyoma". *Fertil Steril* **78**:979-84.

Chappel, S.C., Howles, C. 1991 "Reevaluation of the roles of luteinizing-hormone and follicle-stimulating –hormone in the ovulatory process." *Hum Reprod* **6**:1206-12

Chen, Q.J., Sun, X.X., Li, L., Gao, X.H., Wu, Y., Gemzell-Danielsson, K. et al. 2007. "Effects of ovarian high response on implantation and pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation (with GnRH agonist and rFSH)". *Acta Obstet Gynecol Scand* **86**: 849-54.

Cheon, X.P., Xu, X., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C. 2003. "Immune-responsive gene 1 is a

novel target of progesterone receptor and plays a critical role during implantation in the mouse". *Endocrinology* **144**:5623-30.

Cheon, Y.P., Li, Q., Xu, X. et al. 2002. "A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation". *Mol Endocrinol* **16**:2853-71.

Chetkowski, R.J., Kiltz, R.J., Salyer, W.R. 1997. "In premature luteinization, progesterone induces secretory transformation of the endometrium without impairment of embryo viability". *Fertil Steril* **2**:292-297.

Clark, J.H., Peck, E.J. 1979. "Female Sex Steroids". *Berlin: Springer-Verlag*.

Coleman, K.M., Smith, C.L. 2001. "Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors". *Front Biosci* **6**:D1379-D91.

Condon, J.C., Hardy, D.B., Kovaric, K., Mendelson, C.R. 2006. "Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of NF- κ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function". *Mol Endocrinol* **20**:764-75.

Condon, J.C., Jeyasuria, P., Faust, J.M. et al. 2003. "A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition". *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:9518-23.

Coutifaris, C., Myers, E., Guzick, D., et al. 2004. "Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status". *Fertil Steril* **82**:1264-1274.

Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Young, P., et al. 1997. "Stromal estrogen receptors

mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium". *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:6535-6540.

Corner, G.W., Allen, W.M. 2005. "Physiology of the corpus luteum". *Am J Obstet Gynecol* **193**:1574-1575.

Couse, J.F., Korach, K.S. 1999. "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" *Endocr Rev* **20**:358-417.

Critchley, H. O. D., Brenner, R. M., Henderson, T. A., Williams, K., Nayak, N. R., Slayden O. D., Millar, M. R. and Saunders, P. T. K. 2001. Estrogen receptor β , but not estrogen receptor is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *J. Clinical Endocrinology Metabolism* **86**:1370-8.

DaiKoku, T., Matsumoto, H., Gupta, R.A. et al. 2003. "Expression of hypoxia-inducible factors in the peri-implantation mouse uterus is regulated in a cell-specific and ovarian steroid dependent manner. Evidence for differential function of HIFs during early pregnancy". *J Biol Chem* **278**:7683-91.

Devroey,P., Bourgain,C., Macklon,N., Fauser,B.C. 2004. "Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity". *Trends in endocrinology and metabolism*. **15**:84-90.

De Placido, G., Alviggi, C., Perino,A., Strina, I., Lisi, F., Fasolino,A., De Palo,R., Ranien,A., Colacurci,N., Mollo,A. 2005. "Italian collaborative Group on Recombinant Human Luteinizing. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A

multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod* **20**: 390-396.

DeNardo, D.G., Kim, H.T., Hilsenbeck, S., et al. 2005 “Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factors cross talk in breast cancer; identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes”. *Mol Endocrinol* **19**:362-78.

Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., Lempicki, R.A. 2003. “DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery”. *Genome Biol.* **4**:3

Dey, S.K., Lim, H., Das, S., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T and Wang, H. 2004. “Molecular cues to implantation”. *Endocr Rev* **25**:341-73

de Ziegler, D. 1995. “Hormonal control of endometrial receptivity” *Hum Reprod* **10**: 4-7

Diaz-Gimeno, P., Horcajadas, J., Martinez-Conejero, J., Esteban, F., Alamá, P., Pellicer, A., Simon, C. 2011. “A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature”. *Fertil Steril* **1**: 50-60.

Domínguez, F., Remohi, J., Pellicer, A., Simón, C. 2003. “Human endometrial receptivity: a genomic approach”. *Reprod Biomed Online* **6**:332-338.

Dominguez, F., Galán, A., Martín, J., Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C. 2003. “Hormonal and embryonic regulation of chemokine receptors CXCR1, CXCR4, CCR5, and CCR2B in the human endometrium and the human blastocyst” *Mol Hum Reprod.* **9**:189-98

Driedrich, K., Fauser, B., Devroey, P., et al. 2007. "The role of the endometrium and embryo in human implantation". *Human Reprod Update* **13**: 365-377.

Dwivedi, A., Gupta, G., Keshri, G., Dhar, J.D. 1999 "Changes in uterine ornithine decarboxylase activity and steroid receptor levels during decidualization in the rat induced by CDRI-85/287" *Eur J Endocrinol* **141**:426-430.

Edelstein, M.C., Seltman, H.J., Cox, B.J. et al. 1990 "Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in cycles with gonadotropin-releasing hormone agonist suppression are not predictive of pregnancy outcome" *Fertil Steril* **54**:853-7

Enders, A.C., Schlafke, S. 1967. "A morphological analysis of the early implantation stages in the rat". *Am J Anat* **120**: 185-226.

Evans J., Salamonsen L.A. 2013 "Too much of a good thing? Experimental evidence suggests prolonged exposure to hCG is detrimental to endometrial receptivity". *Hum Reprod* **28**:1610-9

Evans, R.M. 1988. "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily". *Science* **240**:889-95.

Fanchin, R., Ziegler, D., Castracane, D., Taieb, J., Olivennes, F., Frydman, R. 1995. "Physiopathology of premature progesterone elevation". *Fertil Steril* **64**:796-801.

Fatemi, H.A., Popovic-Todorovic, B., Papanikolaou, E., Donoso, P., Devroey, P. 2007. "An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles". *Hum Reprod Update* **13**: 581-590

Fazleabas, A.T.2006 “ A baboon model for stimulating pregnancy” *Methods Mol Med* **121**: 101-110

Ferenczy, A., and Giudice, L.C. 1995. “The endometrial cycle: morphologic and biochemical events”. In: Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Adashi EY et al (eds). *Raven Press, New York* **1**: 171-194.

Ferenczy, A. et al. 1977. “Surface ultrastructural response of the human uterine lining epithelium to hormonal environment. A scanning electron microscopic study”. *Acta Cytol* **21**: 566-572.

Filicori, M. 1999. “The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction”. *Fertil Steril* **71**: 405-414.

Filicori, M., Cognigni, G.E., Pocognoli, P., Tabarelli, C., Spettoli, D., Taraborrelli, S., Ciampaglia, W. 2002. “Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotrophin administration” *Hum Reprod* **17**: 2009-2015.

Filicori, M., Cognigni, G., Samara, A., Melappioni, S., Perri, T., Cantelli, B., Parmegiani, L., Pelusi, G., DeAloysoi, D. 2002a. “ The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Hum Reprod Update* **8**:543-557.

Filicori, M., Cognigni, G.E., Tabarelli, C, Pocognoli, P., Taraborrelli, S., Spettoli, D., Ciampaglia, W. 2002b. “Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women” *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 1156-1161.

Fleischer, A.C., Kalemaris, G.C., Machin, J.E., Entman, S.S., James, A.E. 1986.

“Sonographic depiction of normal and abnormal endometrium with histopathologic correlation”. *J Ultrasound Med* **5**(8):445-452.

Fluker, M, Grifo, J.,Leader, A. 2001. “Efficacy and Safety of Ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation”. *Fertil Steril* **75**: 38-45.

Franco H, Lee K., Rubel C. et al 2010. “Constitutive activation of smoothened leads to female infertility and altered uterine differentiation in the mouse”. *Biol Reprod* **82**:991-999.

Gambino, L.S., Wreford,N., Bertram, J., Dockery,P., Lederman,F., Rogers, P. 2002. “Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium”. *Hum Reprod* **17**: 1199-1206.

García, E., Bouchard, P., De Brux, J. et al. 1988. « Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating”. *J Clin Endocrinol Metab* **67**:80-7.

García, J., Acosta, A., Hsiu, J., Jones, H. 1984. “Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization”. *Fertil Steril* **41**: 31-35

Gargett, C.E. 2007. “Uterine stem cells: what is the evidence?”. *Hum Reprod Update* **13**: 87-101.

Garrido, N., Zuzuarregui, J., Meseguer, M., Simon, C., Remohi, J., Pellicer, A. 2002. “Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 years

follow-up of more than 2100 candidates". *Hum Reprod* **17**:3142-3148.

Gehin, M., Marck, M., Dennefeld, C. et al. 2002. "The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP". *Mol Cell Biol* **22**:5923-37.

Givens, C.R., Schriock, E.D., Dandekar, P.V., et al.1994 "Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration do not predict outcome in assisted reproduction cycles" *Fertil Steril* **62**: 1011-7

Golan, A., Ron-el, R., Herman, A., Soffer, Y., Weinraub, Z., Caspi, E. 1989. "Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review". *Obstet Gynecol Surv* **44**: 430-440.

Gray, C.A., Burghardt, R.C., Johnson, G.A. et al. 2002. "Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation". **124**:289-300.

Grundker, C., Volker, P., Griesinger, F. 2002. "Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice" *Am J Obstet Gynecol* **187**:528-537

Haouzi,D., Assou,S.,Dechanet C., Anahory T., Dechaud H., De Vos J., Hamamah S. 2010. "Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans:protocol effect". *Biol Reprod* **82**:679-86

Haouzi,D., Assou,S., Mahmoud,K., Tondeur,S., Rème,T., Hedon,B., De Vos, J. And Hamamah,S. 2009 " Gene expression profile of human endometrial receptivity : comparison between natural and stimulated cycles for the same patients". *Hum*

Reprod 24:1436-1445.

Haouzi, D., Mahmoud, K., Fourar, M., Bendhaou, K, Dechaud, H., De Vos, J., Rème, T., Dewailly, D., Hamamah, S. 2009. "Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle". *Hum Reprod* **24**(1):198-205.

Hey, N.A., Li, T.C., Devine, P.L. et al. 1995. "MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients". *Hum Reprod* **10**:2655-62.

Hill, M., Levens, E., Levy, G., Ryan, M., Csokmay, J., DeCherney, A., Whitcomb B. 2012. "The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis". *Fertil Steril* **97**:1108-14.

Hodgen, G.D. 1983."Surrogate embryo transfer combined with estrogen-progesterone therapy in monkeys: implantation, gestation, and delivery without ovaries". *JAMA* **250**:2167-71.

Hoozemans, D.A., Schats, R., Lambalck, C., Homburg, R., Hompes, P. 2004. "Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology". *Reprod Biomed Online* **9**: 692-715.

Horcajadas, J.A., Diaz.Gimeno, P., Pellicer, A., Simón, C. "Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function". *Semin Reprod Med* **25**:454-60

Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simón, C. 2007."Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities". *Hum Reprod Update* **13**(1):77-86.

Hugues JN, Masse-Laroche E., Reboul-Marti J., Boiko O., Meynant C., Cédric-Durnerin I. 2011. "Impact of endogenous luteinizing hormone serum levels on progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration" *Fertil Steril* **96**:600-4

Humaidan P., Van Vaerenbergh I., Bourgain C. et al. 2102 "Endometrial gene expression in the early luteal phase is impacted by mode of triggering final oocyte maturation in recFSH stimulated and GnRH antagonist co-treated IVF cycles". *Hum Reprod* **11**:3259-3272

Jakacka, M., Ito, M., Martinson, F., et al. 2002. "An estrogen receptor (ER) alpha deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling in vivo" *Mol Endocrinol* **16**:2188-201

Jacobs, H.M. 1987. "Endometrial cytosolic and nuclear progesterone receptors in the luteal phase defect". *J Clin Endocrinol Metab* **64**:472-475

Jeong, J.W., Lee, K.Y., Kwak, I. et al. 2005. "Identification of murine uterine genes regulated in a ligand-dependent manner by the progesterone receptor". *Endocrinology* **146**:3490-505.

John Aplin et al. 2008. "The endometrium, 2nd edition. Molecular, cellular, and clinical perspectives". *Informa healthcare, USA*.

Jones, G.S. 1949. "Some newer aspects of management of infertility". *JAMA* **141**:1123-9.

Jin, V.X., Leu, Y.W., Liyanarachchi, S., et al. 2004. "Identifying estrogen receptor alpha target genes using integrated computational genomics and chromatin

immunoprecipitation microarrays". *Nucleic Acids Res* **32**:6627-35.

Kamalakaran, S., Radhakrishnan, S.K., Beck, W.T. 2005. "Identification of estrogen-responsive genes using a genome-wide analysis of promoter elements for transcription factor binding sites". *J Biol Chem* **280**:21491-7.

Kao, L.C., Tulac, S., Lobo, S. et al. 2002. "Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation". *Endocrinology* **143**:2119-38.

Kariya, M., Kanzaki, H., Hanamura, T. et al. 1994. "Progesterone-dependent secretion of macrophage colony-stimulating factor by human endometrial stromal cells of nonpregnant uterus in cultura". *J Clin Endocrinol Metab* **79**:86-90.

Katano, K., Matsumoto, Y., Ogasawara, M. et al. 1997. "Low serum M-CSF levels are associated with unexplained recurrent abortion". *Am J Reprod Immunol* **38**:1-5.

Kato, K., Yoshimoto, M., Kato, K. et al. 2007. "Charaterization of side-population cells in human normal endometrium". *Hum Reprod* **22**: 1214-1223.

Katzenellenbogen, B.S., Bhakoo, H.S., Ferguson, E.R. et al. 1979. „Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissues and tumors". *Recent Prog Horm Res* **35**:259-300.

Kilani, Z., Dakkak, A., Ghunaim, S., Cognigni, G., Tabarelli, C., Parmegiani, L., Filicori, M. 2003. "A prospective, randomized, controlled trial comparing highly purified hMG with recombinant FSH in women undergoing ICSI: ovarian response and clinical outcomes" *Hum Reprod* **18**: 1194-1199.

King, A. 2000. "Uterine leukocytes and decidualization". *Hum Reprod Update* **6**:28-36.

Kolibianakis, E.M., Devroey, P. 2002. "The luteal phase after ovarian stimulation". *Reprod Biomed Online* **1**(3):26-35.

Kolibianakis, E. M., Bourgain, C., Albano, C., Osmanagaoglu, K., Smitz, J., Van Steirteghem, A., Devroey, 2002 (a). P. "Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up". *Fertil Steril* **78**:1025-1029

Kolibianakis, E.M., Albano, C., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A.C., Devroey, P. 2003. "Initiation of gonadotropin-releasing hormone antagonist on day 1 as compared to day 6 of stimulation: effect on hormonal levels and follicular development in in vitro fertilization cycles". *J Clin Endocrinol Metab* **88**:5632-5637

Kolibianakis, E.M., Kalogeropoulou, L., Griesinger, G., Papanikolaou, E.G., Papadimas, J., Bontis, J., Tarlatzis, B.C. 2007. "Among patients treated with FSH and GnRH analogues for in vitro fertilization, is the addition of recombinant LH associated with the probability of live birth? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* **13**:445-452.

Kolibianakis, E.M., Tarlatzis, B., Devroey, P. 2005. "GnRH antagonist in IVF". *Reprod Biol Med Online* **10**: 705-710.

Kolibianakis, E.M., Albano, C., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A.C., Devroey, P. 2004. "Prolongation of the follicular phase in in vitro fertilization results in a lower ongoing pregnancy rate in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists". *Fertil Steril*. **82**:102-107.

Kolibianakis, E.M., Albano, C., Kahn, J., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem,

A.C., Devroey, P. 2003 (a). "High exposure to LH and E2 in the early follicular phase of GnRH antagonist cycles is associated with a reduced chance of pregnancy". *Fertil Steril*. **79**:873-880

Kolibianakis, E.M., Bourgain, C., Platteau, P. 2003(b). "Abnormal endometrial development occurs during the luteal phase of nonsupplemented donor cycles treated with recombinant follicle stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril* **80**:464-466.

Kolibianakis, E.M., Zicopoulos, K., Smits, J., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A.C., Devroey, P. 2004(a). "Elevated progesterone at initiation of stimulation is associated with a lower ongoing pregnancy rate after IVF using GnRH antagonists". *Hum Reprod* **19**:1525-29

Kolibianakis, E.M., Zicopoulos, K., Smits J. et al. 2004(b). "Administration of gonadotropin releasing hormone antagonist from day 1 of stimulation in in vitro fertilization" *Fertil Steril* **82**:102-107

Korneyi, J.L., Lei, Z.M., Rao, C.H. Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* **49**:1149-1157.

Kraus, W.L., Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S. 1993. "Cloning of the rat progesterone receptor gene 5-region and identification of two functionally distinct promoters". *Mol Endocrinol* **7**:1603-16.

Krüssel J.S., Bielfeld, P., Polan, M.L., Simón, C. "Regulation of embryonic implantation". *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **110**:S2-9.

Kyrou, D., Kolibianakis,E., Venetis,C., et al. 2009. "Steroid receptor expresión in human endometrium during the follicular phase of stimulated cycles". *Human Reprod* **24**:2931-2935.

Labarta,E., Martinez-Conejero J., Alamá,P., Horcajadas,J., Pellicer,A., Simon,C. and Bosch,E. 2011. "Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis". *Hum Reprod* **26**:1813-1825.

Ladner, M.B., Martin, G.A., Noble, J.A. et al. 1987. "Human CSF-1: gene structure and alternative splicing of mRNA precursors". *EMBO J* **6**:2693-8.

Lainas T., Petsas G., Zorzovilis I., et al. 2007 "Initiation of GnRH antagonist on day 1 of stimulation as compared to the long agonist protocol in PCOS patients. A randomized controlled trial: effect on hormonal levels and follicular development" *Hum Reprod* **22**:1540-46

Lambalk, C., Leader, A., Olivennes, F.,et al. 2006. "Treatment with the GnRH antagonist ganirelix prevents premature LH rises and luteinization in stimulated insemination: results of a double-blind, placebo-controlled, multicenter trial". *Hum Reprod* **11**:632-639.

Lass, A., Peat,D., Avery, S., Brinsden,P. 1998. "Histological evaluation of endometrium on the day of oocyte retrieval after gonadotropin-releasing hormone agonist- follicle stimulating hormone ovulation induction for in vitro fertilization. *Hum Reprod* **13**:3203-3205.

Laufer, N., Navot, D., Schenker, J.G. 1982. "The pattern of luteal phase plasma progesterone and estradiol in fertile cycles". *Am J Obstet Gynecol* **143**:808-13.

Lédée N., Munaut C., Aubert J. et al. 2011. "Specific and extensive endometrial deregulation is present before conception in IVF/ICSI repeated implantation failure (IF) or recurrent miscarriages" *J Pathol* **225**:554-64.

Lee, K., Jeong, J., Kwak, I. et al. 2006. "Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus". *Nat Genet* **38**:1204-9.

Legro, S.R., Ary, B.A., Paulson, R.J., Stanczyk, F.Z., Sauer, M.V. 1993. "Premature luteinisation as detected by elevated serum progesterone is associated with a higher pregnancy rate in donor oocyte in-vitro fertilization". *Hum Reprod* **8**:1506-1511.

Lei Z.M., Mishra S., Zou W., Xu B., Foltz M., Li X., Rao Ch.V. 2001 "Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene" *Mol Endocrinol* **15**:184-200

Lenton, E.A., Langren, B.M., Sexton, L. et al. 1984. "Normal variation in the length of the follicular phase of the menstrual cycle: effect of chronological age". *Br J Obstet Gynaecol* **91**:681-684.

Lessey, B.A. 2011. "Assesment of endometrial receptivity". *Fertil Steril* **96**: 522-29.

Levin, E.R. 2005. "Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen". *Mol Endocrinol* **19**(8):1951-9.

Li Q., Kannan A., De Mayo F.J., Lydon J.P. et al. 2011. " The antiproliferative action of progesterone in intrauterine epithelium is mediated by Hand2". *Science* **331**:912-6.

Li, X.T., O'Malley, B.W. 2003. "Unfolding the action of progesterone receptors". *J Biol Chem* **278**(41):39261-4.

Lin, W.J., Hsueh, H.M., Chen, J.J. 2010. "Power and sample size estimation in microarrays studies". *BMC Bioinformatics* **11**:48.

Luu, K.C., Nie, G.Y., Hampton, A. et al. 2004. "Endometrial expression of calbindin (CaBP)-d28k but not CaBP-d9k in primates implies evolutionary changes and functional redundancy of calbindins at implantation". *Reproduction* **128**:433-41.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R. et al. 1995. "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities". *Genes dev* **9**:2266-78.

Mannaerts, B., Gordon, K. 2000 "Embryo implantation and GnRH antagonists: GnRH antagonists do not activate the receptor". *Hum Reprod* **9**:1882-1883

Marchini, M., Fedele, L., Bianchi, S., Losa, G.A., Ghistetta, M., Candidiani, G.B. 1991. "Secretory changes in preovulatory endometrium during controlled ovarian hyperstimulation with buserelin acetate and human gonadotropins". *Fertil Steril* **55**:717-721.

Martinelli, I., Taioli, E., Ragni, G., Levi-Setti, P., Passamonti, S., Battaglioli, T., Lodigiani, C., Mannucci, P. 2003. "Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia". *Haematologica* **88**:789-93.

Martinez, F., Coroleu, B., Clua, E., et al. 2004 "Serum progesterone concentrations on the day of HCG administration cannot predict pregnancy in assisted reproduction cycles". *Reprod Biomed Online* **8**:183-190

Martínez-Conejero, J.A., Simón, C., Pellicer, A., Horcajadas, J.A. 2007. "Is ovarian stimulation detrimental to the endometrium?". *Reprod Biomed Online* **15**(1):45-50.

Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S.K., Hogan, B.L., Dey, S.K. 2002. "Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus". *Dev Biol* **245**:280-90.

McKenna, N.J., O'Malley, B.W. 2002. "Minireview: nuclear receptor coactivators-an update". *Endocrinology* **143**(7):2561-5.

Melo, M.A.B., Meseguer, M., Garrido, N., Bosch, E., Pellicer, A., and Remohí, J. 2006 "The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme" *Hum Reprod* **21**:1503-1507.

Meresman, G.F., Bilotas, M.A., Lombardi, E. 2003 "Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1 beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cultures from patients with endometriosis". *Hum Reprod* **18**:1767-1771.

Mertens, H.J., Heineman, M.J., Theunissen, P.H., de Jong, F.H., Evers, J.L. 2001. "Androgen, estrogen and progesterone receptor expression in the human uterus during the menstrual cycle. *Eur j Obstet Gynecol Reprod Biol* **98**:58-65

Messinis I. 2006. "Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications" *Hum Reprod Update* **12**: 557-71.

Messinis I., Loutradis D, Domali E, et al. 2005. "Alternate day and daily administration of GnRH antagonist may prevent premature luteinization to a similar extent during FSH treatment". *Hum Reprod* **20**:3192-3197.

Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D. et al. 2005. " In search of candidate genes critically expressed in the endometrium during the window of implantation". *Hum*

Reprod **20**:2104-2117.

Mote, P.A., Balleine, R., McGowan, E., Clarke, C. 2000. "Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma". *Human Reprod* **15**:45-56.

Mochtar, M.H., Van der Veen, F., Ziech, M., Van Welly, M. 2007. "Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles" *Cochrane Database Syst Rev.* **18**: 1-31

Muñoz, E., Bosch, E., Fernández, I., Portela, S., Ortiz, G., Remohí, J., Pellicer, A. 2012. "The role of LH in ovarian stimulation". *Current Pharm Biotech* **13**:409-416.

Muñoz E, Fernandez I, Martinez M et al. 2015. "Oocyte donation outcome after oncological treatment in cancer survivors". *Fertil Steril* **103**:205-13

Muñoz, E., Galliano, D., Portela, S., Kassa, D., Fernandez, I., Remohí, J. 2012. "Síndrome de Hiperestimulación Ovárica". En : Remohí, J., Bellver, J., Matorras, R., Ballesteros, A., Pellicer, A. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción humana. Aspectos clínicos.* Ed. Panamerica . pp:533-545

Muñoz, E., Taboas, E., Fernandez, I., Aguilar, J., Portela, S., Muñoz, L., Bosch, E. 2013. "Treatment of luteal phase defects in assisted reproduction" *Current Drug Targets* **14**:832-842.

Murray, M., Meyer, W., Zaino, R., Lessey, B., Novotny, D., Ireland, K., Zeng, D., Fritz, M. 2004. "A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* **81**: 1333-1343.

Navot, D., Scott, R.T., Droesch, K., Veeck, L.L., Liu, H.C., Rosenwacks, Z. 1991. "The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro". *Fertil Steril* **55**:114-8.

Nikas, G., Develioglu, O., Toner, J., Jones, H. 1999. "Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles". *Hum Reprod* **14**:787-792.

Nikas, G. and Makrigiannakis, A. 2003. "Endometrial pinopodes and uterine receptivity". *Ann NY Acad Sci* **997**:120-123.

Noyes, R.W., Hertig, A., Rock, J. 1950. "Dating the endometrial biopsy". *Fertil Steril* **1**:3-25.

O'Sullivan, C.M., Ungarian, J.L., Singh, K., Liu, S., Hance, J., Rancourt, D.E. 2004. "Uterine secretion of ISP1 & 2 tryptases is regulated by progesterone and estrogen during pregnancy and the endometrial cycle". *Mol Reprod Dev* **69**:252-9.

Papnikolaou, E., Bourgain, C., Kolibianakis, E., Tournaye, P., Devroey, P. 2005. "Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes". *Hum Reprod* **20**:1541-1547.

Papanikolaou E.G., Pados G., Grimbizis G., et al. 2013 "GnRH agonist vs GnRH antagonist IVF cycles: is the reproductive outcome affected by the incidence of progesterone elevation on the day of hCG triggering? A randomized prospective study". *Hum Reprod* **27**:1822-28.

Paulson, R. 2011. "Hormonal induction of endometrial receptivity". *Fertil Steril* **96**: 530-

535.

Pollard, J.W., Hunt, J.S., Wiktor-Jedrzejczak, W., Stanley, E.R. 1991. "A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility". *Dev Biol* **148**:273-83.

Power, R.F., Conneely, O.M., O'Malley, B.W.1992. "New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily". *Trends Pharmacol Sci* **13**:318-23.

Prapas, N., Tavaniotou, A., Panagiotidis, Y., Prapa,S., Kasapi, E., Goudakou,M., Papatheodorou,A., Prapas,Y. 2009. " GnRH antagonist and endometrial receptivity in oocyte recipients: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* **18**:276-281.

Press, M.F., Udove, J.A., Greene, G.L. 1988. "Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analisis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor". *Am J Pathol* **131**:112-24.

Print, C., Valtola,R., Evans,A., Lessan,K., Malik,S., Smith,S. 2000. "Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endotelial cell transcriptome". *Hum Reprod* **19**:2356-2366.

Propst A., Hill M., Bates G., Palumbo M., Van Horne A., Reztloff M. 2011 "Low dose human chorionic gonadotropin may improve in vitro fertilization cycles outcomes in patients with low luteinizing hormone levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration" *Fertil Steril* **96**:898-904.

Punyadeera, C., Verboost, P., Groothuis, P. 2003. "Oestrogen and progestin responses in human endometrium". *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**:393-410.

Raga, F., Casañ,E., Kruessel,J., Wen, Y. et al. 1998. "Quantitative gonadotropin-

releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle". *Biol Reprod* **59**:661-669

Raga, F., Bonilla-Musoles, F., Casañ, E.M., Klein, O., Bonilla, F. 1999. "Assessment of endometrial volume by three-dimensional ultrasound prior to embryo transfer: clues to endometrial receptivity". *Hum Reprod.* **14**:2851-4.

Rao CV. 2001. "Multiple novel roles of luteinizing hormone". *Fertil Steril.* **76**:1097-1100.

Reese, J., Das, S.K., Paria, B.C. et al. 2001. "Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation". *J Biol Chem* **276**:44137-45.

Refaat B. 2014. "Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: a review". *Reprod Biol Endocrinol* **12**:116

Richter, K.S., Bugge, K.R., Bromer, J.G., Levy, M.J. 2007. "Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in Vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos". *Fertil Steril* **87**:53-9

Rogers, P.A.W. 1996. "Structure and function of endometrial blood vessels". *Hum Reprod Update*, **2**: 57-62.

Rongières-Bertrand, C., Olivennes, F., Righini, C. 1999 "Revival of the natural cycles in in vitro fertilization with the use of new gonadotrophin-releasing hormone antagonist (cetorelix): a pilot study with minimal stimulation". *Hum Reprod* **14**. 683-688.

Ruiz-Alonso M, Blesa D., Diaz-Gimeno P., et al. 2013 "The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure" *Fertil Steril* **100**:818-24

Ruiz-Alonso M., Galindo N., Pellicer A., Simón C. 2014 “What a difference two days make:”personalized” embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study” *Hum Reprod* **29**:1244-1247

Saadat, P., Boostanfar, R., Slater, C.C. 2004 “Accelerated endometrial maturation in the luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation: impact of gonadotropin-releasing hormone agonist vs antagonist” . *Fertil Steril*. **82**:167-171

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N. et al. 2003. “TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**:374-8.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. 2006 “ The RIN: an RNA integrity number for assigning to RNA measurements” *BMC Mol Biol* **31**:7-3.

Schoolcraft, W., Sinton, E., Schlenker, T., Huynh, D., Hamilton, F., Meldrum, D.R. 1991 “Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate” *Fertil Steril* **55**:563-6.

Shemesh M. 2001 “Actions of gonadotrophins on the uterus” *Reproduction* **121**:835-842

Shapiro, B., Daneshmand, S., De Leon, L., Garner, F., Aguirre, M., Hudson, C. 2012. Frozen-thawed embryo transfer is associated with significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **98**:1490-4

Sharma, V., Whitehead, M., Mason, B. 1990. “ Influence of ovulation induction on endometrial and embryonic development”. *Fertil Steril* **53**:822-829.

Shifren, J.L., Tseng, J.F., Zaloudek, C.J. et al. 1996. “Ovarian steroid regulation

of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis".

J Clin Endocrinol Metab **81**:3112-18.

Shimizu, A., Maruyama, T., Tamaki, K et al. 2005. "Impairment of decidualization in SRC-deficient mice". *Biol Reprod* **73**:1219-27.

Shiozawa, T., Shilh, H.C., Miyamoto, T. et al. 2003. "Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium".

J Clin Endocrinol Metab **84**:871-8.

Simon, C. 2009 "El endometrio humano: desde la investigación a la clínica". Ed médica panamericana, Madrid. 2009 "El endometrio humano". p. 2-9.

Simon, C., Martín, J., Pellicer A. 2000. "Paracrine regulators of implantation". *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **14**:815-26

Simon,C., Cano,F., Valbuena,D., 1995. "Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* **10**:2432-2437.

Simón,C., Oberyé,J., Bellver,J., Vidal,C., Bosch,E., Horcajadas,J., Murphy,C., Adams,S., Riesewijk, A., Mannaerts,B., Pellicer,A. 2005. "Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high or standard dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles." *Hum Reprod* **20**:3318-3327.

Slayden, O., Brenner,R. 2004. "Hormonal regulation and localization of estrogen, progesterin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterona receptor antagonist". *Arch Histol Cytol* **6**:393-409.

Smith, C.L., O'Malley, B.W. 2004. "Coregulator function: a key understanding tissue specificity of selective receptor modulators". *Endocr Rev* **25**:45-71.

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohí J, Pellicer A. 2005. "Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles". *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 4399-4404.

Spencer, T.E., Bazer, F.W. 1995 "Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* **53**:1527-1543

Sterzick, K., Dallenbach, C., Schneider, V. 1988. "In vitro fertilization: the degree of endometrial insufficiency varies with the type of ovarian stimulation". *Fertil Steril.* **50**:457-462.

Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., von Wolff. 2006. "The human endometrium as a fertility-determining factor". *Hum Reprod Update* **12**:617-630.

Surveyor, G.A., Gendler, S.J., Pemberton, L., Das, S.K., Chakraborty, I., Julian, J., et al. 1995. "Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the Mouse uterus". *Endocrinology* **136**:3639-47

Taylor, H.S., Arici, A., Olive, D., Igarashi, P. 1998. "HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium". *J Clin Invest* **101**:1379-84.

Taylor, H.S., Bagot, C., Kardana, A. et al. 1999. "HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis". *Human Reprod* **14**:1328-31.

Tesarik J., Hazout A., Mendoza C. 2003. "Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function". *Reprod Biomed Online*. **7**:59-64

Thomas, S.M., Brugge, J.S. 1997. "Cellular functions regulated by Src family kinases". *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:513-609.

Torry, D.S., Holt, V.J., Keenan, J.A. et al. 1996. "Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium". *Fertil Steril* **66**:72-80.

Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T. et al. 2005. "Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation". *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:14326-31.

Tsai, M.J., O'Malley, B.W. 1994. "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid superfamily members". *Annu Rev Biochem* **63**:451-86.

Ubaldi, F., Bourgain, C., Tournaye, H., Smitz, J., Van Steirteghem, A., Devroey, P. 1997. "Endometrial evaluation by aspiration biopsy on the day of oocyte retrieval in the embryo transfer cycles in patients with serum progesterone rise during the follicular phase". **67**: 521-6

Ubaldi, F., Smitz, J., Wisanto, A. et al. 1995 "Oocyte and embryo quality as well as pregnancy rate in intracytoplasmic sperm injection are not affected by high follicular phase serum progesterone." *Hum Reprod* **10**:3091-6

Van der Gaast, M.H., Classen-Linke, I., Krusche, C.A., Beier-Hellwig, K., Fauser, B.C., Beier, H.M., Macklon, N.S. 2008. "Impact of ovarian stimulation on mid-luteal endometrial tissue and secretion markers of receptivity". *Reprod Biomed Online*. **17**: 553-563.

Van der Gaast, M.H., Macklon, N.S., Beier-Hellwig, K., Krusche, C.A., Fauser, B.C., Beier, H.M., Classen-linke, I. 2009 "The feasibility of a less invasive method to assess endometrial maturation- comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy" *BJOG* **116**:304-12.

Van Vaerenbergh, I., Van Lommel, L., Ghislain, V., In't Veld, P., Schuit, F., Mousavi Fatemi, H., Devroey, P. and Bourgain, C. 2009. "In GnRH antagonist/rec-FSH stimulated cycles, advanced endometrial maturation on the day of oocyte retrieval correlatos with altered gene expresión." *Hum Reprod* **24**(5): 1085-1091.

Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Papanikolaou, E., Bontis, J., Devroey, P., Tarlatzis, B.C. 2007. "Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in-vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* **13**:343-355.

Wahlstrom, T. and Sápala M. 1984. "Placenta protein 12 (PP12) is induced in endometrium by progesterone". *Fertil Steril* **41**: 781-784.

Wynn, R. M., Jollie, W., P. 1989. "The human endometrium: cyclic and gestational changes". *Biology of the Uterus*. 2nd edn. New Cork: Plenum, pp289-332.

Yanaihara, A., Otsuka, Y., Iwasaki, S. et al. 2005. "Differences in gene expression in the proliferative human endometrium" *Fertil Steril* **83**(suppl 1):1206-15.

Yoshioka, K., Matsuda, F., Takakura, K. et al. 2000. "Determination of genes involved in the process of implantation: application of GeneChip to scan 6500 genes". *Biochem Biophys Res Commun* **272**:531-8.

Younis, J., Matilsky, M., Radin, O., Ben-Ami, M. 2001 "Increased progesterone/estradiol ratio in the late follicular phase could be related to low ovarian reserve in in vitro fertilization-embryo transfer cycles with a long gonadotropin hormone agonist" *Fertil Steril* **76**:294-299.

Younis, J., Soltsman, S., Izhaki, I., Radin, O., Bar-Ami, S., Ben-Ami, M. 2010. "Early and short follicular gonadotropin-releasing hormone antagonist supplementation improves the meiotic status and competence of retrieved oocytes in in vitro fertilization embryo-transfer cycles". *Fertil Steril* . **94**:1350-5

Zhang, D., Sun, C., Ma, C., Dai, H., Zhang, W. 2012, "Data mining of spatial-temporal expression of genes in the human endometrium during the window of implantation" *Reprod Sci* **19**:1085-98

ANEXOS

Anexo 1.

HOJA DE INFORMACIÓN A LA DONANTE

Se le invita a formar parte en un estudio de investigación clínica realizado en mujeres que se someten a estimulación ovárica para la donación de ovocitos. Antes de decidir sobre su participación es importante que usted entienda por qué se realiza el estudio y que se espera de usted, así como los riesgos e inconvenientes que pueden relacionarse con la participación en este estudio. Tómese su tiempo leyendo la información y no dude en preguntar a su doctor/a si tiene alguna pregunta.

INTRODUCCIÓN

La estimulación ovárica consiste en la administración de diferentes tipos de preparados hormonales y tiene como finalidad el crecimiento de varios folículos (lugar donde están los óvulos en los ovarios) y la obtención de varios ovocitos. Es el procedimiento utilizado habitualmente para la fecundación *in vitro* y para la donación de ovocitos.

PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO

El propósito de este estudio de investigación clínica es estudiar el efecto que estas hormonas administradas para estimular los ovarios tienen sobre el endometrio. El endometrio es el tejido que recubre la superficie interna del

útero y donde se implanta el embrión. El adecuado desarrollo de este tejido es fundamental para que se produzca el embarazo.

Se investigarán los efectos sobre el endometrio de dos protocolos diferentes de fármacos: uno incluyendo antagonistas de GnRH y FSH y otro incluyendo los dos anteriores y LH, que se aplicarán en dos ciclos de tratamiento (dos ciclos de donación de ovocitos) a la misma mujer.

PROCEDIMIENTOS

Es importante que antes de aceptar participar en este estudio lo entienda completamente y esté dispuesta a cumplir con los procedimientos incluyendo la aplicación de la medicación y la asistencia a las visitas programadas.

El tipo de medicación, las dosis y los días de duración del tratamiento son similares a los que se utilizan habitualmente para los tratamientos de donación de ovocitos.

La mayoría de las visitas formarán parte de los procedimientos normales en tratamientos para donación de ovocitos: en todas se realizará una ecografía transvaginal para medir el tamaño de los ovarios, el número y tamaño de los folículos y el grosor del revestimiento de su útero. Se tomará una muestra de sangre para evaluar el efecto de la medicación.

El día de la extracción de los ovocitos se le realizará una biopsia endometrial cuando esté bajo el efecto de la sedación. Esto consiste en la toma de una pequeña cantidad de revestimiento interno del útero para su posterior análisis.

Después de la retirada de los óvulos usted comenzará a aplicarse un medicamento por vía vaginal durante 12 días. Cinco días después de la

punción de los ovarios realizará una visita para una nueva toma de sangre y biopsia de endometrio.

La última visita será con su menstruación para control del retorno a la normalidad de sus ovarios.

En un ciclo posterior de donación se realizarán los mismos procedimientos pero utilizando el esquema alternativo de medicación.

La duración aproximada del estudio será de 3 meses no consecutivos.

Su participación en el estudio es voluntaria y puede retirarse de él en cualquier momento sin dar ninguna razón. Si elige hacer esto deberá notificarlo al personal de la clínica. No se le recogerá información adicional y podrá pedir que las muestras de sangre retenidas previamente se destruyan.

RIESGOS POTENCIALES/MOLESTIAS

Como los fármacos y las dosis utilizadas en este estudio son similares a las utilizadas habitualmente en la estimulación ovárica para donación de ovocitos, su aplicación no supone un riesgo adicional a los descritos para esta técnica.

No se han descrito efectos secundarios relevantes derivados de la aplicación vaginal de progesterona.

La biopsia de endometrio es un procedimiento mínimamente invasivo, que consiste en la introducción de una sonda o cánula en el interior del útero, por vía vaginal y la extracción de una pequeña cantidad de tejido de revestimiento interno del mismo. Puede producir ligeras molestias o un sangrado escaso. Raramente produce dolor intenso, mareo, hemorragia prolongada o infección. Estos síntomas son temporales y no dejan secuelas a largo plazo.

CONFIDENCIALIDAD Y PROTECCIÓN DE DATOS

Toda la información proporcionada por usted se tratará como confidencial. Su identidad y su nombre no se pasarán a otros, solo se conocerán por el personal que la trate en la clínica.

Los resultados de este estudio pueden presentarse en conferencias o publicaciones, pero su identidad no se descubrirá en estas presentaciones.

Anexo 2.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El dr/a. _____
me ha informado acerca de la naturaleza y propósito de este estudio. Él/ella también me ha informado acerca de los productos y procedimientos implicados en este estudio.

Se me han explicado los riesgos, me ha dado la oportunidad de proponer cualquier pregunta con respecto al estudio y sé que la participación en este estudio es voluntaria.

Soy consciente del hecho de que es posible que me retire del estudio en cualquier momento sin penalización.

También soy consciente del hecho de que mi identidad nunca se descubrirá en ninguna publicación hecha como resultado de este estudio clínico.

Sé que la información se trata confidencial y apropiadamente codificada.

He leído el “consentimiento informado” y me han explicado minuciosamente el estudio y estoy de acuerdo en participar en este estudio.

Consiento,

DNI.

