



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL
“ERA” (Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA
DE EMBRIONES VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
SUBESPECIALISTA EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

PRESENTA:
DRA. ANGÉLICA SARAÍ BRACAMONTE DÍAZ

TUTOR:
DR. PEDRO GALACHE VEGA
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

MONTERREY, NUEVO LEÓN A 23 DE FEBRERO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Tema	Página
1.0 Justificación	4
2.0 Marco teórico	6
3.0 Planteamiento del problema	17
4.0 Hipótesis	18
5.0 Objetivo	18
5.1 Objetivo principal	
5.2 Objetivo secundario	
6.0 Materiales y métodos	19
6.1 Diseño del estudio	
6.2 Población y muestra	
7.0 Criterios de selección	20
7.1 Criterios de inclusión	
7.2 Criterios de exclusión	
7.3 Criterios de eliminación	
8.0 Instrumentos y procedimientos	21
9.0 Resultados	25
10.0 Discusión	34
11.0 Conclusiones	38
12.0 Bibliografía	40
13.0 Anexos	44

Agradecimientos

Al pensar en agradecimientos vienen a mi mente muchísimas personas que de alguna u otra manera han intervenido y sido una pieza clave en poder lograr mis objetivos. Más sin embargo, todo tiene un inicio o un origen, y ese siempre será Dios, quien ha puesto en mi camino a todas esas personas y circunstancias que han hecho de esta etapa un sueño hecho realidad.

A mis padres y mi hermano, que han sido siempre la base de mi fortaleza, el amor y el apoyo incondicional que siempre he recibido. No esta demás decir que en ellos tengo el mejor ejemplo de superación constante y el amor hacia esta profesión.

A mis maestros, por brindarme en un inicio la oportunidad de formar parte de la familia IECH y por darme las herramientas necesarias para mi formación. Las enseñanzas no han sido sólo académicas, si no también enseñanzas de vida. A mis compañeros, por su apoyo, por los lazos de amistad y por compartir parte de su vida contmigo, quienes siempre podrán contar conmigo y viceversa.

*Me siento muy contenta y bendecida de finalizar una meta más...
infinitas gracias a todos.*

1.0 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, las técnicas de reproducción asistida (TRA) representan una opción más para las parejas con infertilidad. Se calcula que cada año, a nivel mundial, nacen aproximadamente 350 mil niños mediante TRA¹. El éxito de los tratamientos de fertilidad es multifactorial y los avances en la medicina, biotecnología y genómica, han permitido que los métodos de evaluación embrionaria sean cada vez más eficientes. Sin embargo, no debemos dejar aún lado la valoración del estado endometrial, pieza igualmente importante para lograr un embarazo.

Por más de 60 años, la evaluación endometrial se había realizado a través del estudio histológico basado en la morfología endometrial y sus células². Noyes y cols. describieron los cambios específicos de los diferentes compartimentos del endometrio durante las distintas fases del ciclo menstrual, llegando a ser por mucho tiempo la herramienta diagnóstica estándar para evaluar el endometrio³, conocer la etapa receptiva y detectar anomalías endometriales². A pesar de ello, ya no se recomienda como un procedimiento de evaluación de rutina en las pacientes con infertilidad⁴, debido a que es un estudio de evaluación subjetiva, observador dependiente.

Después de la descripción de los criterios de Noyes, la búsqueda de un marcador de evaluación endometrial continuó. Se han propuesto gran variedad de métodos de evaluación endometrial: marcadores bioquímicos, receptores hormonales, detección por inmunohistoquímica³, cromatografía de secreciones, PCR reversa, microensayos de ADN, estudios de microRNA⁵, entre otros. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de éstos se ha podido establecer como prueba diagnóstica³.

El punto clave en la valoración endometrial de la paciente sometida a procedimientos de reproducción asistida, es el conocer el momento “receptivo” para la implantación embrionaria, y con ello lograr la sincronía perfecta entre el embrión seleccionado y el endometrio. La llegada de la genómica funcional a permitido a los investigadores, el estudio de la regulación a nivel molecular del endometrio⁶, conociendo la expresión de los genes involucrados en cada fase del ciclo menstrual, con mayor atención en la ventana de implantación, periodo receptivo del endometrio.

En el 2011, Diaz y cols. dieron a conocer los resultados de su investigación en el Instituto Valenciano de Infertilidad, donde describen los genes involucrados en el periodo de receptividad endometrial. En su estudio se identificaron 238 genes, los cuales fueron incluidos en un microarreglo³, capaz de identificarlos a través de una biopsia endometrial. En un inicio esta patente fue creada para pacientes con falla en la implantación, demostrando que la ventana de implantación, o periodo de receptividad endometrial puede estar desplazada.

La propuesta de esta herramienta es identificar el periodo receptivo endometrial de las pacientes sometidas a TRA, con el fin de realizar una transferencia embrionaria sincronizada y con ello favorecer un adecuado proceso de implantación. La interrogante es saber si la disposición de esta herramienta nos permitirá mejorar la tasa de implantación y con ello optimizar los resultados reproductivos en las pacientes con transferencia de embriones vitrificados.

2.0 MARCO TEÓRICO

La implantación embrionaria representa el paso más crítico en el proceso reproductivo. En condiciones normales una implantación exitosa requiere no sólo de un embrión morfológica y genéticamente normal en estadio de blastocisto, si no también de un endometrio receptivo y una adecuada interacción entre los tejidos maternos y embrionarios⁷.

El endometrio humano es un tejido complejo y dinámico que presenta cambios cíclicos de manera fisiológica en respuesta al estradiol y a la progesterona⁸, siendo éstos los reguladores principales de los cambios estructurales, funcionales y morfológicos, que le permiten adquirir su fenotipo receptivo^{8,9}.

Este estado “receptivo” del endometrio se exhibe en un sólo pequeño periodo de tiempo, también conocido como *ventana de implantación*¹⁰, y ocurre entre el 5to y 10mo día después del pico de LH, con una duración de aproximadamente 4 días¹¹. Durante este periodo de tiempo el endometrio está entonces preparado para llevar a cabo el proceso de implantación; aposición, adhesión e invasión del blastocisto¹².

Durante este proceso ocurren múltiples cambios en el área luminal y en el epitelio glandular, acompañados de un aumento en la vascularidad endometrial gracias a la expresión tanto de nutrientes, enzimas, citoquinas proteínas transportadoras, mucinas, integrinas, proteasas, factores de crecimiento¹¹ (Figura 1) y el contacto del blastocisto con los pinópodos, que se encuentran en la superficie apical del epitelio endometrial⁷ ricos en quimiocinas y moléculas implicadas en la adhesión celular (CAM)¹³.

**PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL “ERA”
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA**

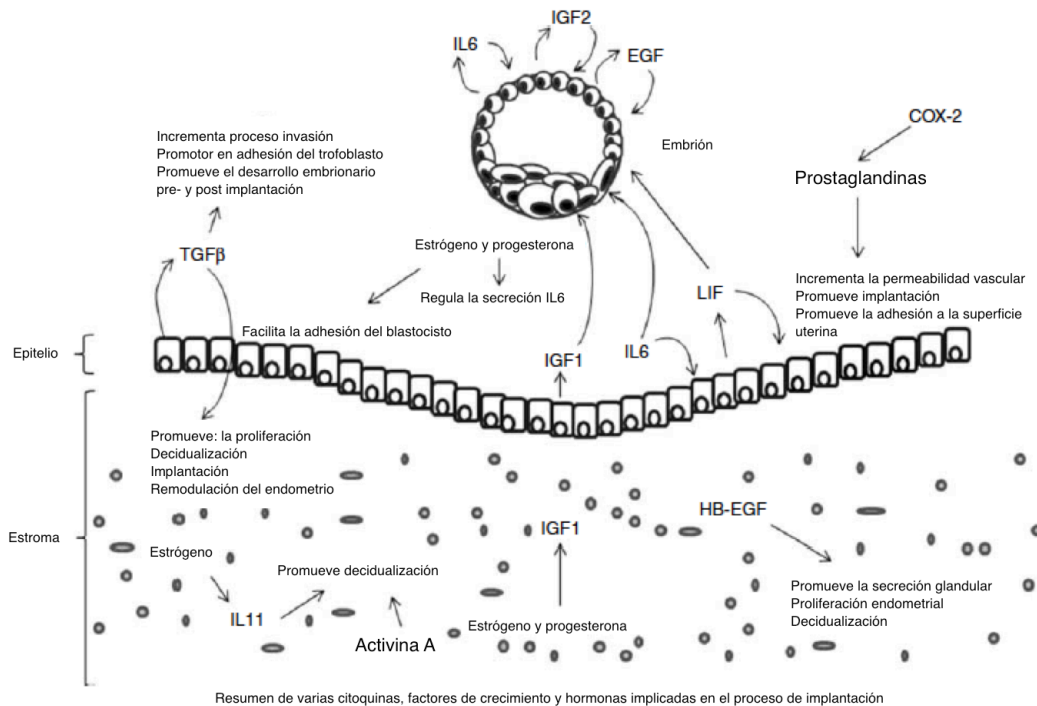


Figura 1. Resumen de varias citoquinas, factores de crecimiento y hormonas implicadas en el proceso de implantación. Modificado y traducido de Singh M. 2011.

Métodos de evaluación endometrial

El objetivo principal de la medicina reproductiva actual es lograr sincronizar el estado receptivo del endometrio con la llegada del blastocisto a la cavidad uterina para favorecer la implantación¹⁴.

La evaluación histológica a través de una biopsia de endometrio fue, por muchos años, la evaluación endometrial estándar¹⁵, sin embargo se sabe que este método no es totalmente confiable, ya que se ha reportado que hasta un 20% de las muestras analizadas por patólogos experimentados, utilizando los criterios de Noyes, son clasificadas con al menos dos días de diferencia en la fase lútea temprana, media y tardía¹⁶.

Los métodos no invasivos de evaluación endometrial como la medición del grosor endometrial, el patrón endometrial (trilaminar, homogéneo) y el flujo sanguíneo subendometrial a través de la ultrasonografía de alta definición, permiten tener una valoración subjetiva del endometrio. Sin embargo los estudios reportados, que han evaluado estos métodos no invasivos, en relación al éxito de las TRA, arrojan resultados heterogéneos¹⁵, sin clasificar aún alguno de ellos como marcador del estado receptivo del endometrio.

Se han identificado centenares de moléculas que se encuentran presentes en la regulación de su fase receptiva del endometrio, como: las integrinas, mucinas (MUC 1), calcitonina, factor inhibitorio de leucemia (LIF), ciclo-oxigenasa 2 y homebox A10 (HOXA 10), entre otros. Sin embargo, ninguno de éstos se ha podido utilizar en la práctica clínica como biomarcador para determinar el día exacto en el que se encuentra el desarrollo endometrial².

El continuo desarrollo de la biología molecular, ha permitido conocer que todas las células de un mismo organismo poseen la misma información genética, sin embargo, en función del tejido, tipo celular o del proceso biológico que lleven a cabo, utilizan selectivamente cierto material hereditario, de modo que hay una expresión génica diferencial si comparamos una población celular con respecto a otra.

Este conocimiento dió origen a las ciencias “ómicas”, de ahí se origina la genómica funcional o transcriptómica que estudia la expresión de los genes a nivel de ARN mensajero (ARNm), aquellos genes que realmente se expresan en el tejido o tipo celular investigado².

Tecnología de Microarreglos (Arrays)

La tecnología de microarreglos ha permitido el estudio molecular de muchas enfermedades, identificando el perfil de expresión genética en distintos tejidos. El endometrio no es la excepción, y la tecnología con microarreglos se ha utilizado para analizar el perfil de expresión génica del tejido endometrial a lo largo del ciclo menstrual con especial atención al periodo de receptividad endometrial (ventana de implantación).

Los microarreglos son matrices sólidas en las que están impresas miles de sondas que detectan genes con una secuencia conocida. Cada sonda contiene una secuencia específica de un solo gen, integrando cada punto del microarreglo. El número de puntos necesarios depende del número de genes y del número de sondas por gen que queremos analizar.

Se realiza la extracción del ARN del tejido, incluido el ARNm el cual es transcrito a ADNc (copia o complementario) al mismo tiempo que es marcado con nucleótidos que portan fluorescencia. Se hibrida (unión de dos hebras complementarias de ADN) sobre el microarreglo, y posteriormente es lavado para eliminar los ADNc no unidos de forma específica (solo las que hibridan permanecerán unidas a su sonda específica).

El marcaje de los nucleótidos se puede realizar con dos colores (verde y rojo en cada población). Se hace la hibridación simultánea y éstos nucleótidos marcados compiten por los sitios de unión, de modo que la intensidad de la fluorescencia de cada punto dependerá de la cantidad de expresión relativa de ese gen en una muestra con respecto a otra.

La interpretación de los resultados se realiza mediante un sistema de análisis (escáner óptico) con una lista comparativa de genes. Es importante

tener en cuenta la variación biológica entre las muestras y las complicaciones inherentes a la técnica (degradación de ARN, calidad de marcaje, eficiencia de hibridación, etc)².

Estudios de evaluación endometrial con microarreglos

Riesewijk y cols. En el 2003 compararon los perfiles de expresión génica del endometrio pre-receptivo (dos días antes del pico de LH también llamado LH+2) frente al receptivo (siete días después del pico de LH o día LH+7) de la misma mujer fértil en el mismo ciclo menstrual. Se identificaron 211 genes regulados, de éstos, la expresión de 153 genes se encontraban aumentados en LH+7 con respecto a LH+2, mientras que la expresión de 58 genes se encontraba disminuida¹⁷. Se deduce entonces que la evolución de un endometrio proliferativo a un endometrio receptivo, es un proceso que implica el aumento en la expresión de determinados genes.

Continuando las investigaciones, el grupo de Peter Rogers en Australia (Ponnampalam y cols en el 2004) propone la caracterización genómica del endometrio humano a lo largo de todo el ciclo menstrual. Este grupo concluye que es posible clasificar con exactitud el endometrio humano mediante su perfil molecular sin tener en cuenta su apariencia morfológica¹⁸.

La importancia de este estudio radica en que establecieron la existencia de un conjunto de genes característicos de las diferentes fases del ciclo (Figura 2) y destacaron el potencial del perfil de expresión génica para desarrollar herramientas moleculares en la evaluación del estado endometrial.

**PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL “ERA”
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA**



Figura 2.- Eventos que ocurren en el ciclo menstrual deducido por el estudio del endometrio a través de micro-arreglos. Modificado y traducido de Giudice L.C, 2006.

La evaluación de la expresión génica del endometrio ha permitido también conocer el impacto que tiene la estimulación ovárica (EOC) sobre el desarrollo endometrial, ya que como sabemos la estimulación ovárica da lugar a una dinámica hormonal anormal, lo que conlleva a un efecto negativo sobre el endometrio^{2,11}.

Haouzi D. y cols. en el 2009 compararon la expresión génica del periodo de receptividad endometrial en ciclos naturales versus ciclos estimulados, en la misma paciente. En ciclo natural la muestra se obtuvo en estado pre-receptivo (LH +2) y estado receptivo (LH+7), en el caso de ciclo estimulado la muestra se tomó el día de la captura ovular (dos días después de la aplicación de hCG ó

hCG+2) y el día de la transferencia embrionaria (cinco días después de la aplicación de hCG ó hCG+ 5)¹⁹.

En los ciclos naturales se identificó que la mayoría de los genes implicados en la receptividad endometrial se encuentran expresados, sin embargo, en los ciclos estimulados hay una similitud sólo del 46% de los genes expresados con respecto a los del ciclo natural. Lo que sugiere que el efecto de la FSH exógena en los protocolos de estimulación ovárica permite la transcripción endometrial de otros genes, pero que no están implicados en la receptividad endometrial¹⁹.

Concluye entonces que los ciclos de estimulación ovárica controlada alteran la receptividad endometrial interfiriendo con la expresión de sus genes¹⁵, incluso se ha descrito que los niveles de expresión génica se asemejan más a los de un endometrio no receptivo.

Se han realizado también estudios de expresión génica endometrial en pacientes sometidas a EOC comparando el uso de agonista y antagonista. Se ha observado un desarrollo endometrial retardado en las pacientes con uso de agonista en comparación con las pacientes que utilizan antagonista en hCG +7². Los patrones de expresión génica fueron más semejantes a los del ciclo natural cuando se utilizaron antagonistas, sin embargo su impacto clínico aún no ha sido aclarado²⁰.

Rearreglo de receptividad endometrial (Endometrial Receptivity Array “ERA”)

El uso de la tecnología de microarreglos y el antecedente de la identificación de grupos de genes que se expresan en las diferentes etapas de desarrollo endometrial, permitió a Díaz y cols. en el 2011, en el Instituto

Valenciano de Infertilidad, publicar los resultados de su investigación, donde dan a conocer la firma transcriptómica exclusiva del endometrio receptivo para utilizarse como prueba diagnóstica, con la capacidad de predecir la expresión genética del endometrio humano compatible con los días de LH+7 (siete días después del pico de LH)³.

Para el diseño de esta prueba se tomaron biopsias endometriales de pacientes fértiles, durante diferentes etapas del ciclo menstrual. En el ciclo natural se tomó biopsia en la etapa receptiva (LH+7, días 20-21 del ciclo), pre-receptiva (LH+1 a LH+5) y proliferativa (días 8-12 del ciclo)³. También se tomaron biopsias a pacientes con ciclos estimulados (sustitución hormonal con estradiol), después de cinco días de administración de progesterona (P+5)⁸.

Usando criterios estrictos de un aumento de al menos 3 veces más la expresión de los genes estudiados, se identificaron 238 genes, que se expresan en la transición de la etapa pre-receptiva a la etapa receptiva y éstos fueron incorporados al ERA⁸. Para validar la firma transcriptómica se realizaron dos comparaciones, entre los grupos Receptivo versus Pre-Receptivo y Receptivo versus Proliferativa. De esta manera se identificaron 134 genes que se expresan de manera exclusiva y distinta en la etapa receptiva, en comparación con las otras dos etapas³.

La información obtenida se ingresó a un “predictor” informático para clasificar las muestras como “receptivas” y “no receptivas”. Una vez diseñado el predictor informático, se tomaron muestras nuevamente de diferentes fases del ciclo pre-receptivo, receptivo y fase proliferativa para validar la firma transcriptómica obteniendo una especificidad del 0.8857 y una sensibilidad de 0.99758⁸.

PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL "ERA"
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA

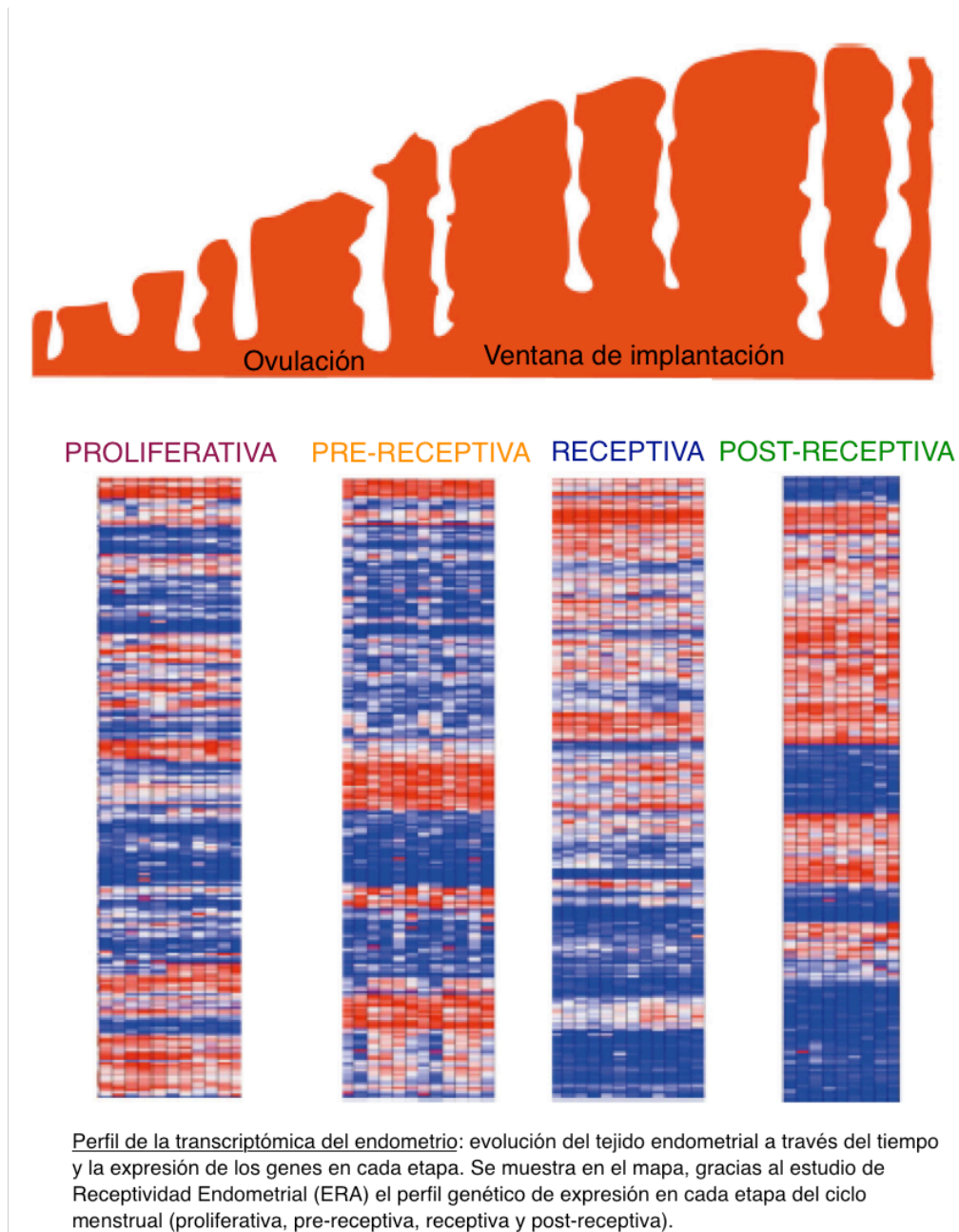


Figura 3.- Perfil de la transcriptómica del endometrio. Modificado y traducido de Díaz-Gimeno P., 2014.

Nuevamente Díaz y cols. en el 2013, realizaron un estudio para valorar la reproducibilidad del estudio de receptividad endometrial comparando el estudio ERA versus la evaluación con el criterio histológico. Se tomaron biopsias endometriales a pacientes donadoras en diferentes etapas del ciclo menstrual, y

se realizó el “ERA” y la evaluación histológica a cada muestra. Además, a un grupo de donadoras (estudio piloto), se les repitió también la biopsia 29 a 40 meses después, tomada en el mismo día del ciclo menstrual que la primera biopsia y se repitió nuevamente el ERA¹⁴.

Las biopsias fueron recolectadas en diferentes fases del ciclo menstrual clasificadas en 4 grupos: receptivo (LH+7), pre-receptivo (LH+1, LH+4), proliferativa (día 8-12 del ciclo) y post-receptivo (LH+11 a LH+13). El estudio ERA resultó ser superior al análisis histológico en la evaluación endometrial de los estados pre-receptivos, receptivo y post-receptivo. Las transiciones entre los diferentes estados pre-receptivos/ receptivos/ post-receptivos son más difíciles de identificar por los patólogos, a diferencia del diagnóstico entre las fases proliferativa y secretora.

Del estudio piloto, a las pacientes a quienes se les repitió la biopsia endometrial 29 a 40 meses después, reportaron que no hubo diferencia del resultado (variaciones interciclo), con la realización del estudio ERA¹⁴.

Aplicación clínica del “ERA”

Pacientes con falla en la implantación

La aplicación clínica del estudio ERA inició en las pacientes con falla en la implantación (FI). La FI se define como el fracaso en tres ciclos o más de fertilización in vitro (FIV) en los cuales se realizó la transferencia de 1 ó 2 embriones de buena calidad⁹. La causa exacta de la FI se desconoce, sin embargo se describe que puede deberse a patologías que alteren la receptividad endometrial en el 75% de los casos²¹ (anomalías en la cavidad endometrial, hidrosalpinx, trombofilias⁹, endometriosis^{22,23}, obesidad²⁴) y el resto por anomalías cromosómicas embrionarias⁹.

Ruiz y cols. en el 2013 realizaron un estudio clínico prospectivo multicéntrico y de intervención, para demostrar el valor clínico del ERA en pacientes con falla en la implantación. Participaron 85 pacientes con este diagnóstico (pacientes que al menos hayan tenido tres ciclos previos fallidos de FIV-donación, o tres ciclos fallidos de FIV en menores de 40 años), y 25 pacientes controles (pacientes sin TRA fallidos previos).

La biopsia endometrial fue tomada en el día LH+7 en ciclo natural ó P+5 (5to día de impregnación con progesterona) en ciclo con sustitución hormonal. En las pacientes control el resultado “receptivo” (R) fue del 88% y “no receptivo” (NR) del 12%; en las pacientes con FI el resultado receptivo “R” fue del 74.1% y No Receptivo “NR” del 25.9%.

En 29 pacientes con FI se les realizó transferencia embrionaria personalizada (pET por sus siglas en inglés), que es el día indicado como receptivo por el estudio ERA, resultando en un 51% de tasa de embarazo y 33% de tasa de implantación. En las pacientes control que se les realizó pET se obtuvo un 81% de tasa de embarazo y 55% de tasa de implantación.

En las pacientes en quienes se obtuvo un resultado “NR” con falla en la implantación se repitió el ERA (22 pacientes), en 15 de ellas se corroboró un desplazamiento de la ventana de implantación y en 8 de ellas se realizó la pET el día avalado por el ERA, resultando en un 50% de tasa de embarazo y un 38% de tasa de implantación. Concluyendo entonces que hay un porcentaje elevado de pacientes con FI que tienen desplazada la ventana de implantación, en comparación con las pacientes control, lo que da oportunidad a que la transferencia de embriones personalizada con el uso del ERA sea una estrategia terapéutica²⁵.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La genómica moderna y la bioinformática están abriendo el camino de una medicina personalizada, pero estamos de acuerdo que en materia de fertilidad, específicamente en TRA de alta complejidad aún queda mucho por hacer.

En el campo de la estimulación ovárica la hormona antimulleriana (HAM) y la cuenta folicular antral (CFA) son los parámetros principales para definir la dosis de gonadotropinas. Sin embargo no contamos con una prueba de rutina para la valoración del endometrio. Por cierto, en la mayoría de las ocasiones se asume que la ventana de implantación está siempre disponible cuando el embrión se encuentra preparado para la transferencia⁹.

Los estudios descritos muestran como el personalizar el tiempo de transferencia del embrión puede marcar una diferencia en pacientes con falla en la implantación. Las consecuencias de este nuevo paradigma es conocer el origen de esta variación fisiológica de la receptividad endometrial atribuida tal vez a alguna patología endometrial no conocida⁹. El problema real es la ausencia de una herramienta diagnóstica rentable para la valoración endometrial y realizar una transferencia embrionaria personalizada en todas las pacientes que serán sometidas a TRA de alta complejidad.

El objetivo del presente estudio es valorar la utilidad de la herramienta diagnóstica “ERA” (Endometrial receptivity array) como un estudio de rutina para la evaluación del estado receptivo endometrial (ventana de implantación) en las pacientes que serán sometidas a la transferencia de embriones vitrificados y su impacto en los resultados reproductivos.

4.0 HIPÓTESIS

La determinación del día del estado receptivo del endometrio a través del estudio ERA ofrece mejores resultados reproductivos en las pacientes con ciclos de transferencia de embriones vitrificados, en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey.

5.0 OBJETIVOS

5.1 PRINCIPAL

- Valorar la utilidad de la herramienta diagnóstica ERA (Endometrial receptivity array) como un estudio de rutina para la evaluación del estado receptivo endometrial (ventana de implantación) en las pacientes que serán sometidas a la transferencia de embriones vitrificados.

5.2 SECUNDARIOS

- Determinar las variables clínicas de las pacientes.
- Determinar el estado endometrial en el momento de la realización de la biopsia.
- Determinar la tasa de embarazo bioquímico, clínico y aborto de acuerdo a la realización de la transferencia de embriones vitrificados según el resultado del estudio ERA.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio clínico, prospectivo, con intervención.

6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Todas las pacientes que participen en un protocolo de transferencia de embriones vitrificados que acepten utilizar el estudio ERA como herramienta diagnóstica para transferencia de embriones personalizada.

7.0 CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes que hayan participado en TRA (FIV/ICSI) en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey.
- Pacientes que cuenten con embriones vitrificados, ya sea de ovocitos propios o del programa de donación de óvulos.
- Pacientes que acepten la realización del estudio ERA en un ciclo previo a la transferencia de los embriones vitrificados.
- Protocolo de estimulación endometrial más adecuado decidido por su médico tratante.
- Desarrollo de línea endometrial mayor de 6.5 mm durante el procedimiento.
- Transferencia de embriones vitrificados en día 5-6 de desarrollo el día indicado como “receptivo” por el estudio ERA.
- Paciente que acepte y firme el consentimiento informado (Anexo 1).

7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con patología tubaria o uterina no corregida previo procedimiento.
- Paciente que no desea participar en la realización del estudio ERA.

7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Paciente en quien no es posible realizar la biopsia de endometrio.
- En caso de no supervivencia embrionaria posterior a la desvitrificación.

8.0 INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS

A toda paciente con existencia de embriones vitrificados y deseo de transferencia de los mismos se dió una explicación detallada del estudio ERA, método del procedimiento y posibles beneficios de la misma. En caso de aceptar el procedimiento, se comentó cada caso con su médico tratante a fin de seleccionar el protocolo de estimulación.

A continuación se describe el procedimiento para los protocolos disponibles²⁶:

Ciclo sustituido :

- Administración de estradiol, en caso de ser oral se inicia con 6mg de valerato de estradiol a partir del segundo día del ciclo menstrual y/o estradiol transdérmico (estradiol hemihidratado en parches con liberación de 50mg de estradiol cada 24 horas) aplicado cada tercer día a partir del segundo día de la menstruación.
- Seguimiento ecográfico en el día 10 del ciclo.
- Si se encuentra endometrio trilaminar > 6,5mm
 - Toma de niveles de progesterona en suero < 0,5 ng /ml, se comenzará el tratamiento con progesterona. (P+0)
 - Progesterona en perlas u óvulos vía vaginal 800mg al día (por protocolo multicéntrico)
- La biopsia se tomará en P+5 (5 días completos de impregnación de progesterona, 120 horas).
- Por ejemplo si la administración de progesterona comienza un miércoles por la mañana, se cita a la paciente para la biopsia al siguiente lunes por la mañana.

Ciclo natural:

- Se realiza control ecográfico del tamaño folicular a partir del día 11 del ciclo.
- Al encontrar un folículo dominante de 15mm se determina el pico de LH en orina con tiras reactivas o en suero sanguíneo cada 24 horas.
- El día del pico de LH se considerará como día LH+0 y se contará a partir de ese momento siete días (LH +7).
- Por ejemplo si el pico es un lunes se citará a la paciente el lunes siguiente para la toma de la biopsia.

Ciclo Natural con hCG:

- Se realiza seguimiento folicular como en el ciclo natural.
- Se administra hCG recombinante o urinaria una vez que el folículo dominante sea ≥ 17 mm.
- El día de la administración de hCG se considera como hCG+0 y la biopsia se toma siete días más tarde (hCG+7).
- Por ejemplo si el pico es un lunes se citará a la paciente el lunes siguiente para la toma de la biopsia.

La evaluación endometrial se realizó en base a tres tipos de patrones:

- Tipo A.- patrón endometrial de triple línea, consistente con la presencia de una línea central hiperecogénica rodeada de dos capas hipoecogénicas.
- Tipo B.- con una imagen isoecogénica intermedia con la misma reflectividad que el miometrio que lo rodea y una línea ecogénica central poco definida.
- Tipo C.- cuando se presenta un endometrio con una imagen homogénea e hiperecogénica²⁷.

Una vez elegido el protocolo para la paciente y seleccionado el día de la biopsia según la evolución clínica, se cita a la paciente en el Centro de Fertilidad IECH, por la mañana.

La toma de biopsia se lleva a cabo en el cuarto de exploración de la siguiente manera:

- En posición de litotomía, se coloca espejo vaginal.
- Se realiza limpieza de cérvix con gasa y solución fisiológica.
- Se introduce cánula de Pipelle y con apoyo de ultrasonido abdominal se corrobora la presencia de la punta de la cánula en el fondo uterino.
- Se realiza aspiración de material endometrial.
- Se coloca la muestra obtenida en el criotubo (IGENOMIX™) que contiene 1.5ml solución transparente estabilizante de ARN.
- La paciente continua el medicamento hormonal (en caso de ciclo sustituido) por 5 días más.

Una vez obtenida la muestra²⁶:

- Se cierra el recipiente y se etiqueta con las iniciales de cada paciente.
- El criotubo se agita vigorosamente por unos minutos.
- Se coloca el criotubo en el refrigerador por 4 horas.
- Cumplido el tiempo de refrigeración, la muestra se coloca en un sobre acolchado con los datos clínicos de la paciente, información de la toma de la biopsia y copia de consentimiento informado firmado.
- Se envía a temperatura ambiente a las oficinas de IGENOMIX™ Estados Unidos, Miami, Florida (Anexo 2).

Los resultados del estudio ERA son recibidos a través de correo electrónico de manera confidencial, con clave de acceso y debidamente etiquetados con el nombre de la paciente, médico tratante y recomendaciones pertinentes.

Dos tipos de resultados son posibles:

- Receptivo: El perfil de expresión génica es compatible con el de un endometrio receptivo normal.
- No receptivo: El perfil de expresión génica puede ser compatible con un endometrio fuera de fase receptiva. En estos casos se contacta al departamento de “ERA” por correo electrónico²⁶.

En función de los resultados:

- Receptivo: En este caso se procede con la transferencia de o los embriones vitrificados en el mismo tipo de ciclo (sustituido o natural) y el día del ciclo en el cual se obtuvo la muestra con el resultado “receptivo” con el estudio ERA.
- No receptivo: En este caso se cancela la transferencia de embriones. Al mostrar un perfil fuera de fase receptiva es posible que la ventana de implantación se encuentre desplazada. Se propone a la paciente una segunda toma de biopsia modificando el día de la toma, para determinar el día óptimo de la transferencia, según el resultado enviado por la empresa (pre-receptivo: se difiere dos días más la toma de biopsia referente al ciclo previo; post-receptivo: se adelanta dos días la toma de biopsia referente al ciclo anterior)²⁶.

9.0 RESULTADOS

Desde el mes de Mayo del 2014 (introducción del estudio ERA al Centro de Fertilidad) hasta el momento, 12 pacientes han aceptado la realización de la prueba, sin embargo dos pacientes fueron eliminadas debido a que no fue posible la toma de la biopsia. La edad promedio de las pacientes fue de 37.5 años (32-44 años), 50% de ellas cursa con esterilidad primaria, prevaleciendo en un 40% el factor tubario como causa de esterilidad, 30% el factor endócrino ovárico, 20 % el factor masculino y un 20% de endometriosis (10% como único factor causal) (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas de las pacientes que realizaron el estudio ERA.

Paciente	Edad	Gesta	FSH	LH	E2	PRL	HAM	Diagnóstico	TRA previos	Resultado TRA previos	Embriones previos transferidos
1	35	0	4.3	5.6	38.5	28.1	N/D	OTB/SOP	2	Negativo	4
2	41	0	16.8	16.4	35	18	N/D	FEO	4	Bioquímico	8
3	40	3	5.25	2.4	36.5	9.92	N/D	OTB	1	Negativo	2
4	37	3	8.1	7.04	60.9	9.53	N/D	OTB	1	HMR	3
5	39	1	13.3	3.6	25.4	13.2	N/D	FEO	2	Negativo	6
6	32	1	5.7	0.1	20	11.2	N/D	Endom/OTB	4	HMR	8
7	44	2	14.6	7.26	23.8	21.4	0.16	FEO	4	Negativo	3
8	34	0	N/D	N/D	N/D	N/D	2.2	Masculino	1	Negativo	1
9	36	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Masculino	0	N/A	0
10	35	0	4.2	3.4	23	20.3	N/D	Endom	1	Bioquímico	3

Abreviaturas.- OTB: Obstrucción tubaria bilateral, SOP: Síndrome de ovario poliquístico, FEO: factor endócrino-ovárico, HMR: Huevo muerto retenido (Aborto diferido), Endom: endometriosis, N/D: No disponible, N/A: no aplica.

Todas las pacientes que han realizado el estudio ERA participaron con un protocolo de ciclo sustituido recibiendo valerato de estradiol 6mg al día a partir del segundo día del ciclo, y realizando la biopsia de endometrio 5 días después del inicio de la progesterona (P+5, al menos 120 horas de impregnación). El protocolo de la paciente 1 se realizó además con agonista en fase lútea tardía (Tabla 2).

*PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL “ERA”
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA*

Tabla 2. Tipo de protocolo y resultados del estudio ERA.

Paciente	Tipo protocolo	Grosor endometrial	Patrón endometrial	Progesterona sérica*	Día de la biopsia	Resultado “ERA”
1	Sustituido + agonista	10	A	No se obtuvo	P+5	Receptivo
2	Sustituido	8	A	0.4	P+5	Receptivo
3	Sustituido	9.7	A	0.25	P+5	Receptivo
4	Sustituido	10	A	0.3	P+5	Receptivo
5	Sustituido	10.3	C	0.3	P+5	Receptivo
6	Sustituido	9.2	A	0.25	P+5	Receptivo
7	Sustituido	7.7	B	0.8	P+5	Receptivo
8	Sustituido	8	A	0.4	P+5	Receptivo
9	Sustituido	6.5	A	0.8	P+5	Receptivo
10	Sustituido	9.1	A	0.4	P+5	Receptivo

* Progesterona sérica (ng/ml) previa administración de progesterona vaginal.

Hasta el momento sólo 6 pacientes han realizado la transferencia de embriones vitrificados personalizada, el día indicado como “receptivo” por el estudio ERA. A continuación se describen sólo estos casos:

Caso 1:

Paciente de 35 años, esterilidad primaria de 6 años de evolución, factor tubario (obstrucción tubaria bilateral) y anovulación (síndrome de ovario poliquístico). Perfil hormonal FSH 4.3, LH 5.6, E2 38.5, PRL 28.1, TSH 1.54. Edad de la pareja 41 años, sin alteración aparente (espermograma normal). Se realiza primer ciclo de estimulación ovárica controlada (EOC) y Fertilización In Vitro (FIV), obteniendo 5 embriones en estadio de blastocito los cuales se vitrifican (se difiere transferencia embrionaria por Síndrome de Hiperestimulación ovárica).

Se realiza ciclo de estimulación endometrial con seguimiento ultrasonográfico para transferencia de embriones vitrificados con valerato de estradiol 6mg/día observándose un endometrio tipo A de 6.5mm el día 7 del ciclo, se añade

progesterona vaginal 600mg al día el día 11 de ciclo, y se realiza transferencia de 2 embriones vitrificados con calidad 2BB y 2CC, 5 días después del inicio de la progesterona (P+5), con resultado de prueba de embarazo negativa.

Segundo ciclo de estimulación endometrial y transferencia de embriones vitrificados, con protocolo de agonista en fase lútea tardía (Acetato de leuprolide) más 4mg de valerato de estradiol por día, se observa endometrio tipo A de 10 mm el día 10 del ciclo, transferencia en P+5 de 2 blastocistos calidad 2 BB y 1BC, prueba de embarazo negativa.

Se propone estudio ERA previo al siguiente ciclo de transferencia embrionaria con protocolo de agonista de fase lútea tardía y Valerato de estradiol 6mg/día y progesterona 800mg vía vaginal. Observándose línea endometrial tipo A de 10mm en día 10 del ciclo. Se realiza biopsia en día P+5, con resultado “receptivo”.

Se realiza ciclo de estimulación endometrial para transferencia de embrión vitrificado con valerato de estradiol 6mg/día observando endometrio tipo A de 8.8mm el día 10 del ciclo, se añade progesterona vaginal 800mg/día y se realiza transferencia el día indicado como “receptivo” (P+5) de 1 embrión desvitrificado calidad 2CC, con resultado de prueba de embarazo negativa.

Caso 2:

Paciente de 41 años, esterilidad primaria de 8 años de evolución, factor endócrino-ovárico (antecedente de ooforectomía derecha). Perfil hormonal FSH 16.8, LH 16.4, E2 35, PRL 18, TSH 2.4. Edad de la pareja 38 años, sin alteración aparente (espermograma normal). Antecedente de tres ciclos previos de FIV con donación de óvulos (FIV-D), con prueba de embarazo negativa (sin más información) . Acude a nuestro centro. Se realiza ciclo de FIV-ovodonación; estimulación endometrial con seguimiento ultrasonográfico, administrando 6 mg de Valerato de estradiol/día, se observa endometrio tipo A de 8mm el día 10 del

ciclo y se administra progesterona vaginal 600mg/día el (día de la captura ovocitaria). Se realiza la transferencia en día P+5 de dos embriones en estadio de blastocisto calidad 2CB, 2AB, resultando en embarazo bioquímico con prueba de embarazo positiva (832 mU/ml de hCG cuantitativa), sin visualizar saco gestacional en el primer control ultrasonográfico.

Por el antecedente de 4 ciclos previos de FIV-ovodonación sin éxito, se propone la realización del estudio ERA. Se realiza en ciclo estimulado con valerato de estradiol 6mg/día observando endometrio tipo A de 8mm el día 10 del ciclo, se administra progesterona vaginal 800mg/día y se toma la biopsia de endometrio en un día P+5. El resultado muestra endometrio “receptivo”.

Se realiza nuevamente ciclo de FIV-ovodonación con óvulos vitrificados, protocolo de estimulación endometrial y control ultrasonográfico. Se administra valerato de estradiol 6mg/día observándose endometrio tipo A de 9 mm el día 10 del ciclo, se administra progesterona vaginal 800mg/día y se realiza la transferencia de 3 mórulas en día marcado como receptivo (P+5), con prueba de embarazo negativa.

Caso 3:

Paciente de 41 años, esterilidad secundaria (G3, P2, embarazo ectópico 1) de 10 años de evolución, factor tubario (obstrucción tubaria bilateral). Perfil hormonal FSH 5.25, LH 2.4, E2 36.5, PRL 9.92. Edad de la pareja 49 años sin alteraciones aparentes (espermograma normal). Se realiza primer ciclo de estimulación ovárica controlada y FIV/ICSI, uso de FSHr (recombinante) más menotropinas (HMG). Se observa un endometrio tipo A de 11mm el día de aspiración folicular (día 12). Se logra el desarrollo de 3 embriones en estadio de blastocisto. Se realiza transferencia de dos embriones al quinto día de la aspiración folicular P+5, calidad embrionaria 2BB y 2CB, y se vitrifica un embrión en sexto día de desarrollo. Con resultado de prueba de embarazo negativa.

Se propone estudio ERA previo al siguiente ciclo de transferencia embrionaria. Se realiza estimulación endometrial con Valerato de estradiol 6mg/día, observando endometrio tipo A de 9.7mm en el día 10 del ciclo y se administra progesterona 800mg vía vaginal. Se realiza biopsia en día P+5, con resultado “receptivo”. Se procede entonces con protocolo de estimulación endometrial para la transferencia de embrión vitrificado, con valerato de estradiol 6mg/día observando endometrio trilaminar de 8.4mm en el día 10 del ciclo, se administra progesterona vaginal 800mg/día, y se realiza la transferencia personalizada en el día marcado como receptivo por el ERA (P+5). Calidad embrionaria de embrión desvitrificado 1BB. Prueba de embarazo negativa.

Se realiza segundo ciclo de estimulación ovárica controlada más FIV/ICSI, protocolo de estimulación con FSH y LH recombinantes, se observa endometrio tipo A de 10mm el día 10 del ciclo. Se obtiene el desarrollo de 3 embriones en estadio de blastocisto. Se realiza transferencia de 2 embriones al quinto día después de realizada la aspiración de óvulos. La calidad de los embriones transferidos fue 1AA y 2CB, y vitrificó un embrión el mismo día de desarrollo. La prueba de embarazo resultó positiva, corroborando saco gestacional y FCF en el primer control ultrasonográfico. Actualmente embarazo en curso.

Caso 4:

Paciente de 37 años, esterilidad secundaria (G1, embarazo ectópico 1) de 10 años, por factor tubario (obstrucción tubaria bilateral). Perfil hormonal FSH 8.1, LH 7.04, E2 60.9, PRL 9.53. Edad de la pareja 37 años, sin alteraciones aparentes (espermograma normal).

Se realiza primer ciclo de estimulación ovárica controlada con FSHr y menotropinas, observando endometrio tipo A de 11mm el día 10 del ciclo. Se realiza FIV/ICSI obteniendo 8 embriones en día 3 de desarrollo. Se realiza la transferencia de 3 embriones en día 3, calidad 7c2, 7c2 y 6c2.

Se continua el desarrollo de los embriones restantes, se vitrifica un embrión en estadio de blastocisto. La prueba de embarazo resultó positiva que continua como huevo muerto retenido.

Se propone la realización del estudio ERA previo al siguiente ciclo de transferencia embrionaria. Se realiza estimulación endometrial con Valerato de estradiol 6mg/día, observando endometrio tipo A de 10 mm en el día 10 del ciclo y se administra progesterona 800mg vía vaginal. Se realiza biopsia en día P+5, con resultado “receptivo”.

Se realiza la transferencia embrionaria personalizada el día indicado como receptivo por la prueba “ERA” (P+5). Estimulación endometrial con valerato de estradiol 6mg/ día observando endometrio tipo A de 9.9mm de grosor, se complementa con progesterona vaginal 800mg/día. Se desvitrifica y transfiere 1 embrión calidad 1BC en día P+5, con resultado de prueba de embarazo negativa.

Caso 5:

Paciente de 39 años, esterilidad secundaria (G1, C1) de 4 años de evolución, factor endócrino-ovárico y donación de esperma (paciente soltera). Perfil Hormonal FSH 13.3, LH 3.6, E2 25.4, PRL 13.2. Antecedente de estimulación ovárica controlada en dos ocasiones, ambas canceladas por baja respuesta por lo que se decide ingresar al programa de donación de óvulos.

Se realiza primer ciclo de FIV- ovodonación y donación de esperma, obteniendo tres embriones; los cuales se vitrifican el 1er día de desarrollo. Se realiza la transferencia embrionaria en un ciclo posterior con estimulación endometrial con Valerato de estradiol 6mg/día, observando endometrio tipo A de 8.7mm el día 9 del ciclo. Se agrega progesterona vaginal 600mg/día, se realiza la desvitrificación y se realiza cultivo embrionario hasta un día 3 de desarrollo. Se

transfieren 3 embriones en día P+3, calidad 4c1, 4c3, 3c3, prueba de embarazo negativa.

Se realiza segundo ciclo de FIV-Donación (ovocitaria-espermática), con el mismo protocolo de estimulación endometrial, observando endometrio tipo A de 8mm un día 10 del ciclo. Se realiza la transferencia de 3 embriones en día 3 de desarrollo, en día P+3, calidad 8c3, 5c2, y 7c2, con prueba de embarazo negativa.

Se propone la realización del estudio ERA, con un protocolo de estimulación endometrial con valerato de estradiol 6mg/día, observando endometrio tipo C de 10.3mm el día 10 del ciclo, se corrobora progesterona sérica menor de 0.5 y se agrega progesterona vaginal 800mg/día. Se realiza biopsia de endometrio en un día P+5, con un resultado "receptivo".

Se realiza tercer ciclo FIV-D obteniendo 3 embriones en estadio de blastocisto. Se realiza estimulación endometrial con valerato de estradiol 4mg/día y parches de estradiol (50mg) cada tercer día, observando endometrio tipo A de 8mm el día 10 del ciclo, sin embargo presenta sangrado el día 15 del ciclo, por lo que se cancela procedimiento y se vitrifican 2 embriones en día 5 (D+5) y 1 en día 6 (D+6).

Se realiza nuevamente ciclo de estimulación endometrial con valerato de estradiol 6mg/día y parches de estradiol (50mg) aplicados cada tercer día, observando endometrio tipo A de 8.8mm el día 10 del ciclo, se complementa con progesterona vaginal 600mg/día, y se realiza la desvitrificación y transferencia en día P+5, de dos embriones en estadio de blastocisto, calidad 1CC y 1CB, con resultado de la prueba de embarazo negativa. Queda pendiente embrión vitrificado en estadio blastocisto.

Caso 6:

Paciente de 32 años de edad, esterilidad secundaria (G1, A1) de 7 años de evolución, factor tuboperitoneal (endometriosis severa, oclusión tubaria bilateral). Pareja de 38 años sin alteraciones aparentes (espermograma normal). Acude con nosotros ya con el antecedente en otro centro, de dos ciclos previos de estimulación ovárica controlada y transferencia de embriones y un ciclo con transferencia de embriones vitrificados, el primero de ellos con prueba de embarazo positiva, sin continuar el embarazo.

Se propone ciclo de estimulación ovárica controlada con FSH y LH recombinantes y antagonista, se logran obtener 3 embriones en estado de blastocisto. Se realiza la transferencia de dos embriones, 5 días después de realizada la aspiración de óvulos. Calidad embrionaria 1 BB y 1AA, y se logra la vitrificación de un embrión (D+5). Se reporta prueba de embarazo negativa.

Se propone la realización del estudio ERA previo a la transferencia del embrión vitrificado. Se realiza un ciclo estimulado con valerato de estradiol 6mg/día observando endometrio tipo A de 9.2mm el día 10 del ciclo, se administra progesterona vaginal 800mg/día y se toma la biopsia de endometrio en un día P+5. El resultado muestra endometrio “receptivo”.

Se realiza la transferencia embrionaria personalizada el día indicado como receptivo por el ERA (P+5) con el mismo esquema utilizado, se observa endometrio tipo A de 9.5mm el día 10 del ciclo. Se desvitrifica y transfiere 1 embrión calidad 2BB, con resultado de prueba de embarazo positiva (hGC cuantitativa 627 mU/ml). Se corrobora saco gestacional y latido cardiaco en el primer control ultrasonográfico. Actualmente embarazo en curso.

**PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL “ERA”
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA**

Tabla 3. Características de los ciclos de transferencia de embriones vitrificados posterior a la realización del estudio ERA.

Paciente	Tipo protocolo	Grosor endometrial	Calidad endometrial	Progesterona sérica	Embriones transferidos (calidad)	Prueba de embarazo	Evolución
1	Sustituido + agonista	8.8	Trilaminar	No se obtuvo	1 (2CC)	Negativa	
2	Sustituido	9	Trilaminar	0.1	3 (Mórulas)	Negativa	
3	Sustituido	8.4	Trilaminar	0.3	1 (1BB)	Negativa	
4	Sustituido	9.9	Trilaminar	0.3	1 (1BC)	Negativa	
5	Sustituido + Parches E2	8.8	Trilaminar	0.25	2 (1 CC, 1CB)	Negativa	
6	Sustituido	9.5	Trilaminar	0.25	1 (2BB)	Positiva	Embarazo en curso

10.0 DISCUSIÓN

El éxito de las TRA depende de muchos factores los cuales convergen en tres puntos principales, un embrión genéticamente competente, un endometrio en estado receptivo y la sincronía entre ambos. Contamos con varias formas de evaluar el estado embrionario desde una valoración morfológica y desarrollo embrionario (time-lapse) y la posibilidad de realizar una evaluación genética a través del diagnóstico genético preimplantacional. Sin embargo, hasta el momento no contamos con una herramienta objetiva de evaluación endometrial, específicamente de su estado receptivo.

A partir de la llegada de las “ómicas” y la descripción de la expresión genética a nivel de ARN mensajero (ARNm) de los tejidos, a permitido un gran avance en la medicina a nivel molecular². Más de 269 escritos se han publicado en relación a las “ómicas” y el estudio del endometrio, y de ellos, 164 son específicamente en relación a la transcriptómica, considerada actualmente como la tecnología disponible más estable para realizar un diagnóstico personalizado del factor endometrial en medicina reproductiva²⁸.

En el estudio realizado por Ruiz-Alonso en el 2013, donde pone a prueba el estudio “ERA” como herramienta diagnóstica para las pacientes con falla en implantación, describe que en 1 de 4 pacientes con este diagnóstico se encuentra desplazada la ventana de implantación, señalando entonces que la ventana de implantación no es constante en todas la pacientes²⁸.

Sin embargo, hasta el momento el estudio de Ruiz-Alonso es el único publicado en función de la aplicabilidad clínica de la prueba “ERA” realizado en pacientes con falla en la implantación. Por lo que queda la duda si éste estudio puede ser aplicado a todas las pacientes que vayan a participar en un ciclo de reproducción asistida.

En el presente reporte, 10 pacientes realizaron el estudio, todas ellas con protocolo de sustitución hormonal (estrógeno y progesterona) y el resultado de la prueba fue “receptivo” al quinto día de impregnación con progesterona, por lo que, hasta el momento, en las pacientes descritas, el endometrio receptivo se encuentra preparado para recibir al embrión en estado de blastocisto pasados 5 días de impregnación con progesterona, en un ciclo sustituido, sin encontrar entonces en ninguna de ellas, un desplazamiento de la ventana de implantación.

La paciente 1, con el antecedente de dos ciclos previos fallidos de transferencia de embriones vitrificados, de aparente buena calidad, se ofrece el estudio ERA con el objetivo de asegurar que el tercer procedimiento de transferencia embrionaria (único embrión restante) se llevara a cabo en el día correcto. Llama la atención que la toma de biopsia para el análisis se llevó a cabo con un protocolo con agonista, y a pesar de que la literatura menciona que el desarrollo endometrial se encuentra retrasado con el uso de agonistas², no fue el caso de esta paciente donde se corrobora como “receptivo” el quinto día de impregnación con progesterona.

En la paciente 3 y 4, el estudio ERA se ofrece también para guiar la transferencia de un único embrión vitrificado restante. Se corrobora también un día P+5 como receptivo y se lleva a cabo la transferencia personalizada sin resultados satisfactorios. En el caso de la paciente 3, se realiza segundo ciclo de EOC más FIV/ICSI, obteniendo 3 embriones en estadio de blastocisto, realizando transferencia en fresco en día P+5 de dos embriones de buena calidad, con resultado de prueba de embarazo positiva. Por lo que, posiblemente en los ciclos previos, a pesar de una adecuada evaluación morfológica del embrión, no es suficiente para conocer el potencial genético que tiene el embrión para continuar su desarrollo.

Las pacientes 2, 6 y 7 tienen el antecedente de tres o más ciclos de TRA previos fallidos, llevados a cabo en otro centro o en el nuestro. Por tanto, con el objetivo de evaluación diagnóstica del estado endometrial, se propone la realización del estudio ERA, resultando receptivo en día P+5. Las pacientes 2 y 6 realizaron la transferencia de embriones personalizada, con resultado satisfactorio (embarazo en curso) en una de ellas (6). Esto obliga entonces, a realizar una evaluación minuciosa de los embriones transferidos a la paciente 2, y por que no, ofrecer también una evaluación genética de los mismos.

En el caso de la paciente 5, con el antecedente de dos ciclos previos de FIV-D (óvulos y espermatozoides) en nuestro centro, con adecuado crecimiento y patrón endometrial en cada ciclo, pero sin lograr embarazo, se ofrece entonces el estudio ERA con el mismo objetivo, evaluación diagnóstica del endometrio. Es interesante que durante la realización del ciclo de preparación para la toma de la biopsia, se observa el crecimiento endometrial con patrón tipo C, al corroborar la progesterona sérica dentro de parámetros preovulatorios, se decide realizar la biopsia endometrial, obteniendo un resultado “receptivo” en un día P+5, lo que concuerda con estudios reportados, donde el patrón de crecimiento endometrial no es factor pronóstico de embarazo²², además el desarrollo de un patrón homogéneo del endometrio se desconoce, y no puede ser atribuido a niveles elevados de progesterona²². A pesar de la transferencia de embriones personalizada, el resultado no fue satisfactorio, por lo que, de igual manera podemos ofrecer un diagnóstico genético preimplantacional del embrión a transferir, y así abarcar el mayor número de variables posibles implicadas en el desarrollo de un embarazo.

La tecnología de microensayos también se ha utilizado para el estudio del endometrio en situaciones patológicas como la endometriosis. Los estudios, hasta el momento reportados, muestran que pacientes con endometriosis severa tienen alterada la expresión de varios genes implicados en desarrollo

endometrial, entre ellos se mencionan los regulados por efecto de la progesterona, receptores de factores de crecimiento y los relacionados con la matriz extracelular con efecto en apoptosis y proliferación celular. Estas diferencias en la firma transcriptómica y en las vías de señalización pueden tener como consecuencia un desarrollo endometrial anormal y por tanto una disminución en la tasas de implantación en estas pacientes²².

Hasta el momento no hay estudios que evalúen si la firma transcriptómica diseñada por el ERA se encuentra alterada en pacientes con endometriosis severa. Mientras tanto, en este estudio, dos de nuestras pacientes (6 y 10) que realizaron la prueba tienen el antecedente de este diagnóstico y el estudio ERA fue “receptiva” para ambas en un día P+5.

Se está llevando actualmente un estudio internacional, multicéntrico, a cerca de la efectividad del ERA como herramienta diagnóstica de rutina en la paciente con transferencia de embriones vitrificados. Por tal motivo continuaremos ofreciendo esta prueba a nuestras pacientes y con ello contribuir con la recolección de datos y resultados de nuestro centro, haciendo uso, por el momento, de la única evaluación objetiva del estado endometrial.

11.0 CONCLUSIONES

Gracias a los avances en la tecnología molecular ya es posible conocer el perfil de expresión genética de los tejidos y su aplicación en el campo de la medicina reproductiva no es la excepción. El estudio exhaustivo del periodo de receptividad endometrial, y la aplicación de ésta técnica, ha permitido conocer que cada fase del ciclo menstrual humano tiene un perfil de expresión génica diferente.

No existe una molécula clave con la capacidad de regular la receptividad endometrial por sí misma, si no todo lo contrario, la receptividad endometrial es un proceso equilibrado, complejo y activo, que implica miles de genes inducidos y reprimidos.

El desarrollo de la herramienta diagnóstica de receptividad endometrial ERA, se desarrolló en un inicio para pacientes con falla en la implantación, observando que éstas pacientes pueden tener desplazada la etapa receptiva del endometrio, lo que resulta en una variación en el tiempo en el que se presenta la ventana de implantación.

Como sabemos, se requiere de un endometrio receptivo y un embrión genéticamente competente para tener éxito en el proceso de implantación , por tanto, la llegada del ERA nos permitirá tener una valoración más objetiva del estado endometrial, y en caso de no lograrse el embarazo, valorar si es necesario entonces realizar un análisis más profundo (genético) del embrión.

En el presente estudio, las indicaciones por los médicos tratantes para el estudio ERA fueron el antecedente de falla en la implantación, y el deseo de confirmar el mejor día para la transferencia embrionaria.

*PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL “ERA”
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA*

Desde la creación de la patente del estudio ERA en el 2011, éste es el primer reporte realizado en la población mexicana. Se continuará con la recolección de datos para aumentar el número de pacientes y poder entonces realizar un estudio comparativo, y junto con el protocolo de investigación clínica que se lleva actualmente a nivel multicéntrico e internacional, determinar el verdadero impacto sobre los resultados reproductivos en las pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Tarasco M. M., Hamill M., Técnicas De Reproducción Humana Asistida, Centro de Análisis y Propuesta Estratégica de Familia, México, 2011.
- 2.- Simón C., Horcajadas J., García-Velasco J., Pellicer A., El endometrio humano, desde la investigación a la clínica, Tomo 2, editorial panamericana, pág. 100-124, 2009.
- 3.- Díaz G. P., Horcajadas J., Martínez C. J., et al., A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature, Fertility and Sterility, Jan 2011; 95 (1).
4. - Coutifaris C., Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status, Fertility And Sterility, Nov 2004; 82 (5).
5. - Lessey B.A., M.D., Ph.D., Assessment of endometrial receptivity, Fertility and Sterility, Sep 2011; 96 (3).
- 6.- Giudice L.C., Application of functional genomics to primate endometrium: insights into biological processes, Reproductive Biology and Endocrinology, 2006; 4(Suppl 1):S4.
- 7.- Sharma A., Kumar P., Understanding implantation window, a crucial phenomenon, J Hum Reprod Sci. Jan-Apr 2012; 5(1): 2–6.
- 8.- Garrido G.T., Ruiz A. M., Blesa D., et al, Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. Fertility and Sterility, Mar 2013; 99 (4).
9. - Ruiz-Alonso M., Galindo N., Pellicer A., Simon C., What a difference two days make: “personalized” embryo transfer (pET) paradigm: A case report and pilot study, Human Reproduction, 2014; 0 (0) pp. 1–4.

- 10.- Revel A. M.D. Defective Endometrial Receptivity, Fertility and Sterility, May 2012; 97 (5).
- 11.- Salamonsen L.A., Edgell T., Rombauts L., et al., Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery, Fertility and Sterility, Mar 2013; 99 (4).
- 12.- Singh M., Chaudhry P., Asselin E., Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors, Journal of Endocrinology, 2011; 210, 5–14.
- 13.- Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management, Seventh edition, Elsevier, 2014.
- 14.- Díaz G.P., Ruiz A. M., The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. Fertility and Sterility, Feb 2013; 99 (2).
15. - Momeni et al, Importance of endometrial thickness in vitro fertilization/ICSI, Journal of Human Reproductive Sciences, Sep-Dic 2011; 4 (3).
16. - Murray M.J., Meyer W.R., Zaino R.J., et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women, Fertility and Sterility, May 2004; 81 (5).
- 17.- Riesewijk A., Martín J., Van Os R., et al., Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology, Molecular Human Reproduction, 2003; 9 (5) 253-264.
- 18.- Ponnampalam A., Weston G., Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling, Molecular Human Reproduction, 2004; 10 (12) 879–893.

- 19.- Haouzi D., Assou S., Mahmoud K., et al. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients, *Human Reproduction*, 2009; 24 (6) 1436–1445.
20. - Martínez-Conejero et al. Ovarian stimulation and the endometrium, *Reproductive BioMedicine Online*, 2007; 15 (1) 45-50.
- 21.- Munro S.K., Farquhar C.M., Mitchell M.D., Ponnampalam A.P., Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle, *Molecular Human Reproduction*, 2010; 16 (5) 297–310.
- 22.- Aghajanova L., Giudice L., Molecular Evidence for Differences in Endometrium in Severe Versus Mild Endometriosis, *Reproductive Sciences*, 2011; 18 (3) 229-251.
- 23.- Kao *et al.*, Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility, *Endocrinology*, July 2003; 144 (7) 2870–2881.
24. - Bellver J., et al., Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors, *Fertility and Sterility*, Oct 2013; 100 (4).
25. - Ruiz A. M., Blesa D., Díaz G. P., The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure, *Fertility and Sterility*, Sep 2013; 100 (3).
- 26.- Manual de operaciones ERA “Endometrial Receptivity Array”, IVIOMICS, Manual ERA v1.4, Junio 2013
27. – Zhao J., Zhang Q., Li Y., The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012.

28. - Díaz-Gimeno P., Ruiz-Alonso M., Blesa D., Simón C., Transcriptomics of the human endometrium, *Int. J. Dev. Biol.*, 2014; 58: 127-137.

29.- Shi-Ling C., et al. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study, *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010.

13.0 ANEXOS

Anexo 1.- Carta de consentimiento informado



Consentimiento informado para biopsia endometrial y diagnóstico de Receptividad Endometrial (ERA)

DATOS

Nombre de la paciente: _____
Nº de historia: _____
Nombre del/a ginecólogo/a: _____

METODOLOGIA: DESCRIPCIÓN Y PROPÓSITO DEL ANÁLISIS

El Array de Receptividad Endometrial (ERA) es una herramienta molecular que permite saber si el endometrio (la mucosa del interior de la matriz) presenta un perfil de receptividad alrededor del día 21 del ciclo menstrual, momento en el que el endometrio está preparado para que se produzca la implantación del embrión. Este método de diagnóstico molecular, está basado en medir el perfil de expresión génica de las células endometriales.

En consecuencia, el ERA permite determinar si el endometrio se encuentra en condiciones ideales para la implantación de los embriones, permitiendo que la transferencia embrionaria se realice en el momento en que así sea, incrementando con ello las posibilidades de éxito del tratamiento de fecundación in Vitro.

PROCEDIMIENTO

Para este análisis se necesita una biopsia del endometrio, que tendrá que ser tomada, aproximadamente, en el día 21 desde el comienzo de su ciclo menstrual, o cuando su ginecólogo lo indique.

La biopsia endometrial consiste en introducir una cánula muy fina por su vagina para llegar hasta el útero, de donde se absorbe un pequeño cilindro de tejido endometrial. No existe una técnica menos invasiva para obtener la cantidad suficiente de material endometrial, por ello, usted notará molestias derivadas del procedimiento, pudiendo sangrar un poco tras la biopsia, pero es un proceso habitual sin riesgo añadido. El procedimiento de biopsia tiene un riesgo (<5%) de no obtención de suficiente cantidad y/o calidad de muestra para emitir un diagnóstico. En este caso se requerirá la toma de una nueva biopsia. En aproximadamente el 5% de los casos se obtiene un diagnóstico de No Receptividad asociado a una probabilidad <0.5. En estos casos no se puede ofrecer una solución terapéutica con los conocimientos actuales.

Tras el diagnóstico, la muestra de biopsia se conservará en las instalaciones de IGENOMIX durante un periodo de dos años. En caso de que fuera necesario realizar nuevos análisis para mejorar el diagnóstico de receptividad endometrial se le solicitaría su consentimiento. Pasado este periodo de tiempo la muestra será destruida.

CONFIDENCIALIDAD

Su identidad y todos los datos referentes a su información personal serán confidenciales, salvo que se solicite lo contrario por la ley. Se permitirá el acceso, para la revisión de sus registros médicos, a las Autoridades Sanitarias. El personal que acceda a sus datos en el ejercicio de sus funciones quedará sujeto al deber de secreto de forma permanente.

Los datos personales recogidos en el presente documento serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley 15/1999, cuya titularidad corresponde a IGENOMIX, S. L., con la finalidad de gestionar el estudio de diagnóstico descrito, pudiendo ejercer la paciente en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación y cancelación, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, dirigiéndose por escrito a la siguiente dirección: IGENOMIX, S.L. C/ Catedrático Agustín Escardino nº 9 Parc Científic, Edificio 3, Laboratorio 2.04, 46980 Paterna, Valencia.

UNA VEZ LÉIDO Y COMPRENDIDO LO ANTERIOR, QUEDO INFORMADA DE:

La indicación, procedimiento, probabilidades de éxito, riesgos y complicaciones del tratamiento propuesto, así como del coste económico de dicha prueba.

La disposición del personal sanitario para ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente aclarado.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que nos ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha clarificado todas las dudas que le he planteado.

Manifiesto que estoy satisfecha con la información recibida y que presto libremente mi conformidad para que se me practique una biopsia de endometrio en el Centro/Clinica de reproducción asistida _____ así como que la muestra del tejido endometrial sea remitida a las instalaciones de IGENOMIX, S. L. con el fin de que se realice dicho diagnóstico. Asimismo acepto que los resultados del Diagnóstico de Receptividad Endometrial (ERA) sean comunicados a mi ginecólogo, con el fin de que éste pueda asesorarme de manera adecuada en mi tratamiento FIV en función de los resultados del mismo.

En _____, a _____ de _____ de _____

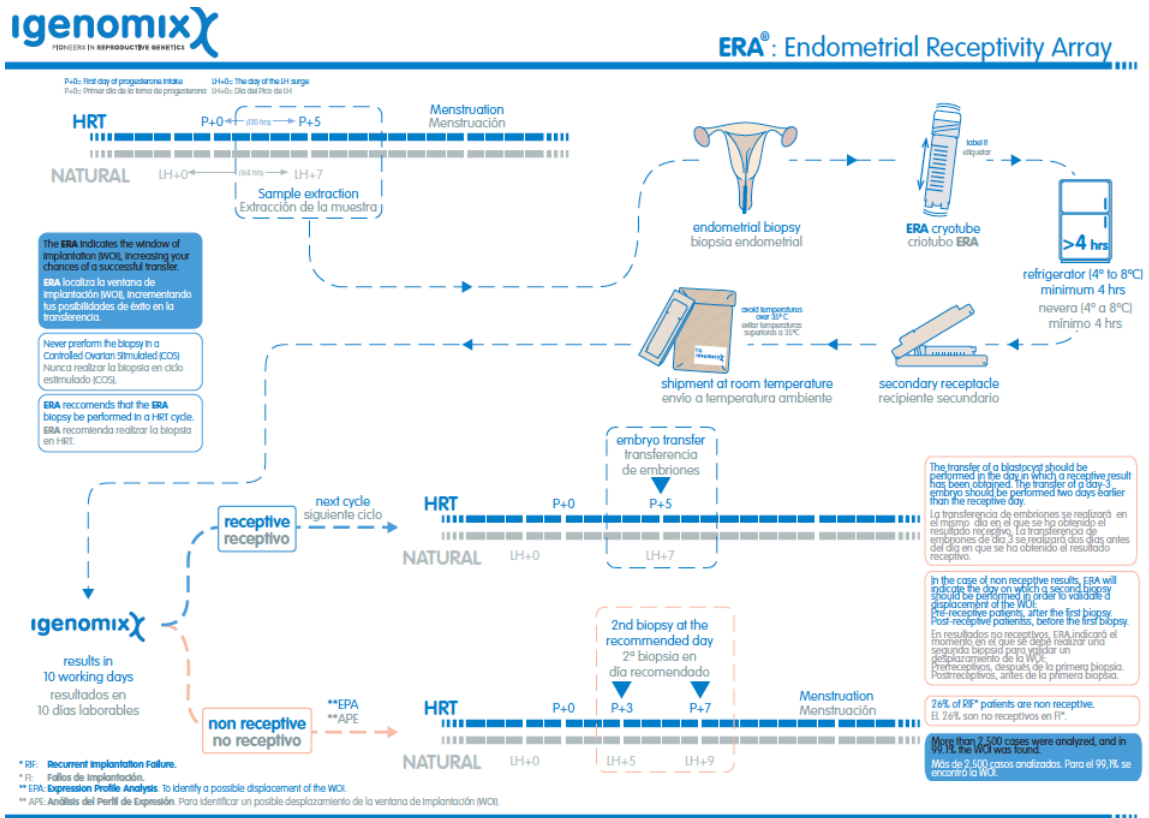
Firma de la paciente

Firma del ginecólogo/a

www.igenomix.com

**PRIMER ESTUDIO DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL UTILIZANDO EL "ERA"
(Endometrial Receptivity Array) EN CICLOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
VITRIFICADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA**

Anexo 2.- Algoritmo de toma y envío de la biopsia de endometrio



Action Protocol / Protocolo de Actuación

- 1** **HRT / NATURAL**
Select the cycle type (HRT or Natural) in which the ERA should be performed.
Establecer el tipo de ciclo (asistido o natural) en el que se va a realizar el ERA.
- 2**
Take a biopsy of the uterine fundus during the Window of Implantation.
• During Hormone Replacement Therapy after 5 days of progesterone impregnation.
• In the natural cycle at LH+7.
Tomar la biopsia del fondo uterino en la ventana de implantación:
• En ciclo sustituido tras 5 días completos de impregnación de progesterona.
- 3**
Place the biopsy in the ERA cryotube attached.
Introducir la biopsia en el criotubo ERA que se adjunta.
- 4**
Label the cryotube. Shake it vigorously for a few seconds.
Etiquetar el criotubo. Agitar vigorosamente durante unos segundos.
- 5**
Immediately store in the refrigerator for a minimum of 4 hours and until shipping (maximum 1 month).
Inmediatamente conservar en la nevera durante un mínimo de 4 horas y hasta el momento del envío (máximo 1 mes).
- 6**
Send the sample at room temperature in a padded envelope or similar with the secondary container inside. Attach the documentation. Do not send at temperatures above 35°C.
Realizar el envío a temperatura ambiente en un sobre acolchado o similar con el recipiente secundario. Adjuntar la documentación. No enviar a temperaturas superiores a 35°C.
- 7**
Send an e-mail to confirm shipping.
EU, LATAM, e-mail to: support@igénomix.com
USA e-mail to: support@igen.com
INDIA e-mail to: info.india@ivomics.com
Enviar un e-mail confirmando el envío.
EU, LATAM, enviar a: support@igénomix.com
USA enviar a: support@igen.com
INDIA enviar a: info.india@ivomics.com
- 8**
For clinical questions, send an e-mail:
EU, e-mail to: era@igénomix.com
USA e-mail to: era@igen.com
LATAM, e-mail to: era.latam@igénomix.com
INDIA e-mail to: era.india@ivomics.com
Para consultas clínicas, enviar un email:
EU, enviar a: era@igénomix.com
USA enviar a: era@igen.com
LATAM, enviar a: era.latam@igénomix.com
INDIA enviar a: era.india@ivomics.com