

Descifrando los enigmas de la implantación durante la era postgenómica - Segunda Parte

Idelma Serpa

Tesis para la Carrera de Postgrado en Ginecología y Obstetricia - Universidad Nacional de Rosario
Reproducción 2010;25:82-94

Era postgenómica

Comprender los cambios moleculares que ocurren durante la ventana de implantación es fundamental para el conocimiento del proceso de reproducción humana.⁸⁰

Durante los últimos 50 años se han intentado correlacionar los cambios morfológicos del endometrio con marcadores moleculares en un intento por comprender la ventana de implantación, pero sin obtener resultados aplicables en la práctica clínica.

Con la decodificación del genoma humano (anunciada en el 2003)⁸¹ el enfoque del proceso de implantación ha cambiado. Se sabe que los genes no actúan en una sola célula sino que actúan en complicadas redes, con complicadas funciones.

Esta nueva visión hizo necesaria la creación de una herramienta innovadora, la tecnología transcripcional o *microarray*.

Bases del *microarray*

El *microarray* es una tecnología innovadora que permite el análisis de miles de genes, en forma simultánea, a partir de una pequeña muestra de material biológico.^{2, 82}

Si bien existen variados protocolos y tipos de *microarrays*, la técnica se basa en el principio de complementariedad de la doble cadena de ADN, utilizando un *chip* de ADN (del inglés DNA *microarrays*). Este *chip* o plataforma de *microarray* es una superficie sólida a la cual se unen una serie de fragmentos de ADN. Las superficies empleadas

para fijar el ADN son muy variables y pueden ser vidrio, plástico e incluso *chips* de silicio.

El experimento básico consiste en la extracción del total del ARN de una muestra del tejido en investigación y de tejido control. Este ARN es sometido a la acción de la transcriptasa inversa, obteniéndose así ADN complementario, el cual se tiñe con fluoresceína: Cy3, verde o Cy5, rojo. Los fragmentos de ADN se adhieren luego al *chip* o plataforma de *microarray* que contiene el ADN complementario de determinados genes que se quieren investigar (hibridación). Luego se procede a realizar un lavado para eliminar los fragmentos no adheridos y se somete la plataforma a la acción de un láser; las emisiones resultantes son leídas según la intensidad de la fluoresceína aplicada. Un *software* informático especializado se utiliza para identificar la expresión diferencial de los genes⁸³ (Figura 1).

Existen diferentes *chips* o plataformas de *microarray* disponibles, según los genes que se quieren investigar. El preparado comercial más utilizado es el *Affimetrix* (Santa Clara, CA, USA)

Perfil génico del endometrio durante la ventana de implantación

A. En ciclos naturales

En los últimos cinco años los investigadores han enfocado todos sus esfuerzos para poder dilucidar el perfil genético del endometrio receptivo. En estos genes está la clave del desarrollo del endometrio en cualquier momento del ciclo y particularmente durante la ventana de implantación.⁸²

Con la tecnología *microarray* se han logrado

Correspondencia: Idelma Serpa
E-mail: idelmaserpa@yahoo.com.ar

numerosos avances en la identificación de genes involucrados en el proceso de implantación. Varios estudios han sido publicados, reportando la aparición de determinados genes durante la fase lútea temprana, fase secretora tardía y durante la ventana de implantación. En estos estudios se analizó la expresión de genes en biopsias de endometrio tomadas en diferentes etapas del ciclo menstrual.

En sus estudios, Carson y col,⁸⁴ Kao y col,⁸⁵ Borthwick y col⁸⁶, Riesewijk y col⁸⁷ y Mirkin y col⁸⁸ demostraron cambios en la expresión de los genes a lo largo del ciclo menstrual (Tabla 2).

En todos estos estudios se ha utilizado la misma plataforma de *microarray* (*Affymetrix*), lo que permite estimar comparaciones entre ellos. Pero existen diferencias significativas, como la utilización de diferentes *softwares* para el análisis, el tamaño muestral, la edad de las pacientes intervinientes y el día de toma de muestra de biopsia del ciclo en comparación.

En sus estudios Kao y col⁸⁵ y Riesewijk y col⁸⁷ utilizaron ARN para analizar con *microarrays*, y los otros tres, ADN.

El estudio de Riesewijk y col es el único que analiza muestras endometriales de la misma pa-

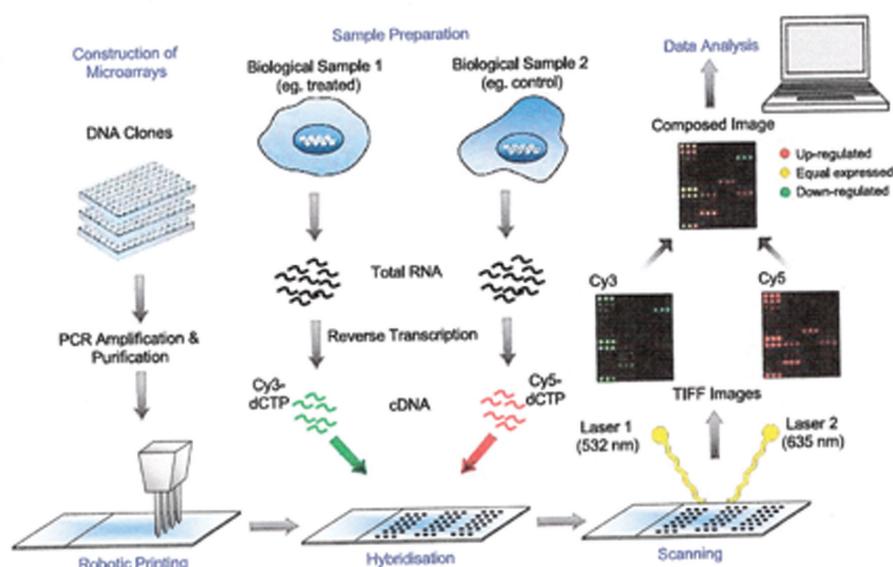
ciente en fase secretoria temprana y media del mismo ciclo menstrual.⁸⁷ Con respecto a esto existen controversias, y por un lado, permite analizar el endometrio de la misma paciente en distintos periodos del ciclo, por otro lado, ese endometrio biopsiado presentará cambios inflamatorios que podrían llegar a influir (o no) en la receptividad endometrial.

Una de las diferencias más importante entre los estudios se debe al análisis de diferentes etapas del ciclo menstrual (proliferativa y secretora), que se ve reflejado en la gran variabilidad de genes regulados en más y en menos.

Estas diferencias en el diseño de los estudios posiblemente sean las responsables de los diversos genes identificados en cada estudio.

La figura que se presenta a continuación (Figura 2) muestra la distribución de los diferentes grupos de genes encontrados en los estudios de Kao y col,⁸⁵ Carson y col,⁸⁴ Borthwicck y col,⁸⁶ Riesewijk y col,⁸⁷ y Mirkin y col.⁸⁸ Los genes con función biológica desconocida representan el grupo más grande de todos los grupos de genes. Proteínas de superficie celular, marcadores extracelulares, factores de crecimiento y citoquinas representan una fracción importante de genes *up*-regulados duran-

Figura 1. Técnica de microarray: se aísla ARN de una muestra de endometrio y se incorpora un nucleótido con fluoresceína (Cy3/Cy5). El ARN marcado es convertido en ADN mediante la transcriptasa inversa, luego es hibridizado en un chip y, previo lavado, es escaneado y analizado utilizando la bioinformática (Mirkin S y col. *Hum Reprod* 2005;20:2104-17, White C, Salamonsen L. *Reproduction* 2005;130:1-13).



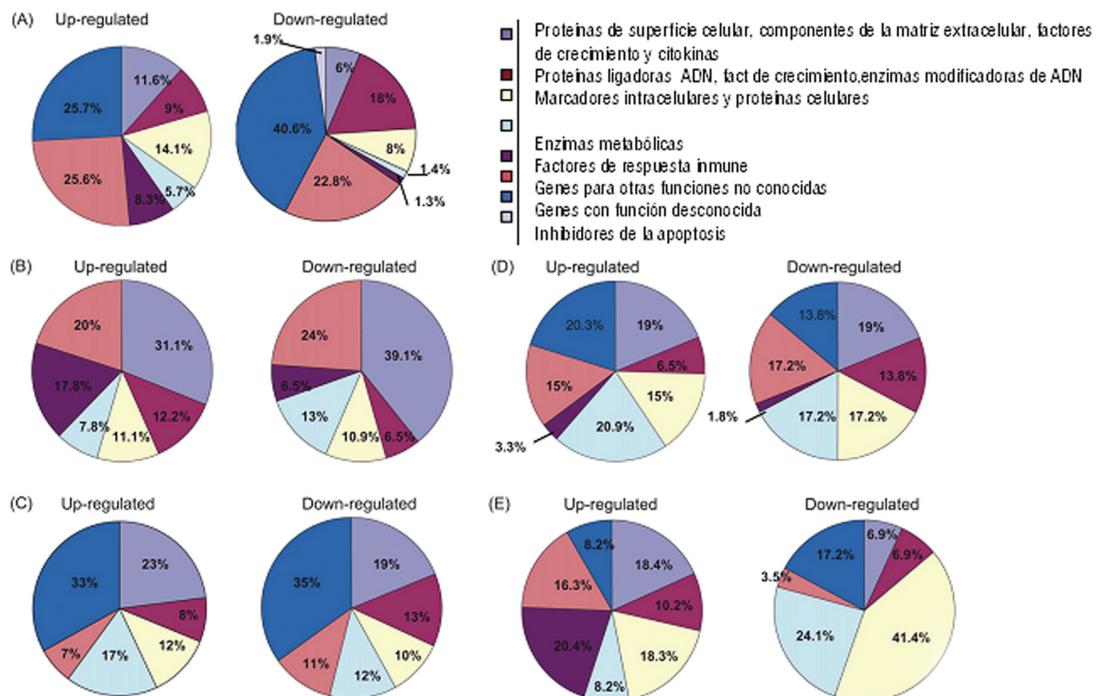
te la fase secretoria media, así como también genes que regulan señales intracelulares y proteínas del ciclo celular. Genes asociados a inmunidad celular fueron hallados en cuatro de los cinco estudios, lo que implica un rol fundamental de este sistema en

el endometrio antes y durante el proceso de implantación. Genes que codifican proteínas-ligandos de ADN, factores de transcripción y enzimas modificadoras de ADN representan una parte importante de los genes *down*-regulados.⁸

Tabla 2. Características de los diferentes estudios de microarray durante la ventana de implantación.

Estudio	Muestras N=	Edad	Primera muestra (día del ciclo)	Segunda muestra (día del ciclo)	Array	Pool ARN
Kao y col.	11	28-39	Fase proliferativa tardía (8-10)	Ventana implantación (LH+8-LH+10)	Affimetrix HG-U95A	si
Carson y col.	6	S/D	Fase secretora temprana (LH+2-LH+4)	Ventana implantación (LH+7-LH+9)	Affimetrix HG-U95A	si
Riesewijk y col.	10	23-39	Fase secretora temprana (LH+2)	Ventana implantación (LH+7)	Affimetrix HG-U95A	no
Borthwick y col.	10	23-44	Fase proliferativa tardía (9-11)	Ventana implantación (LH+6-LH+8)	Affimetrix HG-U95A	si
Mirkin y col.	8	24-32	Fase secretora temprana (LH+3)	Ventana implantación (LH+8)	Affimetrix HG-U95A	no

Figura 2. Distribución de los diferentes grupos de genes: A) resultados de Kao y col;⁸⁵ B) Riesewijk y col;⁸⁷ C) Carson y col;⁸⁴ D) Borthwick y col;⁸⁶ y E) Mirkin y col.⁸⁸



Comparación de los resultados de *microarray*

En cada uno de estos cinco trabajos cientos de genes fueron identificados en las muestras de biopsias de endometrio en las diferentes fases del ciclo (Tabla 3). Pero sólo existe una minoría de genes que resultaron similarmente regulados.

La osteopontina (OSP) es el único gen *up*-regulado en todos los estudios (Tabla 4).

Inesperadamente ciertas moléculas que tienen un rol establecido en el proceso de implantación, como el LIF, HOXA-10 y HB-EGF presentaron discrepancia entre los cinco estudios, lo que genera confusión en la identificación de éstos como marcadores definitivos de receptividad endometrial.

Tabla 3. Resultados de los diferentes estudios de *microarray* durante la ventana de implantación.

Estudio	Genes <i>up</i> -regulados	Genes <i>down</i> -regulados
Kao y col.	156	377
Carson y col.	323	370
Riesewijk y col.	153	58
Borthwick y col.	90	46
Mirkin y col.	49	58

Tabla 4. Comparación de los resultados de *microarray*.

Nombre del gen	Kao y col	Carson y col	Rieswijk y col	Borthwick y col	Mirkin y col
DAF (CD55)	+		+	+	+
MAOA	+		+	+	+
Osteopontina	+	+	+	+	+
GADD45A	+		+	+	+
SERPING			+	+	+
IL-15	+	+	+		+
Annexin IV	+		+		+
MAP3K5	+		+	+	+
CIR	+			+	+
IDB-4	+		+		+

Limitaciones de los estudios

A partir del análisis de estos trabajos surgen dudas alarmantes: ¿por qué los resultados difieren tanto entre sí? ¿Por qué cinco laboratorios, utilizando altísima y costosa tecnología, obtuvieron resultados que no son replicables? ¿Cuál es el problema?

Diferentes motivos podrían explicar tal dilema. Algunos fueron analizados más arriba, como por ejemplo, la diferencia en los días de obtención de la biopsia endometrial y los distintos procedimientos quirúrgicos utilizados, el tamaño muestral pequeño, y la utilización de diferentes *softwares* para el análisis del *microarray*.

Otro motivo, y tal vez el más importante, es que cada grupo de investigadores analiza ciertos genes que ellos consideran relevantes en cuanto a la receptividad endometrial.

Entonces, “hasta que no se homogenice la forma de conducir estos estudios, hasta que los laboratorios no compartan la información obtenida en cada estudio realizado para obtener una sola base de datos controlada, a la cual cada investigador pueda tener acceso, los esfuerzos por encontrar los genes que abren, cierran y mantienen la ventana de implantación se diluirán en la complejidad del genoma humano” (Mirkin S, SAE GRE 2008).

Otra limitación de estos estudios es que sólo se han enfocado en el análisis del endometrio. En este modelo un elemento importante está ausente: el blastocisto.

En conclusión, se ha logrado la caracterización del perfil génico del endometrio a lo largo del ciclo menstrual natural.

En el trabajo de Mirkin y col de 2005 se ha demostrado la expresión de 107 genes durante la ventana de implantación.⁸⁸ Utilizando similar tecnología *microarray*, otros investigadores han estudiado las diferencias de expresión de genes endometriales, en ciclos naturales, tanto en la fase proliferativa como en la fase receptiva [(Kao y col, 2002;⁸⁵ Borthwick y col, 2003,⁸⁶ Riesewijk y col, 2003,⁸⁷ en fase lútea temprana y fase lútea media (Horcajadas y col, 2004)].⁸⁹

Franchi y col en 2008 a través del estudio, mediante *microarray*, de tres genes inmunomoduladores específicos DAF, IL-15, y osteopontina, ha demostrado una tendencia en cuanto a un incremento progresivo de la expresión del perfil génico

del endometrio desde su fase pre-receptiva a su fase receptiva.¹²

Correlación témporo-espacial de ciertos genes durante la VI

Sabemos que con la tecnología *microarray* se puede identificar la expresión de genes en una muestra de tejido endometrial, pero sin distinción de los tipos celulares que conforman el endometrio. Algunos genes aumentan o disminuyen su expresión durante la ventana de implantación en forma distinta dependiendo si se analiza esta expresión a nivel de las células epiteliales o de las células del estroma.

Franchi en su trabajo ha podido analizar las respuestas de cada célula en forma específica durante la ventana de implantación utilizando una nueva tecnología, la microdissección con captura láser (MCL), (Figura 3).¹²

Poco se conocía hasta el momento sobre las diferencias de expresión entre el epitelio y el estroma. Este estudio pudo caracterizar temporal y espacialmente la expresión de estos tres genes (DAF, IL-15

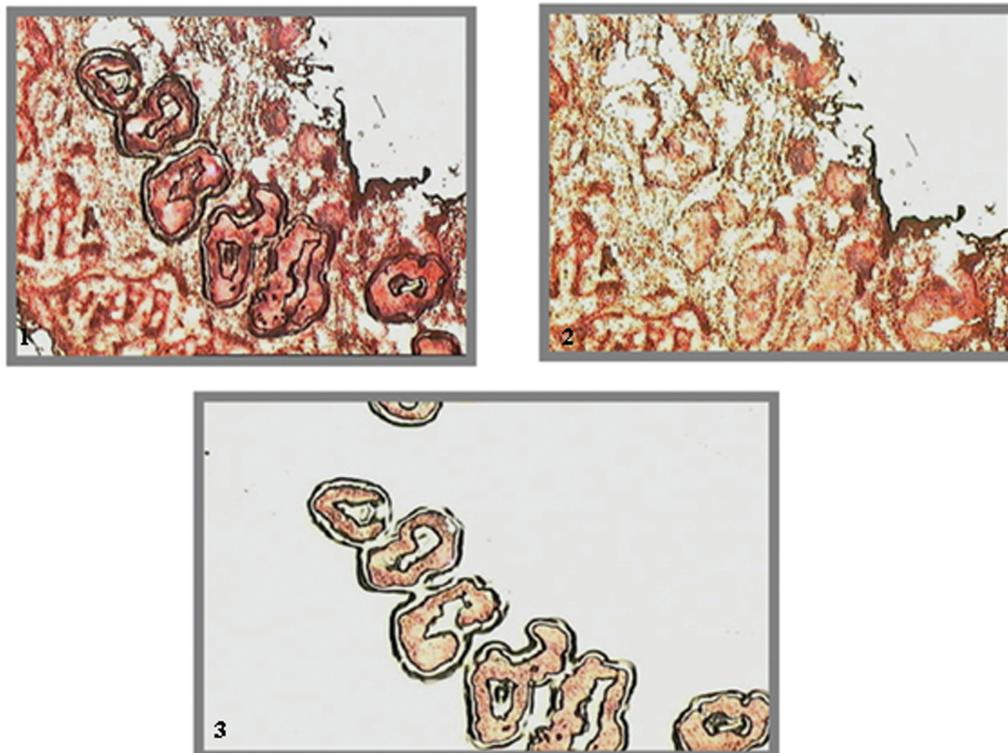
y OSP) y la localización celular de sus productos proteicos en el momento de apertura y cierre de la ventana de implantación (días 21 y 24).

Así, demostró que el DAF (*Decaying Acceleration Factor*) está presente tanto en las células del estroma como en las células glandulares a lo largo de toda la ventana. La expresión de la IL-15 no pudo ser identificada en las células estromales ni en las glandulares, por lo que se sugiere que su expresión está limitada a otro tipo celular, probablemente leucocitos o células del estroma perivascular adyacente a las arterias espiraladas; mientras que la osteopontina se expresó en las glándulas endometriales a lo largo de toda la fase secretora.

Con esto se demostró que se puede dar un paso más en los conocimientos sobre implantación, se puede caracterizar la expresión de proteínas en las células endometriales, y más aún, dilucidar la expresión de éstas tanto en las células glandulares como en las del estroma. Este avance podría simplificar futuras investigaciones.

En un estudio reciente Haouzi y col identi-

Figura 3. 1-Antes de la microdissección con captura láser (MCL). 2-Luego de aplicar MCL. 3-Tejido microseccionado.



ficaron una serie de nuevos genes entre los cuales seleccionaron cinco nuevos candidatos como marcadores de receptividad endometrial: lamina $\beta 3$ (LAMB3), proteína asociada a microfibrilla (MFAP5), angiopoyetina-like 1 (ANGPTL1) y glándula endocrina derivada del factor de crecimiento del endotelio vascular (EG-VEGF y NLF2).⁹⁰ Estos nuevos genes hallados (Haouzi y col, 2008) difieren de los analizados en los estudios previos (Carson y col, 2002; Riesewijk y col, 2003; Mirkin y col, 2005) probablemente debido a que en este estudio más reciente se utilizó una plataforma de *microarray* que contiene nueva información genómica: más de 30.000 genes versus los 12.000 utilizados en los otros estudios. En este estudio además, igual que en el de Riesewijk y col (2003), se analizaron biopsias de endometrio de la misma paciente en los días LH+2 y LH+7, con lo que se minimiza la intervariabilidad en el análisis de los datos, y a su vez, el tamaño muestral fue mucho mayor (n=11 versus 62).

Nuevamente, cada grupo de investigadores propone un determinado grupo de genes como marcadores líderes de receptividad endometrial. Sin embargo, es importante destacar que en este último trabajo también se encontró una regulación en más de la osteopontina y de la interleuquina 15 (IL-15), en concordancia con los cinco trabajos previamente analizados.

Probablemente si se diseñan nuevos estudios con la nueva plataforma de *microarray*, con mayor tamaño muestral y con la obtención de biopsias en las mismas pacientes en distintas fases del ciclo, los resultados podrían ser más concluyentes en cuanto a la identificación de aquellos genes que hacen que el endometrio se transforme en receptivo.

Perfil génico del endometrio durante la ventana de implantación

B. En ciclos estimulados

Existen especulaciones sobre que la hiperestimulación ovárica controlada (COH) durante la fertilización *in vitro* (FIV) influye en forma negativa sobre la implantación embrionaria, en comparación con los ciclos naturales, y que la expresión de los genes se ve modificada. Estas especulaciones surgen a partir de que la COH en reproducción asistida produce una menor tasa de implantación por embrión transferido en comparación con ciclos naturales y ciclos con ovodonación.⁹¹

Varios trabajos han demostrado que concentraciones suprafisiológicas de estradiol el día de la administración de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hGC) resultaron en efectos deletéreos sobre la implantación del embrión.⁹²⁻⁹⁵ Estos altos niveles hormonales son necesarios en reproducción asistida para lograr reclutar un mayor número de ovocitos por ciclo, pero con efectos adversos sobre el endometrio.

Mirkin y col realizaron un estudio comparando la expresión de genes durante la ventana de implantación en ciclos naturales versus ciclos estimulados.² El protocolo utilizado fue FSH recombinante (FSHr), GnRH antagonistas y GnRH agonistas con y sin soporte lúteo con progesterona micronizada. En este estudio se demostró que en los ciclos estimulados la receptividad endometrial se encuentra deteriorada, pero se hallaron cambios mínimos en el perfil de expresión de los genes, sin que esto signifique una gran variabilidad funcional en la implantación del blastocisto. Más de 3.000 genes se expresaron en las muestras de endometrio y sólo 18 fueron diferentes entre los grupos en comparación. A su vez, al comparar ciclos estimulados usando agonistas del GnRH versus antagonistas, se encontró que existen ciertos cambios en la expresión de genes (diferencia en 13 genes), pero que no son significativos. Por último, al analizar el impacto de la administración de progesterona micronizada sobre la expresión de los genes durante la ventana de implantación, se encontró que no existen grandes diferencias entre su uso y su omisión.

Sin embargo, Horcajadas y col y Simon y col demostraron en sus trabajos una gran diferencia de expresión en los genes cuando compararon ciclos naturales con ciclos con estimulación ovárica controlada.⁹⁶⁻⁹⁸

En el estudio de Horcajadas se evaluaron ciclos estimulados con FSH purificada y agonistas del GnRH, sin administración de progesterona durante la fase lútea, utilizando las mismas pacientes en sus ciclos naturales y estimulados. Más de 200 genes se expresaron en forma distinta.

En un estudio reciente (Macklon y col, 2008) se evaluó el impacto de la estimulación ovárica con FSHr en combinación con GnRH antagonistas, sin soporte de progesterona exógena durante la fase lútea.⁹⁹ Demostró que la estimulación ová-

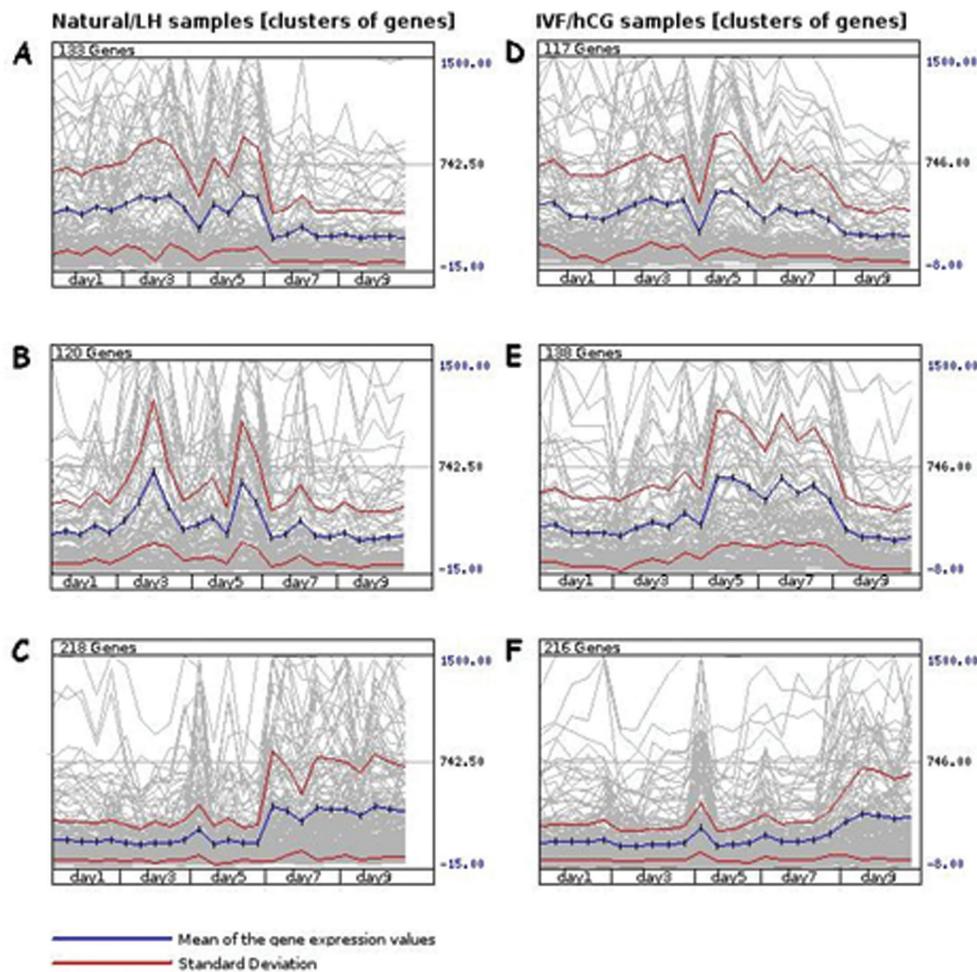
rica produce una desregulación en la expresión de genes, pero no en forma significativa, al comparar ciclos con FSHr con ciclos naturales en la misma paciente.

Horcajadas y col compararon, recientemente, la expresión del perfil génico del endometrio humano, durante la ventana de implantación, en ciclos naturales versus ciclos estimulados (protocolo largo con agonistas del GnRH, FHS altamente purificada y hMG).¹⁰⁰ Evaluaron mediante *microarray* (*Afimetrix*) biopsias de endometrio de mujeres jóvenes y fértiles en ciclos naturales y en ciclos estimulados, utilizando a las mismas pacientes como casos y controles, eludiendo en parte, la intervariabilidad de las muestras. Las biopsias fueron obtenidas los días LH y hCG +1, +3, +5, +7,

+9, respectivamente. Las muestras endometriales correspondientes a los días +1, +3, +5 y +9 mostraron un perfil génico similar; mientras que las muestras de LH y hCG+7 mostraron diferencias estadísticamente significativas en su perfil génico. Se sabe que el día LH+7 marca la apertura de la ventana de implantación, dicho de otra manera, es el día en que el endometrio se transforma en receptivo. Se demostró a su vez que la receptividad endometrial se encuentra retrasada en dos días en los ciclos estimulados, en comparación con los ciclos naturales, ya que la regulación en más o en menos de los genes que se conocen involucrados en la ventana de implantación muestra este patrón de expresión con dos días de retraso (Figura 4).

Con este estudio por primera vez se ha demos-

Figura 4. Perfil génico dinámico obtenido por espectometría láser que muestra la regulación en más y en menos en los días 1 a 9 en las muestras LH (A, B, C) y hCG (D, E, F). Los genes están agrupados según función biológica. En A se presenta una down-regulation en el día 7 que aparece en D en el día 9, igual que en B comparada con E; y up-regulation en día 7 de C que aparece en día 9 de F.



trado el sustrato molecular del impacto de la hiperestimulación ovárica controlada en el endometrio humano, específicamente durante la ventana de implantación.

Este trabajo, al demostrar claramente que en ciclos estimulados existe un retraso de dos días para alcanzar la receptividad endometrial, contradice los trabajos de Nikas y col,¹⁰¹ y Kolb y col¹⁰² en los que hallaron que en ciclos estimulados el endometrio se transformaba en receptivo con dos días de anticipación, en comparación con ciclos naturales. En estos dos últimos estudios se determinó la receptividad endometrial mediante criterios histológicos solamente. Como se advirtió anteriormente en este trabajo, los pinópodos presentan variabilidad de una mujer a otra en cuanto a su aparición y además el tiempo en el que se hacen presentes es muy breve, por lo que la base científica de estos trabajos es incompleta y poco confiable.

Los investigadores han demostrado que existe una desregulación en la expresión de genes durante la ventana de implantación en pacientes sometidas a estimulación ovárica. Sin embargo, la evidencia presentada hasta el momento, no indica que esta desregulación en el perfil génico sea la causa directa de la disminución de la receptividad endometrial observada clínicamente en estas pacientes, ya que se logran embarazos con estimulación ovárica y con la aplicación de técnicas de reproducción asistida.

El retraso genómico observado en el estudio de Horcajadas y col es interesante para identificar nuevos genes marcadores de receptividad y lograr así un mayor entendimiento del desarrollo endometrial durante la estimulación ovárica controlada, para poder hallar la estimulación que más se asemeje a los cambios hormonales y génicos que se producen en los ciclos naturales.

Participación del blastocisto

Durante el proceso de implantación son dos los factores que establecen un diálogo: el embrión y el endometrio. El endometrio sometido a diferentes estímulos paracrinos y endocrinos, y el embrión en cambio, mucho más libre y sólo dependiente de su carga genética y de su capacidad de implantarse.¹⁰³

Pocos estudios han utilizado modelos humanos para investigar la relación ultraestructural entre el blastocisto y el epitelio endometrial.

Carver y col demostraron en modelos humanos *in vitro* que la secreción de hCG por parte del blastocisto en fases tempranas de la implantación representa una participación importante en el proceso de implantación.¹⁰⁴

Sherwin, mediante *microarray*, analizó la expresión de genes en biopsias de endometrio durante el período preimplantatorio en modelos vivos de monos Baboons tratados con hCG. Encontró 61 genes *up* y *down* regulados.¹⁰⁵ Esto indicaría que la hCG secretada por el blastocisto no sólo tiene capacidad luteotrópica, manteniendo el cuerpo lúteo, sino que además induce cambios en la expresión de genes endometriales que regulan la adhesión embrionaria y modulan la respuesta inmune en el sitio de implantación mediante señales paracrinas.

En otro estudio Kashiwagi también demostró que existe una regulación diferente de los genes en presencia del embrión.¹⁰⁶ Analizó biopsias de endometrio de murinos mediante *microarray* en presencia y ausencia del embrión. Mil quinientos genes fueron regulados de manera distinta en presencia del embrión.

Hess, en el 2007, utilizando *microarray*, investigó el perfil génico de cultivo de células endometriales purificadas y encontró 4.817 genes que se regulaban en forma distinta en presencia o ausencia de embrión.¹⁰⁷

Está claro que el rol del blastocisto para la implantación es de suma importancia. Dilucidar su función exacta es tema de futuras investigaciones.

Implantación en situaciones especiales

A. *Leiomiomas uterinos*

Los miomas son tumores benignos de las células musculares lisas del miometrio. Representan una de las patologías ginecológicas más frecuentes en la edad reproductiva (20-40%), causando dolor pelviano y trastornos del ciclo menstrual.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Hasta el momento no se han podido demostrar los mecanismos por los cuales los miomas serían causa de infertilidad, por lo que su tratamiento es causa de controversias.¹¹¹ Sin embargo, existe un consenso general en cuanto a que los miomas submucosos y los intramurales que protuyen hacia la cavidad uterina producen una disminución de las tasas de implantación y de embarazo, y que su extirpación quirúrgica constituiría el tratamiento adecuado.^{110,111}

Con respecto a los miomas intramurales, las controversias continúan debido a que no existen trabajos consistentes disponibles.

Se han analizado las tasas de embarazo en pacientes a las que se les realizó FIV o ICSI y que presentaban miomas intramurales. Algunos autores encontraron una disminución de las tasas de embarazo en estas pacientes, aún en aquellas con miomas pequeños,^{112,113} mientras que otros autores reportaron que los miomas no afectaban los resultados de las técnicas de alta complejidad, ni siquiera aquellos de entre cuatro y siete centímetros.¹¹⁴⁻¹¹⁷

Además, varios estudios compararon la presencia de uno versus múltiples miomas, pero no se pudo demostrar que el número de miomas tenga una relación proporcional con infertilidad.¹¹¹⁻¹¹⁵

Se llevó a cabo un trabajo en el que se estudió el efecto de leiomiomas intramurales y submucosos sobre el endometrio receptivo a través del estudio de marcadores moleculares como HOXA 10, HOXA 11 y LIF, y se encontró que la expresión de estos marcadores se encuentra disminuida en las pacientes con miomas submucosos, pero no así en las pacientes con miomas intramurales.¹¹⁸

En un estudio reciente se analizó mediante *microarray* la expresión de genes a nivel endometrial durante la ventana de implantación en mujeres con miomas.¹¹⁰ Se tomaron biopsias de endometrio de mujeres con leiomiomas intramurales únicos y múltiples, mayores y menores a 5 cm y se las comparó con mujeres con antecedentes de miomectomía y mujeres sin patología uterina. Se encontró que en el endometrio de mujeres con miomas intramurales existe una desregulación en el perfil génico del endometrio receptivo. Sin embargo, de los 25 genes analizados, 22 presentaron patrones normales de expresión ante la presencia de leiomiomas intramurales, lo que sugiere que la receptividad endometrial, como proceso biológico, no estaría afectada en estas pacientes. A su vez, los genes regulados en menos durante la ventana de implantación en presencia de miomas también se encontraron disminuidos en otra condición de subfertilidad, como es el caso de la presencia de DIU.

Hasta el momento no se han llevado a cabo muchos estudios que analicen, mediante *microarray*, la expresión de genes a nivel endometrial durante la ventana de implantación, por lo que no

se pueden establecer conclusiones certeras respecto a la afectación de la receptividad endometrial ante la presencia de miomas uterinos.

B. Endometriosis

La endometriosis es una patología ginecológica que se caracteriza por la presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad uterina. Afecta al 10-15% de las mujeres en edad reproductiva. Se presenta clínicamente con dolor pélvico crónico, dismenorrea, dispareunia e infertilidad.¹¹⁹

Existen numerosos estudios que demuestran una asociación entre endometriosis e infertilidad, pero la relación causa-efecto no está todavía del todo comprendida.¹²⁰⁻¹²²

A lo largo de los años se han realizado numerosos estudios en los que se compararon la expresión génica entre endometrio eutópico y endometrio ectópico.¹²³⁻¹³² En la mayoría de los trabajos se encontraron grandes diferencias entre el perfil génico de biopsias de endometrio ectópico tomadas en la fase secretora tardía en comparación con biopsias de endometrio eutópico en la misma fase del ciclo.¹²³⁻¹²⁷

Matsuzaki y col compararon la expresión de genes en endometrio eutópico de pacientes controles con pacientes con endometriosis severa en varias fases del ciclo menstrual.¹²⁶ Utilizando la tecnología *microarray* y la técnica de microdissección con captura láser encontraron que en la fase secretora tardía 20 genes fueron regulados en más y 5 en menos en el compartimiento epitelial, mientras que 2 fueron regulados en más y 1 en menos a nivel del estroma.

En contraste con este trabajo, Sherwin y col no hallaron una expresión diferente en el compartimiento glandular ni en el estroma al analizar los mismos genes, también en la fase secretora tardía de biopsias de endometrio eutópico de mujeres con endometriosis mínima, moderada y severa, y mujeres sin endometriosis.¹³¹

En otro estudio, Burney y col analizaron la expresión génica de endometrio eutópico en las fases secretora temprana, media y tardía de mujeres con endometriosis y controles sanas.¹³² Estos autores encontraron que la diferencia más importante en la expresión de los genes al comparar el endometrio de ambos grupos fue en la fase secretora temprana (días 15 a 18), con una diferencia de expresión de 85 genes.

Hasta el momento los estudios realizados para investigar si existen diferencias entre el perfil génico del endometrio receptivo en pacientes con endometriosis y sin ella no aportan resultados concluyentes. El día de toma de las biopsias y la utilización de diferentes plataformas de *microarray* para realizar las investigaciones son unos de los motivos por los cuales los estudios difieren entre sí al presentar sus resultados. Otro motivo podría ser el hecho de que la endometriosis es una afectación cíclica, por lo que los efectos de los focos de endometrio ectópico sobre el endometrio eutópico pueden variar en el tiempo, en la misma paciente.^{131,133}

Otra limitación de estos estudios es el reducido número de muestras biológicas analizadas con *microarray*. A su vez, no es posible, por el momento, realizar el cálculo para estimar la cantidad de muestras necesarias para obtener un resultado estadísticamente significativo, debido a que no existe evidencia suficiente sobre la expresión génica en fase secretora tardía en pacientes con endometriosis y controles.

Por último, sería ideal el desarrollo de *tests* mínimamente invasivos para diagnosticar endometriosis mínima, moderada y severa, y así separar las muestras de endometrio para su mejor análisis.

C. Hidrosalpinx

El hidrosalpinx es una alteración de la trompa de Falopio, en la que ésta se encuentra bloqueada, dilatada y con líquido en su interior, generalmente asociada a un proceso infeccioso o inflamatorio previo.

Es una patología frecuente en la mujer en edad reproductiva. Está asociada a bajas tasas de embarazo en los programas de fertilización asistida.¹³⁴ Esto podría deberse a una alteración en la receptividad endometrial y a una expresión anormal de ciertas moléculas claves para la implantación embrionaria.¹³⁴ Así, ciertos fluidos procedentes del hidrosalpinx en la cavidad uterina interferirían en el proceso de adhesión del embrión al endometrio.^{135,136} Está descrito que la presencia de IL-2, presente en el líquido de hidrosalpinx, contribuye a la inhibición de la implantación embrionaria.¹³⁷

También se ha estudiado que existe una alteración en la expresión de ciertos marcadores moleculares que están presentes durante la ventana

de implantación.¹³⁴ La expresión de la integrina $\alpha\beta 3$ y del LIF se encuentra notablemente reducida en las pacientes con hidrosalpinx en comparación con controles fértiles.^{134,138,139} Además, se ha comprobado que luego del tratamiento quirúrgico del hidrosalpinx, los valores del LIF retornan a la normalidad.^{140,141} En un estudio *in vitro*, utilizando líquido de hidrosalpinx, se demostró una disminución dosis-dependiente de la expresión de HOXA 10 en modelos de células Ishikawa.¹⁴² Esta observación fue demostrada también *in vivo*.¹⁴³

Se necesitan más estudios, sobre todo de aquellos que utilicen la tecnología *microarray*, para determinar de qué modo exacto el hidrosalpinx interfiere con el proceso de implantación. Por el momento está demostrado que la salpingectomía, previo a la realización de técnicas de reproducción asistida, es el tratamiento adecuado de esta patología.¹⁴⁴

D. Dispositivo intrauterino

Desde hace más de cuatro décadas el DIU (dispositivo intrauterino) se ha establecido entre los métodos anticonceptivos de mayor efectividad. El DIU induce cambios a nivel del endometrio que lo transforman en refractario para la implantación embrionaria.

Se han llevado a cabo pocos trabajos que estudian los cambios endometriales en presencia del DIU, la mayoría son estudios de morfología endometrial y de análisis de ciertos genes por separado.^{145,146}

Horcajadas y col fueron los pioneros en investigar la expresión del perfil génico del endometrio durante la ventana de implantación, en la misma paciente, en presencia y ausencia de un DIU inerte.¹⁴⁷ Describieron que en presencia del DIU, 78 genes fueron regulados en más y 69 en menos; 52 de éstos correspondían a los genes que se expresan normalmente durante la ventana de implantación.

Luego analizaron la expresión de genes en el endometrio, en las mismas pacientes, a los dos meses posteriores a la extracción del DIU. Encontraron que de los 147 genes desregulados, sólo 5 genes recuperaron su expresión habitual durante la fase secretora del ciclo menstrual, y sólo 1 correspondía a los que se expresan durante la ventana de implantación.

A su vez, para evaluar los efectos a largo plazo del DIU sobre el endometrio analizaron el perfil

génico en biopsias endometriales luego de un año de extraído el DIU. Encontraron que el 80% de los genes desregulados recuperaron su expresión génica habitual durante la ventana de implantación.

Este trabajo sugiere que uno de los mecanismos de acción del DIU sería el de prevenir a gran escala la transición habitual que se produce en el perfil génico del endometrio durante la ventana de implantación y que permite que éste se transforme en receptivo.

Conclusión

Son cada vez más y más importantes los avances y conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que regulan la implantación.

La tecnología *microarray*, sin duda, ha cambiado el rumbo de las investigaciones actuales y ha permitido conocer una gran cantidad de genes que regulan la receptividad endometrial, como así también a sus productos proteicos. Se ha demostrado mediante esta técnica las variaciones génicas que presenta el tejido endometrial a lo largo del ciclo menstrual, sobre todo durante la ventana de implantación.

Con el advenimiento de la microdissección con captura láser se ha llegado un poco más allá en los conocimientos actuales, se demostró la expresión de los genes en los compartimientos endometriales específicos, lo que representa el primer paso para mejorar nuestro conocimiento acerca de la regulación de los factores que modulan el endometrio en forma endocrina o paracrina y que poseen un rol importante para el mantenimiento de la ventana de implantación.

La receptividad endometrial es un proceso biológico activo que involucra un gran número de genes que se expresan de manera precisa y coordinada. En los ciclos estimulados el patrón de expresión génica sigue caminos moleculares distintos en comparación con los ciclos naturales, modificando la transformación del endometrio pre-receptivo en receptivo. El desafío actual es identificar genes marcadores de receptividad endometrial para hallar el estímulo apropiado que resulte en un aumento de las tasas de implantación en reproducción asistida.

A su vez, se han llevado a cabo ciertos trabajos para analizar los cambios que se producen a nivel del perfil génico del endometrio en condiciones en las que la fertilidad se ve alterada, como es el caso

de la leiomiomatosis uterina, la endometriosis, el hidrosalpinx y la presencia de un dispositivo intrauterino. De estos modelos de subfertilidad analizados mediante *microarray*, sólo tres genes presentaron el mismo patrón de expresión alterados durante la ventana de implantación. El camino en este campo de investigación recién está comenzando.

Descifrar los mecanismos que participan en el intercambio entre el endometrio receptivo y el blastocisto maduro es fundamental para la comprensión del proceso de implantación embrionaria, lo que permitiría alcanzar el conocimiento respecto a las características endometriales o propias del embrión que impiden una implantación exitosa y, en base a esto, desarrollar terapéuticas tendientes a mejorar el proceso de implantación cuando éste se encuentre alterado.

Referencias

86. Borthwick JM, Charnock-Jones DS, TomBD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;9:19–33.
87. Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+ 2 versus LH+ 7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003;9:253–264.
88. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005;20:2104–2117.
89. Horcajadas JA, Riesewijk A, Martin J, Cervero A, Mosselman S, PellicerA, et al. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol* 2004;63:41–49.
90. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud K, De Vos J, Re`me T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* (Advance Access published October 3, 2008).
91. Martínez-Conejero J, Simon C, Pellicer A, Horcajadas J. Is ovarian stimulation detrimental to the endometrium? *Reprod Biomed Online* 2007;15:45-50.
92. Simón C, Cano F, Valbuena D. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum o estradiol concentrations levels in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995;10:2432–2437.
93. Simón C, García-Velasco J, Valbuena D. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril* 1998;70:234–239.

94. Simón C, Domínguez F, Valbuena D. The role of estrogen in uterine receptivity and blastocyst implantation. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:197-199.
95. Pellicer A, Valbuena D, Cano F. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril* 1996;65:1190-1195.
96. Horcajadas JA, Reijnders A, Mínguez P. Comparison of the endometrial gene expression profile throughout the window of implantation in natural versus COH cycles. *Hum Reprod* 2006;21:30.
97. Horcajadas JA, Reijnders A, Polman J. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005;11:195-205.
98. Simón C, Bellver J, Vidal C, et al. Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH-antagonist compared to GnRH-agonist treatment or in natural cycles. *Hum Reprod* 2005;12:3318-3327.
99. Macklon N, van der Gaast H, Hamilton A, Fauser B, Giudice L. The impact of ovarian stimulation with recombinant FSH in combination with GnRH antagonist on the endometrial transcriptome in the window of implantation. *Reprod Sciences* 2008;15:357-365.
100. Horcajadas J, Mínguez P, Dopazo J, Esteban F, Domínguez F, Giudice L, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* August 2008. Article in press. Doi:10.1210/jc.2008-0588.
101. Nikas G, Develiglu OH, Toner JP, Jones HW Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Human Reprod* 1999;14:787-792.
102. Kolb BA, Paulson RJ. The luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation and the possible impact of this hyperstimulation on embryo implantation. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1262-1267.
103. Giudice LC. Application of functional genomics to primate endometrium: insights into biological processes. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; (4 Suppl 1):S4.
104. Carver J, Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I, Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod* 2003;18:283-290.
105. Sherwin JR, Sharkey AM, Cameo P, Mavrogianis PM, Catalano RD, Edassery S, Fazleabas AT. Identification of novel genes regulated by chorionic gonadotropin in baboon endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2007;148:618-626.
106. Kashiwagi A, DiGirolamo CM, Kanda Y, Niikura Y, Esmon CT, Hansen TR, Shioda T, Pru JK. The postimplantation embryo differentially regulates endometrial gene expression and decidualization. *Endocrinology* 2007;148:4173-4184.
107. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, Genbecev O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* 2007;76:102-117.
108. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Myomas and reproductive function. *Fertil Steril* 2006;86:194-199.
109. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007;87:725-736.
110. Horcajadas J, Goyri E, Higón MA, Martínez-Conejero J, Gambadauro P, García G, Meseguer M, Simón C, Pellicer A. Endometrial receptivity and implantation are not affected by the presence of uterine intramural leiomyomas: a clinical and functional genomics analysis. *J Clin Endocrinol Metab* June 17, 2008, doi:10.1210/jc.2008-0565.
111. Somigliana E, Vercellini P, Daguati R, Pasin R, De Giorgi O, Crosignani PG. Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. *Hum Reprod Update* 2007;13:465-476.
112. Hart R, Khalaf Y, Yeong CT, Seed P, Taylor A, Braude P. A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 2001;11:2411-2417.
113. Khalaf Y, Ross C, El-Toukhy T, Hart R, Seed P, Braude P. The effect of small intramural uterine fibroids on the cumulative outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 2006;10:2640-2644.
114. Ng EH, Ho PC. Doppler ultrasound examination of uterine arteries on the day of oocyte retrieval in patients with uterine fibroids undergoing IVF. *Hum Reprod* 2002;3:765-770.
115. Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP, Dorszov D, Melo NR, Abdelmassih R. Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004;81:582-587.
116. Klatsky PC, Lane DE, Ryan IP, Fujimoto VY. The effect of fibroids without cavity involvement on ART outcomes independent of ovarian age. *Hum Reprod* 2007;22:521-526.
117. Parker WH. Uterine myomas: management. *Fertil Steril* 2007;88:255-271.
118. Rackow B, Taylor H. Uterine leiomyomas affect molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2006;86:S10.
119. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003;144:2870-2881.
120. Endometriosis and infertility. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril* 2004;81:1441-1446.

121. Suzuki T, Shun-ichiro Izumi, Matsubayashi H, Awaji H, Yoshikata K, Makino T. Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83:908-913.
122. Gibbons, W. Management of endometriosis in fertility patients. *Fertil Steril* 2004;81:1204-1205.
123. Eyster KM, Boles AL, Brannian JD, Hansen KA. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:38-42.
124. Lebovic DI, Baldocchi RA, Mueller MD, Taylor RN. Altered expression of a cell-cycle suppressor gene, Tob-1, in endometriotic cells by cDNA array analyses. *Fertil Steril* 2002;78:849-854.
125. Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, et al. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 2003;22:551-560.
126. Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barriere C, Pouly JL, Boespflug-Tanguy O, Penault-Llorca F, Dechelotte P, Dastugue B, Okamura K, Mage G. DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol Hum Reprod* 2004;10:719-728.
127. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Botchorishvili R, Dechelotte PJ, Mage G. Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2006;86:548-553.
128. Hu WP, Tay SK, Zhao Y. Endometriosis-specific genes identified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction expression profiling of endometriosis versus autologous uterine endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:228-238.
129. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Wang Y, Halverson G, Jaiwala P, Guo SW. Genomic alterations in ectopic and eutopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:148-159.
130. Mettler L, Salmassi A, Schollmeyer T, Schmutzler AG, Püngel F, Jonat W. Comparison of c-DNA microarray analysis of gene expression between eutopic endometrium and ectopic endometrium (endometriosis). *J Assist Reprod Genet* 2007;24.
131. Sherwin J, Sharkey AM, Mihalyi A, Simsa P, Catalano RD, D'Hooghe TM. Global gene analysis of late secretory phase, eutopic endometrium does not provide the basis for a minimally invasive test of endometriosis. *Human Reproduction* 2008;23:1063-1068.
132. Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 2007;148:3814-3826.
133. Harrison RF, Barry-Kinsella C. Efficacy of medroxyprogesterone treatment in infertile women with endometriosis: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 2000;74:24-30.
134. Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Seminars in Reproductive Medicine* 2007;25:476-481.
135. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Riad R. Fluid accumulation of the uterine cavity before embryo transfer: a possible hindrance for implantation. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1991;8:157-159.
136. Eytan O, Azem F, Gull I, Wolman I, Elad D, Jaffa AJ. The mechanism of hydrosalpinx in embryo implantation. *Hum Reprod* 2001;16:2662-2667.
137. Copperman AB, Wells V, Luna M, Kalir T, Sandler B, Mukherjee T. Presence of hydrosalpinx correlated to endometrial inflammatory response in vivo. *Fertil Steril* 2006;86:972-976.
138. Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, et al. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril* 2000;73:779-787.
139. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997;12:1393-1398.
140. The influence of hydrosalpinx on IVF and embryo transfer: a review. *Hum Reprod Update* 2000;6:387-395.
141. Seli E, Kayisli UA, Cakmak H, et al. Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) expression at the time of the implantation window. *Hum Reprod* 2005;20:3012-3017.
142. Daftary GS, Taylor HS. Hydrosalpinx fluid diminishes endometrial cell HOXA10 expression. *Fertil Steril* 2002;78:577-580.
143. Daftary GS, Kayisli U, Seli E, Bukulmez O, Arici A, Taylor HS. Salpingectomy increases peri-implantation endometrial HOXA10 expression in women with hydrosalpinx. *Fertil Steril* 2007;87:367-372.
144. Johnson NP, Mak W, Sowter MC. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev* 2004.
145. Jones RL, Critchley HO. Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 2000;3:162-172.
146. Rutanen EM. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the endometrium. Effect of intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 2000;3:173-181.
147. Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JRA, Domínguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, Simón C. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3199-3207.