

ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS  
HORMONALS TIROÏDALS I LES DEIODINASES,  
EN CÈL·LULES DE L'APARELL REPRODUCTOR  
DE DONES FÈRTILS I ESTÈRILS SOTMESES A  
CICLES DE FECUNDACIÓ *IN VITRO*

**Eva LÓPEZ SERRANO**

Dipòsit legal: Gi. 994-2015  
<http://hdl.handle.net/10803/293045>



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

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-  
NoComercial-SenseObraDerivada

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-  
SinObraDerivada

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-  
NoDerivatives licence



Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS HORMONALS  
TIROÏDALS I LES DEIODINASES, EN CÈL·LULES DE  
L'APARELL REPRODUCTOR DE DONES FÈRTILS I ESTÈRILS  
SOTMESES A CICLES DE FECUNDACIÓ *IN VITRO***



Eva López Navarro

2015





Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS HORMONALS  
TIROÏDALS I LES DEIODINASES, EN CÈL·LULES DE  
L'APARELL REPRODUCTOR DE DONES FÈRTILS I ESTÈRILS  
SOTMESES A CICLES DE FECUNDACIÓ *IN VITRO***

Eva López Navarro

2015





Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS HORMONALS TIROÏDALS I LES  
DEIODINASES, EN CÈL·LULES DE L'APARELL REPRODUCTOR DE DONES  
FÈRTILS I ESTÈRILS SOTMESES A CICLES DE FECUNDACIÓ *IN VITRO***

Eva López Navarro

2015

CIÈNCIES EXPERIMENTALS I SOSTENIBILITAT

DIRIGIDA PER:

Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos

Dr. Wifredo Ricart Engel

TUTOR:

Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la

*Universitat de Girona*



# ÍNDEX

---





SIGLES, ABREVIATURES, ACRÒNIMS I ANGLICISMES.....	I
ÍNDIX DE FIGURES.....	II
ÍNDIX DE TAULES .....	III
CERTIFICATS DE DIRECCIÓ DE LA TESI .....	IV
AGRAÏMENTS.....	V
ÍNDIX GENERAL.....	VI
RESUM/RESUMEN/ABSTRACT.....	VII



## **I. SIGLES, ABREVIATURES, ACRÒNIMS I ANGLICISMES**



ARNm: ARN missatger

$\beta$ hcg: fracció beta de la hormona gonadotropina coriònica humana

CC: cèl.lules cervicals uterines

CG: cèl.lules de la granulosa ovàriques

CE: cèl.lules endometrials

COX2: ciclooxigenasa 2

D1,D2,D3: deiodinasa 1,2,3

DGP: diagnòstic genètic preimplantacional

DIO1,DIO2,DIO3: gen de la deiodinasa 1,2,3

DNA/ADN: àcid desoxiribonucleic

E2: 17- $\beta$ -estradiol

END: endometri

FIV/ICSI: fecundació *in vitro*/injecció intracitoplasmàtica

FSH rec/u: hormona fol.liculoestimulant d'origen recombinant/urinari

FSH: hormona fol.liculoestimulant

GDF-9: factor de diferenciació del creixement-9

Gl: glàndula

GnRH/LHRH: hormona alliberadora de gonadotropines

GREM1: gremlina 1

HAS2: àcid hialurònic sintasa 2

HIV/VIH: virus d'immunodeficiència humana

HUDGDJT: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

IMC: índex de massa corporal

IVF: *in vitro* fertilization, fecundació *in vitro*

LF: líquid fol·licular

LH rec/u: hormona luteinizant d'origen recombinant/urinari

LH: hormona luteinizant

MII: metafase II

PRL: prolactina

PTGS2: gen de l'enzim ciclooxigenasa 2 (COX2)

PTU: propitiouracil

RHA: reproducció humana assistida

RNA/ARN: àcid ribonucleic

RPR: sífilis

RT: temperatura ambient

Rt-PCR: reacció en cadena de la polimerasa a temps real

SEF: Sociedad Española de Fertilidad

SHO: síndrome d'hiperestimulació ovàrica

T3L: triiodotironina lliure

T4L: tiroxina

TR/THR/RHT: receptor hormonal tiroïdal

TSH: hormona estimulant de la glàndula tiroide

UI: unitats internacionals

VHB: virus de l'hepatitis B / VHC: virus de l'hepatitis C

vs: versus





## **II. ÍNDEX DE FIGURES**

---



<b>Figura 1.</b> Anatomia de l'ovari.....	53
<b>Figura 2.</b> Fases de la mitosi i la meiosi.....	54
<b>Figura 3.</b> Fases de la fol.liculogènesi.....	61
<b>Figura 4.</b> Histologia de l'endometri.....	64
<b>Figura 5.</b> Composició del fol.licle antral.....	68
<b>Figura 6.</b> Activitat i lloc d'acció de les deiodinases.....	87
<b>Figura 7.</b> Distribució de les dones avaluades en ambdues cohorts.....	128
<b>Figura 8.</b> Diagrama de la integritat del RNA .....	133
<b>Figura 9.</b> Amplificació dels transcrits de cDNA .....	137
<b>Figura 10.</b> Resultats del tractament d'estimulació ovàrica .....	152
<b>Figura 11.</b> Relació lineal entre $TR\alpha 1/TR\alpha 2$ i $ADR\beta 2$ en CE de la població fèrtil.....	161
<b>Figura 12.</b> Diferències d'expressió entre $GREM1$ i $PTGS2$ en CG.....	165
<b>Figura 13.</b> Relació lineal entre $TR\alpha 1/TR\alpha 2$ i $GREM1$ en CE.....	168



## **III. ÍNDEX DE TAULES**

---



<b>Taula 1.</b> Assajos comercials desenvolupats i testats per Applied Biosystems (AB) per realitzar anàlisis d'expressió gènica mitjançant la tecnologia TaqMan® (primers i sondes).....	138
<b>Taula 2.</b> Parelles d'encebadors per l'anàlisi via SybrGreen® (primers i Sybr® Green, un fluorocrom específic pel marcatge del ssDNA sintetitzat de novo) .....	138
<b>Taula 3.</b> Mitjana d'edat dels subjectes, IMC, percentatge de dones fumadores i concentracions hormonals plasmàtiques i fol·liculars de les dones incloses a l'estudi, distribuïdes en dos grups (fèrtil i estèril).....	149
<b>Taula 4.</b> Diferències entre concentracions de les hormones analitzades en plasma i líquid fol·licular, en les dones estèrils, fèrtils i en tots els subjectes .....	151
<b>Taula 5.</b> Resultats del tractament de fecundació in vitro en ambdues cohorts.....	153
<b>Taula 6.</b> Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl·lules de la granulosa perioovulatòries i cervicals uterines, en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A ( <i>PPIA</i> )) .....	154
<b>Taula 7.</b> Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl·lules de la granulosa en fase perioovulatòria en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A ( <i>PPIA</i> )) .....	156
<b>Taula 8.</b> Estudi d'associacions entre paràmetres d'expressió gènica de funció intracel·lular hormonal tiroïdal i <i>ADRβ2</i> , en cèl·lules de la granulosa, determinats en la població fèrtil i estèril, estudiades conjuntament .....	157
<b>Taula 9.</b> Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl·lules cervicals uterines, en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A ( <i>PPIA</i> )) .....	158



<b>Taula 10.</b> Estudi d'associacions entre paràmetres d'expressió gènica de funció intracel.lular hormonal tiroïdal i <i>ADRβ2</i> , en cèl.lules cervicals, determinats en la població fèrtil i estèril, estudiades conjuntament .....	159
<b>Taula 11.</b> Estudi d'associacions entre paràmetres d'expressió gènica intracel.lular hormonal tiroïdal i <i>ADRβ2</i> en cèl.lules endometrials, determinats en la població fèrtil.....	160
<b>Taula 12.</b> Estudi d'associacions entre expressió gènica en cèl.lules de la granulosa, cèl.lules cervicals (de les dues cohorts) i endometrials (del grup fèrtil), i concentracions hormonals circulants. ....	162
<b>Taula 13.</b> Diferències d'expressió dels gens <i>GREM1</i> , <i>HAS2</i> i <i>PTGS2</i> en cèl.lules de la granulosa periovulatòries i cervicals uterines en el grup fèrtil i estèril, expressats com a ràtio relativa al control endogen ciclofilina A ( <i>PPIA</i> ).....	165
<b>Taula 14.</b> Estudi d'associacions en cèl.lules de la granulosa ovàriques, cervicals uterines i endometrials, entre l'expressió de receptors tiroïdals, deiodinases i els gens <i>GREM1</i> , <i>HAS2</i> i <i>PTGS2</i> . ....	167
<b>Taula 15.</b> Estudi d'associacions entre l'expressió gènica de <i>GREM1</i> , <i>HAS2</i> i <i>PTGS2</i> en cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials, i les concentracions hormonals circulants realitzades en tota la població.....	169
<b>Taula 16.</b> Estudi d'expressió gènica en cèl.lules de la granulosa i cervicals, realitzat en la població fèrtil amb resultat de βHCG >50 mUI/mL (en la receptora), i en la població estèril amb βHCG <50 mUI/mL el dia 12 de la transferència embrionària. Expressats com a ràtio relativa al control endogen ciclofilina A ( <i>PPIA</i> ).....	171
<b>Taula 17.</b> Equipament del laboratori emprat. ....	243
<b>Taula 18.</b> Reactius i kits comercials utilitzats per la elaboració dels bancs de mostres, l'anàlisi i la caracterització molecular.....	244

## **IV. CERTIFICATS DE DIRECCIÓ DE LA TESI**





## Universitat de Girona

El Dr. **José Manuel Fernández-Real Lemos**, cap de secció del *Departament d'Endocrinologia, Diabetis i Nutrició* de l'*Hospital Dr. Josep Trueta* de Girona, i professor de la facultat de medicina de la *Universitat de Girona*.

DECLARA:

Que aquest treball, titulat "**Estudi de l'expressió dels receptors hormonals tiroïdals i les deiodinases, en cèl.lules de l'aparell reproductor de dones fèrtils i estèrils sotmeses a cicles de fecundació *in vitro***", que presenta **Eva López Navarro** per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requeriments per a poder optar a aquest títol.

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

**Dr. José Manuel Fernández-Real**

Girona, 1 de setembre del 2014





## Universitat de Girona

El Dr. **Wifredo Ricart Engel**, cap de servei del *Departament d'Endocrinologia, Diabetis i Nutrició* de l'*Hospital Dr. Josep Trueta* de Girona, i professor de la facultat de medicina de la *Universitat de Girona*.

DECLARA:

Que aquest treball, titulat "**Estudi de l'expressió dels receptors hormonals tiroïdals i les deiodinases, en cèl.lules de l'aparell reproductor de dones fèrtils i estèrils sotmeses a cicles de fecundació *in vitro***", que presenta **Eva López Navarro** per a l'obtenció del títol de doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requeriments per a poder optar a aquest títol.

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Dr. **Wifredo Ricart Engel**

Girona, 1 de setembre del 2014



## **V. AGRAÏMENTS**

---





Vull agrair al Dr. Wifredo Ricart i al Dr. Jose Manuel Fernández-Real la seva dedicació, perseverància, suport i gran ajuda en l'elaboració i supervisió d'aquesta tesi. Només puc sentir-me agraciada pels coneixements i recolzament rebuts per uns mestres i referents tan excepcionals com ells.

Vull mencionar especialment al Dr. Paco Ortega pel seu interès, disponibilitat, paciència i les hores conjuntament dedicades a l'estudi d'expressió i a l'anàlisi estadístic.

A l'Òscar Rovira per la seva tenacitat i insistència davant la dificultat de la realització de les analítiques en fase menstrual, i a l'Emili los Huertos per supervisar aquesta tasca des de la 'retaguàrdia'.

Al Gerard Pardo pels seus consells inicials, i juntament amb l'Ester Guerra i la Isabel Alonso per l'extracció del RNA. No vull oblidar-me de la resta de l'equip de l'IdlbGi per la seva càlida acollida durant la meva estada en el laboratori.

Vull expressar la meva gratitud a la Dra. Elena Álvarez per les seves ensenyances, el seu continu recolzament i totes les facilitats que m'ha posat al llarg d'aquest procés. És un exemple a nivell personal i professional, contínuament entregada a transmetre i fomentar en els seus deixebles la seva inquietud científica.

Vull recordar als meus companys (i amics) adjunts, residents, llevadores, infermeres i auxiliars que s'han interessat i han viscut de prop el desenvolupament d'aquest treball 'inacabable', especialment a la Dra. Lorena Rozas, Dra. Anna Taltavull i Dra. Cristina Adrados per ajudar-me en la inclusió de pacients i en la presa de les mostres i a la Dra. Alexandra Bonmatí per haver compartit amb mi les seves nocions de SPSS.

Als companys del servei d'endocrinologia, especialment al Dr. Eduardo Esteve i a la futura doctora Gemma Xifra per escoltar-me i aconsellar-me en els moments de 'desconcert'.

Estic en deute amb tot l'equip de Girexx, començant pel Dr. Àngel Rocas, impulsor d'aquesta tesi. Sempre present a nivell personal, pragmàtic i entusiasta, li agraeixo que ens hagi transmès el seu esperit inquiet i inagotable de treball i ànsies de saber. Al Dr. Ramon Brichs i als embriòlegs 'seniors' Eugènia Francisco-Busquets i Gerard Campos, i al Toni Francisco per l'obtenció i processament de les mostres i la preparació que tot això ha suposat. Gràcies també a tot el personal d'administració, especialment a la Jordina i la Azahara per la seva ajuda amb les donants, i al departament de França per 'perseguir' a les pacients fins a verificar els resultats de les 'betes'. També agraeixo molt especialment, la disponibilitat i la paciència de la Diana Sanmartín, la meva 'mestra' de Prezi.

A tot l'equip de la Clínica Girona, des de les instrumentistes fins als embriòlegs del Laboratori de Reproducció: gràcies Joan Sarquella per les facilitats que m'has posat i l'interès que sempre has demostrat, i a les 'reines' del laboratori: Mariona Hugas, Maria Fernández, Lúdia Julià i Elisenda Boix. Sense vosaltres, això no hagués estat possible.

També vull agrair a tot el personal del Centre d'Anàlisi Girona, i molt especialment a la Montse Neras, la seva ajuda desinteressada. La seva disposició han estat claus en les extraccions de les donants, així com el processament, gestió i emmagatzematge de les mostres.

Al personal del Laboratori Clínic de l'Hospital Dr. Josep Trueta, particularment a la Dra. Marina Fontan i al Dr. Jose Manuel Ramírez per les determinacions hormonals en sang i en líquid fol·licular.

Al Dr. Eugeni López-Bonet pels seus suggeriments en lo relatiu a les biòpsies d'endometri.

A la Cristina Martínez i la Maria Buxó per la seva inestimable ajuda, la seva sòlida experiència i inmensa paciència, sempre aportant valuoses observacions i correccions que he intentat atendre en la mesura de lo possible.

A l'Esther Sarrià, per procurar-me tots els articles que li he sol·licitat amb la major dedicació i urgència que ha estat possible en tot moment, i tantes altres coses.

No vull oblidar-me de totes les dones estèrils i les donants que han col·laborat desinteressadament en l'estudi, esperant que fos per 'una bona causa'.

Vull donar les gràcies als meus pares Joan i Paqui pels anys de sacrifici, per totes les oportunitats que m'han donat, per haver confiat en mi de forma inmesurable, per la seva estimació i per haver-me inculcat la perseverància en el treball: tot això és la millor herència que m'heu pogut deixar.

I com no, a la resta de la família Joan, Marian, Dani, Marc, Tere i Lluís pel vostre caliu. Els moments que passo amb vosaltres són les piles que necessito per poder dur a terme tasques com aquesta. Aquesta tesi, també és vostra.

Finalment, vull mencionar al Josep Maria, la persona més important de la meua vida. Ell és el meu millor amic i qui millor em coneix, i sap lo dur i al mateix temps lo gratificant que ha estat per mi dur a terme aquest projecte. Amb tota la discreció que el caracteritza i amb el seu do de l'oportunitat sempre està present, donant-me el recolzament i l'estimació necessaris que només una gran persona pot donar.



## **VI. ÍNDEX GENERAL**

---



1. INTRODUCCIÓ .....	49
1.1. FUNCIÓ REPRODUCTORA.....	50
1.1.1. EIX HIPOTÀLEM-HIPOFISARI-OVÀRIC .....	51
1.1.2. L'OVARI: FUNCIÓ HORMONAL I GAMETOGÈNESI .....	52
1.1.2.a. FOL.LICLE ANTRAL I DOMINÀNCIA FOL.LICULAR .....	58
1.1.2.b. EL FOL.LICLE PREEVULATORI .....	60
1.1.2.c. LUTEOGÈNESI I LUTEOLISI .....	61
1.1.2.d. ATRÈSIA FOL.LICULAR .....	62
1.1.3. CICLE ENDOMETRIAL .....	62
1.1.3.a. FASE PROLIFERATIVA .....	63
1.1.3.b. FASE SECRETORA .....	63
1.1.3.c. FASE MENSTRUAL.....	65
1.2. FECUNDACIÓ IN VITRO.....	65
1.3. PARÀMETRES DE RESPOSTA. EXPRESSIÓ DE GREM1, HAS2 I PTGS2 .....	67
1.4. EIX HIPOTÀLEM-HIPÒFISI-TIROÏDAL.....	72
1.4.1. REGULACIÓ CENTRAL DE LA FUNCIÓ TIROÏDAL .....	72
1.4.2. PRODUCCIÓ I TRANSPORT PLASMÀTIC DE LES HORMONES TIROÏDALS.....	73
1.4.3. TRANSPORT INTRACEL.LULAR DE LES HORMONES TIROÏDALS .....	74
1.4.4. MECANISMES D'ACCIÓ DE L'HORMONA TIROÏDAL. TR.....	76
1.4.4.a. ESTRUCTURA, EXPRESSIÓ I ISOFORMES DELS TR.....	78
1.4.4.b. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL TR.....	81
1.4.5. EXPRESSIÓ D'ADR $\beta$ 2 .....	81
1.4.6. ACCIONS EXTRANUCLEARS DE LES HORMONES TIROÏDALS .....	82
1.4.7. LES CONCENTRACIONS HORMONALS TIROÏDALS REGULEN ELS PATRONS I NIVELLS D'EXPRESSIÓ GÈNICA .....	82
1.4.8. METABOLISME DE LES HORMONES TIROÏDALS .....	84
1.4.9. DEIODITZACIÓ DE LA IODOTIRONINA .....	85



1.4.9.a. CARACTERÍSTIQUES BIOQUÍMIQUES DE LES DEIODINASES I PATRONS D'EXPRESSION TISSULAR.....	87
1.4.9.b. INHIBIDORS DE LES DEIODINASES .....	90
1.4.9.c. REGULACIÓ DE LES DEIODINASES .....	90
1.5. LÍQUID FOLLICULAR I FISIOLOGIA TIROÏDAL .....	91
1.6. FUNCIÓ TIROÏDAL I REPRODUCCIÓ .....	94
1.6.1. RECEPTORS HORMONALS TIROÏDALS (TR) I REPRODUCCIÓ .....	96
1.6.2. RECEPTOR DE TSH (TSHR) I REPRODUCCIÓ .....	99
1.6.3. TRANSPORT CEL·LULAR I REPRODUCCIÓ .....	100
1.6.4. DEIODINASES I REPRODUCCIÓ .....	100
2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI.....	105
3. HIPÒTESIS .....	109
4. OBJECTIUS.....	113
5. SUBJECTES I MÈTODES .....	117
5.1. DISSENY DE L'ESTUDI .....	119
5.2. PARTICIPANTS .....	119
5.2.1. GRUP DONES ESTÈRILS .....	119
5.2.1.a. CRITERIS D'INCLUSIÓ.....	119
5.2.1.b. CRITERIS D'EXCLUSIÓ .....	120
5.2.2. GRUP DONES FÈRTILS .....	121
5.2.2.a. CRITERIS D'INCLUSIÓ.....	121
5.2.2.b. CRITERIS D'EXCLUSIÓ .....	121
5.3. ESTUDI DIAGNÒSTIC D'ESTERILITAT .....	123
5.3.1. PROTOCOL EXPERIMENTAL .....	123
5.4. RUTINA D'ESTUDI DE LA DONANT D'OVÒCITS .....	124
5.4.1. PROTOCOL EXPERIMENTAL .....	125
5.5. PROTOCOL DE TRACTAMENT INDUCTOR DE L'OVULACIÓ .....	125

5.6. PARÀMETRES EXPERIMENTALS.....	129
5.6.1. CREACIÓ DE LA SEROTECA.....	129
5.6.2. DETERMINACIONS SÈRIQUES .....	129
5.6.3. RECOL·LECCIÓ DEL LÍQUID FOL·LICULAR I AÏLLAMENT DE CG .....	130
5.6.4. RECOL·LECCIÓ I AÏLLAMENT DE CE I CC.....	130
5.6.5. EXTRACCIÓ DE L'RNA.....	131
5.6.6. RETROTRANSCRIPCIÓ DE L'RNA .....	133
5.6.7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA VIA REAL-TIME PCR.....	134
5.6.8. KITS, REACTIUS I ASSAJOS COMERCIALS. EQUIPAMENT .....	138
5.7. VARIABLES ANALITZADES.....	139
5.7.1. VARIABLES PERSONALS .....	139
5.7.2. VARIABLES DE RESULTATS.....	141
5.7.3. VARIABLES PRINCIPALS DE VALORACIÓ .....	142
5.7.4. VARIABLES SECUNDÀRIES DE VALORACIÓ .....	142
5.9. ANÀLISI DELS RESULTATS .....	142
5.10. SISTEMES D'EMMAGATZEMAMENT I ORGANITZACIÓ .....	143
5.11. TÈCNiques DE DEPURACIÓ .....	143
5.12. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	144
5.13. ASPECTES ÈTICS.....	144
5.13.1. SELECCIÓ DE DONANTS .....	145
6. RESULTATS .....	147
6.1. CARACTERITZACIÓ DE LES COHORTS .....	149
6.2. ANÀLISI DELS RESULTATS DEL PRIMER OBJECTIU.....	153
6.2.1. EXPRESSIÓ GÈNICA DELS PARÀMETRES DE FUNCIÓ INTRACEL·LULAR HORMONAL TIROÏDAL EN LA POBLACIÓ FÈRTIL I ESTÈRIL.....	153
6.3. RESULTATS DEL SEGON OBJECTIU .....	156
6.3.1. RESULTATS EN CÈL·LULES DE LA GRANULOSA .....	156

6.3.2. RESULTATS EN CÈL.LULES CERVICALS.....	158
6.3.3. RESULTATS EN CÈL.LULES ENDOMETRIALS .....	160
6.3.4. EXPRESSIÓ GÈNICA DELS PARÀMETRES DE FUNCIÓ INTRACEL.LULAR HORMONAL TIROÏDAL EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA, CERVICALS I ENDOMETRIALS, I CONCENTRACIÓ HORMONAL PERIFÈRICA .....	161
6.4. RESULTATS DELS TERCER OBJECTIU .....	164
6.4.1. EXPRESSIÓ GÈNICA DE GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA I CERVICALS.....	164
6.4.2. ASSOCIACIONS ENTRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS PARÀMETRES INTRACEL.LULARS DE FUNCIÓ TIROÏDAL I L'EXPRESSIÓ DELS GENS GREM1, HAS2 I PTGS2 .....	166
6.4.3. ESTUDI D'ASSOCIACIONS ENTRE LA CONCENTRACIÓ HORMONAL PERIFÈRICA I L'EXPRESSIÓ DELS GENS GREM1, HAS2 I PTGS2.....	168
6.5. RESULTATS DEL QUART OBJECTIU .....	170
6.5.1. EXPRESSIÓ GÈNICA INTRACEL.LULAR HORMONAL TIROÏDAL I RESULTAT GESTACIONAL.....	170
6.6. COMPLICACIONS .....	172
7. DISCUSSIÓ.....	173
7.1. OBJECTIU 1: DIFERÈNCIES EN L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS TIROÏDALS TR $\alpha$ , TR $\beta$ I LES DEIODINASES D1, D2 I D3 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA OVÀRIQUES PERIOVULATÒRIES I CÈL.LULES CERVICALS UTERINES, ENTRE LA POBLACIÓ ESTÈRIL I FÈRTIL.....	179
7.1.1. EXPRESSIÓ DE RECEPTORS TIROÏDALS I DEIODINASES EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA .....	181
7.1.2. EXPRESSIÓ DE RECEPTORS TIROÏDALS I DEIODINASES EN CÈL.LULES ENDOMETRIALS.....	183
7.1.3. EXPRESSIÓ DE RECEPTORS TIROÏDALS I DEIODINASES EN CÈL.LULES CERVICALS .....	184
7.2. OBJECTIU 2: L'EXPRESSIÓ DELS GENS DELS RECEPTORS TIROÏDALS (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 I TR $\beta$ ) I LES DEIODINASES (D1, D2 I D3) S'ASSOCIEN A ALTRES PARÀMETRES RELACIONATS AMB LA FUNCIÓ TIROÏDAL INTRACEL.LULAR .....	186
7.2.1. EXPRESSIÓ DELS GENS DELS RECEPTORS TIROÏDALS (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 I TR $\beta$ ) I LES DEIODINASES (D1, D2 I D3) EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA.....	186

7.2.2. EXPRESSIÓ DELS GENS DELS RECEPTORS TIROÏDALS (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 I TR $\beta$ ) I LES DEIODINASES (D1, D2 I D3) EN CÈL.LULES ENDOMETRIALS .....	187
7.2.3. EXPRESSIÓ DELS GENS DELS RECEPTORS TIROÏDALS (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 I TR $\beta$ ) I LES DEIODINASES (D1, D2 I D3) EN CÈL.LULES CERVICALS.....	187
7.2.4. EXPRESSIÓ GÈNICA DELS RECEPTORS TIROÏDALS (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 I TR $\beta$ ) I LES DEIODINASES (D1, D2 I D3) EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA, CERVICALS, ENDOMETRIALS, I CONCENTRACIONS HORMONALS PERIFÈRIQUES .....	188
7.2.5. EXPRESSIÓ GÈNICA DELS RECEPTORS TIROÏDALS (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 I TR $\beta$ ) I LES DEIODINASES (D1, D2 I D3) EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA, I CONCENTRACIONS HORMONALS INTRAFOL.LICULARS.....	189
7.3. OBJECTIU 3: L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS PARÀMETRES DE FUNCIÓ INTRACEL.LULAR HORMONAL TIROÏDAL TR $\alpha$ , TR $\beta$ , D1, D2, I D3 ES RELACIONA AMB VARIACIONS EN L'EXPRESSIÓ DELS GENS ASSOCIATS A FERTILITAT GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA OVÀRIQUES, CÈL.LULES CERVICALS UTERINES I CÈL.LULES ENDOMETRIALS .....	190
7.3.1. PARÀMETRES D'EXPRESSIÓ GÈNICA DE FUNCIÓ TIROÏDAL I GENS GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA .....	192
7.3.2. PARÀMETRES D'EXPRESSIÓ GÈNICA DE FUNCIÓ TIROÏDAL I GENS GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES ENDOMETRIALS .....	192
7.3.3. PARÀMETRES D'EXPRESSIÓ GÈNICA DE FUNCIÓ TIROÏDAL I GENS GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES CERVICALS.....	193
7.3.4. EXPRESSIÓ GÈNICA DE GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA, CERVICALS, ENDOMETRIALS, I CONCENTRACIONS HORMONALS PERIFÈRIQUES .....	194
7.3.5. EXPRESSIÓ GÈNICA DE GREM1, HAS2 I PTGS2 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA I CONCENTRACIONS HORMONALS INTRAFOL.LICULARS .....	195
7.4. OBJECTIU 4: DIFERÈNCIES EN L'EXPRESSIÓ DE TR $\alpha$ , TR $\beta$ I D1-D2-D3 EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA DEL FOL.LICLE OVÀRIC PERIOVULATORI I CÈL.LULES CERVICALS UTERINES ENTRE LA POBLACIÓ ESTÈRIL QUE NO HAVIA OBTINGUT GESTACIÓ I EL GRUP FÈRTIL, ELS OÒCITS DE LES QUALS VAN DONAR LLOC A GESTACIÓ .....	195
7.5 LIMITACIONS DE L'ESTUDI .....	197
7.6. FORTALESES DE L'ESTUDI.....	201
8. CONCLUSIONS.....	203

9. BIBLIOGRAFIA .....	207
10. ANNEXES.....	239
10.1. EQUIPAMENT DEL LABORATORI .....	241
10.2. CONSENTIMENTS INFORMATS.....	245
10.3. QUADERN DE RECOLLIDA DE DADES .....	261
10.4. COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA .....	273

## **VII. RESUM/RESUMEN/ABSTRACT**

---



## **ESTUDI DE L'EXPRESSIONIÓ DELS RECEPTORS HORMONALS TIROÏDALS I LES DEIODINASES, EN CÈL.LULES DE L'APARELL REPRODUCTOR DE DONES FÈRTILS I ESTÈRILS SOTMESES A CICLES DE FECUNDACIÓ *IN VITRO***

**INTRODUCCIÓ:** L'esterilitat constitueix una part important de la pràctica clínica i de la consegüent despesa sanitària. Tot i el progrés que han experimentat les tècniques de reproducció assistida, aquestes tenen en el moment actual una taxa de gestació limitada. Entre d'altres sistemes hormonal, està demostrat que l'*estatus* tiroïdal juga un paper determinant en varis aspectes de la reproducció humana.

**OBJECTIUS:** Avaluar si els paràmetres associats a la funció intracel.lular de les hormones tiroïdals en relació a l'expressió dels receptors *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , *ADR $\beta$ 2* i les deiodinases *D1-D2-D3* en cèl.lules de la granulosa ovàriques i cèl.lules cervicals uterines són diferents en dones fèrtils i estèrils, i si la presència d'aquests s'associen a diferències en la resposta al tractament de fecundació *in vitro*.

**MATERIAL I MÈTODES:** Es tracta d'un estudi descriptiu prospectiu de dues cohorts consistents en 33 dones fèrtils i 23 estèrils de dos centres diferents. S'han realitzat un total de 56 puncions fol.liculars en el context de tècniques de fecundació *in vitro*, que en el cas de les dones fèrtils tenia com objectiu la donació d'òvuls. S'ha analitzat l'expressió gènica dels receptors tiroïdals *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , les deiodinases *D1-D2-D3* i la dels factors associats a fertilitat *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa dels fol.licles aspirats i en cèl.lules cervicals de tots els subjectes, així com en cèl.lules endometrials de les dones fèrtils.

**RESULTATS:** En les cèl.lules de la granulosa ovàriques periovlutòries i cervicals uterines de dones estèrils sotmeses a fecundació *in vitro* s'identifica una sobreexpressió de *TR $\alpha$ 2* (relativa a PPIA) en comparació amb les mateixes cèl.lules de dones fèrtils ( $p < 0.0001$  en cèl.lules de la granulosa i  $p = 0.028$  en cèl.lules cervicals). De manera congruent, en cèl.lules de la granulosa de dones estèrils s'observa una disminució de l'expressió de *D3* ( $p = 0.011$ ) en comparació amb les cèl.lules de la granulosa de dones fèrtils. Al mateix temps, també existeix una associació entre



l'expressió gènica del receptor  $TR\alpha 2$  en cèl.lules de la granulosa i l'edat de la dona, independentment del seu grau de fertilitat ( $p=0.01$ ).

De forma paral.lela al que succeeix en altres cèl.lules diana de la funció tiroïdal (múscul, fetge i teixit adipós), en cèl.lules de la granulosa existeix una associació inversa significativa entre l'expressió del receptor  $TR\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$  ( $p=0.003$ ) i entre  $TR\alpha 2$  i  $D3$  ( $p=0.005$ ) existint associació positiva entre  $TR\beta$  i  $D3$  ( $p=0.038$ ). En cèl.lules cervicals s'observa, de manera concordant al que succeeix en cèl.lules de la granulosa, una associació positiva entre  $TR\alpha 1$  i  $ADR\beta 2$  ( $p=0.003$ ),  $TR\alpha 1$  i  $D3$  ( $p<0.001$ ) i entre  $TR\beta$  i  $D3$  ( $p=0.008$ ). En l'endometri, també existeix associació positiva entre el rati  $TR\alpha 1/\alpha 2$  i  $D3$  ( $p=0.032$ ), i inversa entre  $TR\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$  ( $p=0.025$ ), entre d'altres.

En cèl.lules de la granulosa ovàriques de les dues cohorts de dones (fèrtil i estèril), els gens implicats en la fertilitat  $GREM1$  i  $PTGS2$  s'associen a l'expressió dels paràmetres de funció intracel.lular hormonal tiroïdal  $TR\alpha 2$ ,  $ADR\beta 2$  i  $D3$ , essent les associacions més representatives per  $GREM1$  amb  $TR\alpha 2$  ( $p=0.008$ ),  $ADR\beta 2$  ( $p<0.0001$ ) i  $D3$  ( $p<0.0001$ ) i per  $PTGS2$  amb  $TR\alpha 2$  ( $p=0.001$ ) i  $ADR\beta 2$  ( $p=0.004$ ).

La població estèril sense gestació al final del tractament expressa major quantitat de  $TR\alpha 2$  ( $p=0.017$ ) i menor de  $ADR\beta 2$  ( $p=0.008$ ),  $D3$  ( $p=0.034$ ),  $GREM1$  ( $p=0.003$ ) i  $PTGS2$  ( $p=0.002$ ) en cèl.lules de la granulosa del fol.licle ovàric periovulatori, que la població fèrtil els oòcits de les quals han donat lloc a gestació, al llarg d'un cicle de fecundació *in vitro*. En cèl.lules cervicals, aquesta mateixa població estèril expressa major quantitat de  $TR\alpha 2$  ( $p=0.033$ ) i de  $D2$  ( $p=0.015$ ) que els seus homòlegs fèrtils amb resultat favorable.

**CONCLUSIONS:** Els paràmetres associats a la funció intracel.lular hormonal tiroïdal en cèl.lules de la granulosa ovàriques i cèl.lules cervicals uterines en fase periovulatòria, són diferents en dones fèrtils i estèrils, i al mateix temps, també s'associen a diferències en la resposta al tractament de fecundació *in vitro*.

## **ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES TIROIDEOS Y LAS DESYODASAS, EN CÉLULAS DEL APARATO REPRODUCTOR DE MUJERES FÉRTILES Y ESTÉRILES SOMETIDAS A CICLOS DE FECUNDACIÓN *IN VITRO***

**INTRODUCCIÓN:** La esterilidad constituye una parte importante de la práctica clínica y del consiguiente gasto sanitario. A pesar del progreso que han experimentado las técnicas de reproducción asistida, estas tienen en el momento actual una tasa de gestación limitada. Entre otros sistemas hormonales, está demostrado que el *estatus* tiroideo juega un papel determinante en varios aspectos de la reproducción humana.

**OBJECTIVOS:** Evaluar si los parámetros asociados a la función intracelular de las hormonas tiroideas en relación a la expresión de los receptores *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , *ADR $\beta$ 2* y las desyodasas *D1-D2-D3*, en células de la granulosa ovárica y células cervicales uterinas son diferentes en mujeres fértiles y estériles, y si la presencia de éstos se asocian a diferencias en la respuesta al tratamiento de fecundación *in vitro*.

**SUJETOS Y MÉTODOS:** Se trata de un estudio descriptivo prospectivo de dos cohortes consistentes en 33 mujeres fértiles y 23 estériles de dos centros diferentes. Se han realizado un total de 56 punciones foliculares en el contexto de técnicas de fecundación *in vitro*, que en el caso de las mujeres fértiles tenía como objetivo la donación de óvulos. Se ha analizado la expresión génica de los receptores tiroideos *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , las desyodasas *D1-D2-D3* y la de los factores asociados a fertilidad *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en células de la granulosa de los folículos aspirados y en células cervicales de todos los sujetos, así como en células endometriales de las mujeres fértiles.

**RESULTADOS:** En las células de la granulosa ovárica periovulatorias y cervicales uterinas de mujeres estériles sometidas a fecundación *in vitro* se identifica una sobreexpresión de *TR $\alpha$ 2* (relativa a PPIA) en comparación con las mismas células de mujeres fértiles ( $p < 0.0001$  en células de la granulosa y  $p = 0.028$  en células cervicales). De manera congruente, en células de la granulosa de mujeres estériles se observa una disminución de la expresión de *D3* ( $p = 0.011$ ) en comparación con las células de la

granulosa de mujeres fértiles. Al mismo tiempo, también existe una asociación entre la expresión génica del receptor  $TR\alpha 2$  en células de la granulosa y la edad de la mujer, independientemente de su grado de fertilidad ( $p=0.01$ ).

Paralelamente a lo que sucede en otras células diana de la función tiroidea (músculo, hígado y tejido adiposo), en células de la granulosa existe una asociación inversa significativa entre la expresión del receptor  $TR\alpha 2$  y  $ADR\beta 2$  ( $p=0.003$ ) y entre  $TR\alpha 2$  y  $D3$  ( $p=0.005$ ) existiendo asociación positiva entre  $TR\beta$  y  $D3$  ( $p=0.038$ ). En células cervicales se observa, de manera concordante a lo que sucede en células de la granulosa, una asociación positiva entre  $TR\alpha 1$  y  $ADR\beta 2$  ( $p=0.003$ ),  $TR\alpha 1$  y  $D3$  ( $p<0.001$ ) y entre  $TR\beta$  y  $D3$  ( $p=0.008$ ). En el endometrio, también existe asociación positiva entre el ratio  $TR\alpha 1/\alpha 2$  y  $D3$  ( $p=0.032$ ), e inversa entre  $TR\alpha 2$  y  $ADR\beta 2$  ( $p=0.025$ ), entre otras.

En células de la granulosa ováricas de las dos cohortes de mujeres (fértil y estéril), los genes implicados en la fertilidad  $GREM1$  y  $PTGS2$  se asocian a la expresión de los parámetros de función intracelular hormonal tiroidea  $TR\alpha 2$ ,  $ADR\beta 2$  y  $D3$ , siendo las asociaciones más representativas para  $GREM1$  con  $TR\alpha 2$  ( $p=0.008$ ),  $ADR\beta 2$  ( $p<0.0001$ ) y  $D3$  ( $p<0.0001$ ) y para  $PTGS2$  con  $TR\alpha 2$  ( $p=0.001$ ) y  $ADR\beta 2$  ( $p=0.004$ ).

La población estéril sin gestación al final del tratamiento expresa mayor cantidad de  $TR\alpha 2$  ( $p=0.017$ ) y menor de  $ADR\beta 2$  ( $p=0.008$ ),  $D3$  ( $p=0.034$ ),  $GREM1$  ( $p=0.003$ ) y  $PTGS2$  ( $p=0.002$ ) en células de la granulosa del folículo ovárico periovulatorio, que la población fértil cuyos ovocitos han dado lugar a embarazo, a lo largo de un ciclo de fecundación *in vitro*. En células cervicales, esta misma población estéril expresa mayor cantidad de  $TR\alpha 2$  ( $p=0.033$ ) y de  $D2$  ( $p=0.015$ ) que sus homólogos fértiles con resultado favorable.

**CONCLUSIONES:** Los parámetros asociados a la función intracelular hormonal tiroidea en células de la granulosa ováricas y células cervicales uterinas en fase periovulatoria, son diferentes en mujeres fértiles y estériles, y al mismo tiempo también se asocian a diferencias en la respuesta al tratamiento de fecundación *in vitro*.

## **STUDY OF THE EXPRESSION OF THYROID HORMONE RECEPTORS AND DEIODINASES IN CELLS OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM FROM FERTILE AND STERILE WOMEN UNDER *IN VITRO* FERTILIZATION TREATMENT**

**INTRODUCTION:** Infertility is a frequently underestimated problem in the clinical setting which has an important impact on health budget. Despite progress experienced by assisted reproduction techniques, infertile women have at present, limited pregnancy rate. Among other hormonal systems, it is known that thyroid status plays a role in several aspects of human reproduction.

**PURPOSE:** To specifically evaluate whether the expression of factors associated with intracellular thyroid hormone function, *TRα1-TRα2-TRβ* receptors, *D1-D2-D3* deiodinases and *ADRβ2* in ovarian granulosa cells and uterine cervical cells, are different in fertile and infertile women, and if their presence is associated with differences in the response to IVF treatment.

**SUBJECTS AND METHODS:** This is a prospective study of two cohorts, consisting of 33 fertile and 23 infertile women, from two different medical centers. Fifty-six egg retrieval, in the context of *in vitro* fertilization techniques were performed, which in the case of fertile women had as objective to egg donation. *TRα1*, *TRα2*, *TRβ* thyroid receptors, *D1-D2-D3* deiodinases and the fertility associated factors *GREM1*, *HAS2* and *PTGS2* gene expression were analyzed in granulosa cells of follicles aspirated and cervical cells in all subjects, as well as endometrial cells from fertile women.

**RESULTS:** In cells from sterile women undergoing IVF, *TRα2* overexpression was found when compared to cells from fertile women ( $p < 0.0001$  in granulosa cells and  $p = 0.028$  in cervical cells). Consistent with this, a *D3* decreased expression ( $p = 0.011$ ) was observed in granulosa cells of infertile women. At the same time, an association between *TRα2* receptor gene expression in granulosa cells and the age of women, regardless of their degree of fertility ( $p = 0.01$ ), was found.

Parallel to other target cells of thyroid function (muscle, liver and adipose tissue), in granulosa cells there was also a significant inverse association between *TRα2* receptor and *ADRβ2* expression ( $p=0.003$ ) and between *TRα2* and *D3* ( $p=0.005$ ). A positive association was found between *TRβ* and *D3* ( $p=0.038$ ). In cervical cells, consistent with what happens in granulosa cells, a positive association between *TRα1* and *ADRβ2* ( $p=0.003$ ), *TRα1* and *D3* ( $p < 0.001$ ) and between *TRβ* and *D3* ( $p=0.008$ ) was observed. In endometrium, there was also a positive association between *TRα1/α2* ratio and *D3* ( $p=0.032$ ), and reverse between *TRα2* and *ADRβ2* ( $p=0.025$ ), among others.

In ovarian granulosa cells from fertile and sterile women, genes involved in fertility *PTGS2* and *GREM1*, were associated with that of intracellular thyroid hormone function factors *TRα2*, *ADRβ2* and *D3*, being the most representative associations for *GREM1* with *TRα2* ( $p=0.008$ ), *ADRβ2* ( $p < 0.0001$ ) and *D3* ( $p < 0.0001$ ) and for *PTGS2* with *TRα2* ( $p=0.001$ ) and *ADRβ2* ( $p=0.004$ ).

The unsuccessful IVF sterile population expressed more *TRα2* ( $p=0.017$ ), and less *ADRβ2* ( $p=0.008$ ), *D3* ( $p=0.034$ ), *GREM1* ( $p=0.003$ ) and *PTGS2* ( $p=0.002$ ) in granulosa cells of the peri-ovulatory ovarian follicle, than the fertile population whose oocytes resulted in pregnancy after IVF treatment. In cervical cells, sterile women expressed more *TRα2* ( $p=0.033$ ) and *D2* ( $p=0.015$ ), than fertile counterparts with positive result.

**CONCLUSIONS:** The factors associated with intracellular thyroid hormone function in periovulatory ovarian granulosa cells and uterine cervical cells were different in fertile and infertile women. The expression of these factors was associated with differences in response treatment after *in vitro* fertilization.

# 1. INTRODUCCIÓ

---



L'esterilitat es defineix com la incapacitat per concebre després d'un any de relacions sexuals continuades sense protecció contraceptiva. Afecta aproximadament al 15% de les parelles del nostre medi estimant-se, segons dades de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), que a Espanya hi ha més de 600.000 parelles implicades, constituint una part important de la pràctica clínica diària i de la consegüent despesa sanitària, tant aquí com a nivell mundial. Ja a l'any 1991 s'admetia que en països industrialitzats unes 1200 parelles per cada milió d'habitants i any tenien problemes de fertilitat (Thonneau, 1991) fet que suposaria més de 44.000 noves parelles cada any a Espanya (SEF, 2007). Les darreres dades del registre del FIVCAT de 2012 indiquen que el 2009 es van realitzar, a Catalunya, 1728 cicles de RHA per cada milió d'habitants.

A Europa, l'any 2006 hi va haver gairebé 90.000 naixements mitjançant aquestes tècniques i a Catalunya l'any 2009, en van ser més de 2.800, concretament el 3.4% del total de nascuts vius (FIVCAT.NET versió actualitzada maig 2012). A més, s'ha de tenir present que la seva incidència global està mostrant, des de fa 30 anys, un comportament ascendent per diverses causes, la més important de les quals és l'ajornament de la maternitat. Degut a l'estrès psicofísic, la frustració i la desesperança generats pel trastorn, aquesta entitat ha estat considerada, per la Organització Mundial de la Salut (OMS), una malaltia per carència.

Des que P. Steptoe i R. Edwards van aconseguir el 1978, la primera gestació mitjançant tècniques de fecundació *in vitro*/transferència embrionària, s'han obert les portes a la possibilitat d'intervenir efectivament en el procés reproductiu humà. Milions de parelles estèrils que fins llavors no tenien capacitat de tenir descendència, han recorregut a aquest procediment com un camí real i eficient cap a la paternitat. Les causes d'esterilitat són complexes, i en molts casos provenen de la combinació de factors que afecten a ambdós membres de la parella (40%). Es pot dir que el 30% són d'origen masculí, el 30% corresponen a factors tuboperitoneals, 20% degudes a disfunció ovulatòria, 10% per factors cervicals i 15% d'origen desconegut. Així doncs,



entre els múltiples factors que condicionen certa dificultat en la capacitat reproductora n'hi ha, a hores d'ara, alguns que estan per definir.

La inducció de l'ovulació és una de les facetes amb més èxit dins de la medicina reproductiva. Els avenços recents en aquest camp han tingut com a resultat una varietat de tècniques que restableixen, en gran proporció de casos, els cicles ovulatoris en dones amb irregularitat menstrual o amenorrea. L'elecció de la tècnica d'estimulació ovàrica no obstant, depèn de les circumstàncies individuals de cada dona en particular, i la selecció apropiada de pacients és important si es vol tenir èxit (The ESHRE Capri Workshop Group, 1995; American Society for Reproductive Medicine, 1998). Per tant, la taxa de gestació de les tècniques de reproducció assistida ve determinada en part pels factors metodològics del tractament i en part, pels factors intrínsecs de la funció reproductora.

A continuació es revisaran alguns aspectes del procés de fertilització humana i de la tecnologia reproductiva actual.

## **1.1. FUNCIO REPRODUCTORA**

Per a que hi hagi una normal regulació de la funció reproductora, a més d'un correcte desenvolupament sexual, la normalitat cromosòmica i l'adequada anatomia genital, és indispensable el bon funcionament de dos sistemes glandulars encefàlics (l'hipotàlem i la hipòfisi), juntament amb una seqüència d'esdeveniments controlats pels esteroides sexuals i pèptids produïts a nivell fol·licular ovàric. Aquest eix principal, el gonadòtrop, està intrincat enmig d'un entramat endocrinològic complex que implica diferents eixos hormonals que s'autorregulen directa o indirectament entre si. Entre ells hi figuren els eixos tiròtrop i corticòtrop, que juntament amb el gonadòtrop es veuen regulats per sistemes com el dopaminèrgic, amb participació de la prolactina i les endorfines, i la via posterior hipofisària amb la vasopressina i l'oxitocina com a hormones principals. Tots aquests sistemes estan modulats per

infinat de pèptids i substàncies, mitjançant mecanismes altament sofisticats, i la seva homeostasi ve definida al mateix temps per la genètica, l'epigenètica, la proteòmica i la metabolòmica que en determinades circumstàncies arriben a ser modificades per l'entorn (dieta, estil de vida, exposició a toxines, etc).

### 1.1.1. Eix Hipotàlem-Hipofisari-Ovàric

De forma global es pot dir que el sistema hormonal que regula el funcionament genital femení és l'eix hipotàlem-hipofisari-ovàric. Com bé diu el seu nom, aquest sistema inclou tres jerarquies diferents d'hormones:

- Una *hormona de secreció hipotalàmica*, l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH), anomenada també hormona alliberadora d'hormona luteïnitzant (LHRH).
- Les hormones de l'adenohipòfisi, *hormona estimulant del fol.licle (FSH)* i *hormona luteïnitzant (LH)*, que se secreten sota l'estímul de l'hormona alliberadora procedent de l'hipotàlem.
- Les hormones ovàriques, *estrògens* i *progesterona*, secretades pels ovaris estimulats per les dues hormones de la hipòfisi anterior.

Aquestes hormones no s'alliberen en quantitats constants durant el cicle sexual femení, sino que ho fan en descàrregues que varien durant les diferents fases del cicle. Petites concentracions d'estrògens i quantitats una mica majors de progesterona inhibeixen la producció de FSH i LH. Aquests efectes de retroalimentació funcionen fonamentalment a nivell de l'adenohipòfisi, però també a nivell hipotalàmic, disminuint la secreció de GnRH mitjançant una modificació en la freqüència dels seus polsos.

### 1.1.2. L'ovari: funció hormonal i gametogènesi

Dins del procés reproductiu femení, unes de les funcions més rellevants pertanyen a l'ovari que, juntament amb altres sistemes hormonals és el responsable de controlar el desenvolupament fol·licular. Aquesta acció es duu a terme mitjançant factors que actuen per mecanismes de secreció autocrina i paracrina, tenint els nivells de gonadotropines, una acció merament permissiva sobre la fol·liculogènesi. Les funcions ovàriques es podrien resumir en dues:

- *Alliberació periòdica de **gàmetes o cèl·lules germinals femenines***, que fins al moment de l'ovulació es troben allotjades dins del fol·licle. Aquest, constitueix la unitat funcional bàsica de l'ovari en la dona adulta i té la funció de proporcionar el microambient òptim per al seu desenvolupament.
- *Producció d'**hormones***, que són transcendents en varis moments:
  - Contribució al desenvolupament dels **caràcters sexuals secundaris** femenins, mitjançant la secreció d'esteroides.
  - Regulació del **cicle genital femení**, que donades les variacions de la seva producció estrogènica, permet modular l'alliberació hipofisària de gonadotropines, determinant el patró cíclic de secreció.
  - Participació, mitjançant mecanismes autocrins i paracrins, en la **selecció i maduració del fol·licle** dominant.
  - Preparació uterina, eminentment endometrial, fonamental per a l'adequada implantació embrionària.

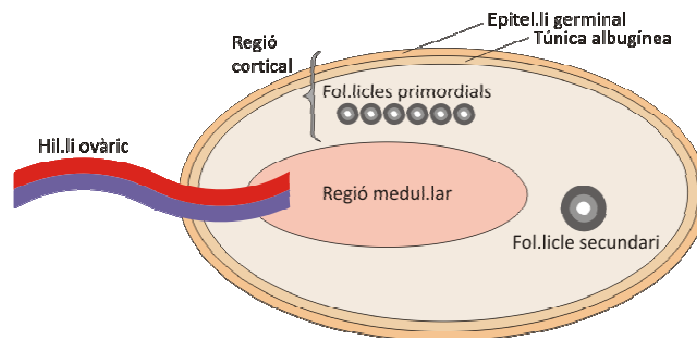
Histològicament, l'ovari està dividit en 3 compartiments ben diferenciats:

- El **còrtex**, la porció més externa del qual, denominada túnica albugínia, té la superfície tapissada per una capa de cèl·lules cuboïdals anomenada mesoteli

ovàric. Els ovòcits o oòcits, situats en l'interior dels fol·licles, es troben en la part interna d'aquesta capa, enmig de l'estroma ovàric. Aquest darrer, està constituït per teixit connectiu i cèl·lules intersticials, capaces de respondre a la hormona luteïnitzant (LH) i la gonadotropina coriònica humana (hCG), produïnt andrògens.

- La **medulla**, zona central de l'ovari, que procedeix majoritàriament de cèl·lules mesonèfriques, constituïda per teixit connectiu ricament vascularitzat.
- L'**hili** ó punt d'unió al mesovari, que conté vasos, nervis i cèl·lules hiliars.

**Figura 1.** Anatomia de l'ovari



## ANATOMIA DE L'OVARI

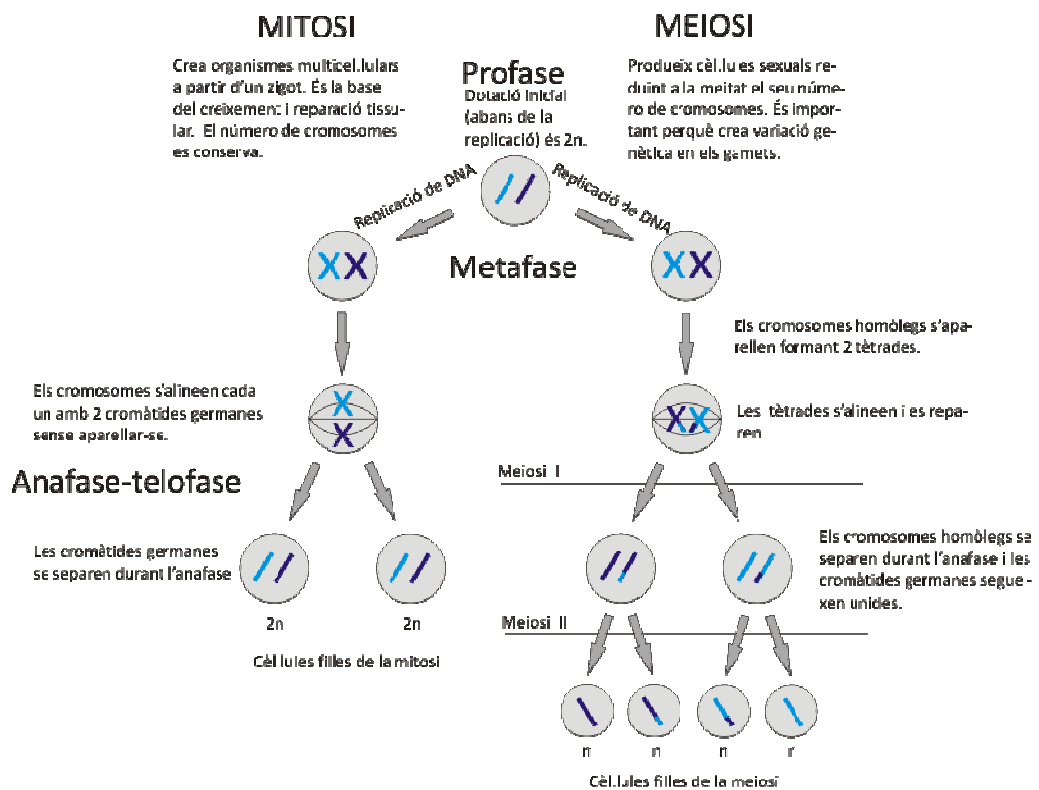
*Anatomia, histologia i distribució fol·licular de l'ovari de la dona en edat fèrtil.*

Pel que respecta a la gametogènesi, definida com el procés maduratiu de les cèl·lules germinals que les capacita per a la fecundació, cal tenir present que en l'embrió femení, aquestes cèl·lules d'origen endodèrmic i originades en el sac vitel·lí, migren a la cresta germinal per constituir la gònada primitiva cap a les 5 setmanes de gestació. És llavors quan inicien un procés de divisió mitòtica i posteriorment meiótica, fins que, cap a la setmana 20 de la gestació, assoleixen la xifra aproximada de 7 milions. Durant aquest període, la gònada inicia la seva diferenciació sexual en sentit femení, pel que ja es denomina ovarí. A nivell de la setmana 24 de gestació, les

cèl.lules germinals han arribat a la fase de diplotè de la profase I de la primera divisió meiótica, en la que queden detingudes. En aquest moment les ovogònies, anomenades així fins llavors, reben el nom d'ovòcits i s'envolten d'una capa de cèl.lules somàtiques epitelials planes, donant lloc així als fol.licles primordials.

La *meiosi*, característica de les espècies amb reproducció sexual, és un procés de divisió cel.lular mitjançant el qual, una cèl.lula diploide ( $2n$ ) experimenta dues divisions successives, amb la capacitat de generar quatre cèl.lules haploides ( $n$ ). Aquest procés es duu a terme en dues divisions nuclears i citoplasmàtiques, anomenades primera i segona divisió meiótica. Ambdues, comprenen profase, metafase, anafase i telofase. Aquest procediment, és el responsable del manteniment del nombre cromosòmic característic de cada espècie.

**Figura 2.** Fases de la mitosi i la meiosi



*Resum esquemàtic de les diferències entre la divisió cel.lular mitòtica i meiótica.*

Després del naixement, cada ovari conté entre 250.000 i 500.000 fol·licles quiescents que constitueixen la reserva ovàrica. Aquesta, disminueix de forma constant des de la setmana 24 de gestació fins a la menopausa, moment en què cada ovari conté entre 100 i 1.000 fol·licles quiescents. Està establert que la reserva ovàrica comença a ser limitada a partir dels 35 anys i disminueix de forma dràstica a partir dels 38. Des de llavors, una part d'aquests fol·licles restants aniran depleccionant-se seguint el seu desenvolupament i arribant a la maduració completa (inclòs durant la menopausa), mentre que altres experimentaràn atrèxia per apoptosi.

Com s'ha dit anteriorment, tots els ovòcits primaris inclosos en els respectius fol·licles primordials, romanen aturats en fase de *diploquè de la primera divisió meiótica*, des de l'edat fetal fins a la pubertat. En l'edat prepuberal alguns dels fol·licles començaran el seu creixement a expenses de l'augment del tamany dels ovòcits i del nombre de cèl·lules fol·liculars. Tots aquests processos inicials es duen a terme sense una intervenció hormonal determinant.

A partir de la pubertat i en cada cicle menstrual, un cert nombre d'ovòcits primaris completaran la primera divisió meiótica. El desenvolupament fol·licular complet, té una durada aproximada de 85 dies, dels quals només els darrers 20 dies depèn de l'estímul de les gonadotropines. Les cèl·lules de la granulosa que envolten l'ovòcit són avasculares i estan separades de l'estroma per una membrana basal. Aquestes careixen d'aport vascular fins que conclou l'ovulació, depenent fins aquell moment, d'unions comunicants especialitzades que connecten les cèl·lules i es comuniquen amb l'ovòcit mitjançant l'intercanvi metabòlic i el transport de mol·lècules de senyalització. Aquesta estructura permet la determinació de la meiosi en el moment adequat. Aquest grup de cèl·lules més proper a l'ovòcit s'anomenen cèl·lules del cúmul (CC) i tenen funcions específiques que no tenen la resta de cèl·lules de la granulosa (CG). Les CC i CG també difereixen en l'expressió de factors reguladors del cicle cel·lular (Wu and Wolgemuth, 1995) i d'hormones proteiques (Braw-Tal, 1994).

Un cop superada la fase de creixement autònom, el fol·licle precisa d'uns nivells de FSH per a continuar el seu desenvolupament. El control de les gonadotrofines hipofisàries està en funció de la producció ovàrica d'estradiol, però a l'ovari li calen una sèrie d'esdeveniments abans d'arribar a poder produir estrògens:

- **Formació de la teca interna:** El primer pas del desenvolupament fol·licular es produeix en la cortical ovàrica, que és avascular. No obstant, un cop el fol·licle assoleix un tamany determinat, aquest penetra en la medul·lar, molt millor irrigada, i es forma la teca interna, una capa de teixit fibrós situada per fora de la granulosa, la qual secreta un factor estimulant de l'angiogènesi que fa possible la formació dels vasos sanguinis en aquest nivell. Aquest fet contribuirà al creixement fol·licular, exposarà el fol·licle a les hormones plasmàtiques, permetrà a les cèl·lules de la teca la síntesi d'esteroides a partir del colesterol i, finalment, farà possible la diferenciació de la teca inicial en dues capes: una interna, intensament vascularitzada i una externa, que té funció protectora. Les cèl·lules de la teca disposen de grans quantitats de receptors de LH que faran possible la producció d'andrògens. Una part d'aquests seran traslladats a les cèl·lules granuloses on seran convertits a estrògens per acció de l'aromatasa i una altra part potenciarà l'acció de la FSH sobre el fol·licle, modulant la seva activitat.
- **Formació de les gap junctions:** Es tracta d'unions de contacte altament especialitzades per l'intercanvi d'informació entre les cèl·lules de la granulosa, i entre aquestes i l'ovòcit.
- **Aparició dels receptors de FSH i estradiol:** Les cèl·lules de la granulosa desenvolupen, a mesura que avança la fase fol·licular del cicle menstrual, receptors de FSH, els quals a l'activar-se secreten petites quantitats d'estrògens que facilitaran la formació de cavitats fol·liculars i la producció de líquid, que inicialment prové de les pròpies cèl·lules fol·liculars però que després ho fa a partir del transsudat dels capil·lars que envolten la granulosa. En el moment en què es forma la cavitat fol·licular, el fol·licle primari passa a anomenar-se secundari. La

major expressió de receptors de la FSH correspon a les cèl.lules de la granulosa, però també n'hi ha a la superfície ovàrica i a la trompa de Fal.lopi. El nombre de fol.licles que maduren en cada cicle menstrual és depenent de la quantitat de FSH disponible per les gònades i de la sensibilitat dels fol.licles a les gonadotropines. El desenvolupament i maduració dels fol.licles ovàrics més enllà de l'etapa d'antral requereix que el nivell circulant de FSH sobrepassi un determinat dintell per sota del qual, l'acció d'aquesta hormona és inefectiva. El dintell de FSH permet que l'elevació del nivell de FSH que es produeix al final de la fase lútea de cada cicle menstrual recluti una cohort de fol.licles antrals per a que un d'ells completi el seu desenvolupament i maduració. L'estímul de la FSH augmenta el nombre dels seus receptors i els d'estradiol en aquestes cèl.lules.

Les cèl.lules de la granulosa disposen també de certs nivells de receptors de LH, l'adquisició dels quals comença a partir del tamany aproximat de 10 mm. En fase fol.licular avançada, quan els fol.licles assoleixen un diàmetre aproximat de 16 mm, la granulosa ha completat la síntesi d'aquests receptors i són plenament sensibles a l'acció d'aquesta hormona. Els nivells de receptors en aquestes cèl.lules són variables, de tal forma que les properes a la membrana basal tenen més altes concentracions i les properes a l'ovòcit en tenen menys. Per a que l'acció de la LH sigui adequada els seus nivells s'han de mantenir per sota d'un límit i el ritme de les seves pulsacions cal que estigui per sota d'una determinada freqüència. Quan la concentració d'andrògens que arriba a la granulosa és massa elevada, fet que succeeix per exemple en la síndrome de l'ovari poliquístic, se supera la capacitat d'aromatització d'aquestes cèl.lules que llavors transformen aquests andrògens en altres més potents com la dehidrotestosterona, donant lloc a un microambient fol.licular androgènic que disminueix la mitosi de les cèl.lules de la granulosa i provoca canvis degeneratius i atrèsia fol.licular.

Per tots aquests motius només participaran en un nou cicle ovàric els fol.licles que sorgeixen del pool coincidint amb uns nivells adequats de FSH i LH, fet que es determina al final de la fase lútea del cicle previ.



Tot i que les cèl·lules de la granulosa són capaces de produir els tres tipus d'esteroides ovàrics (estrògens, progesterona i andrògens) majoritàriament secreten estradiol, hormona que reflecteix el grau de desenvolupament fol·licular. Segons la teoria de 'dos cèl·lules, dos gonadotropines', la LH estimularia les cèl·lules de la teca per a produir andrògens a partir del colesterol que reben gràcies a la seva rica vascularització. En canvi, a la granulosa no hi arriba aport sanguini i només rep els andrògens (bàsicament androstendiona i testosterona) sintetitzats per la teca interna i que difonen a través de la membrana basal, cap a les seves cèl·lules, per ser aromatitzades a estrògens gràcies als estímuls de la FSH.

La capacitat aromatitzant d'andrògens depenent de la FSH no es desenvolupa completament fins a la fase de fol·licle antral no obstant, en el fol·licle preantral petites quantitats de FSH li permeten crear el seu propi ambient estrogènic.

#### ***1.1.2.a. Fol·licle antral i dominància fol·licular***

Sota l'ordre de les hormones esteroïdals i la FSH, la producció de líquid fol·licular que s'acumula entre les cèl·lules de la granulosa augmenta formant l'antre fol·licular, que constitueix un ambient únic per a cada fol·licle i permet la nutrició de l'ovòcit i de les cèl·lules de la granulosa. El líquid fol·licular està format per gran quantitat de substàncies entre les quals destaquen els ions, electròlits, mucopolisacàrids, proteïnes plasmàtiques, gonadotropines i esteroides. Mentre que la seva concentració de proteïnes plasmàtiques és similar a la del plasma, la de gonadotropines està regulada en funció del tamany fol·licular i de la fase del cicle en què es trobi.

La FSH presenta concentracions similars durant tot el cicle mentre que la LH no canvia fins a la fase preovulatòria, moment en què experimenta un increment brusca. Els andrògens estan més concentrats en els fol·licles antrals que en el plasma, i la relació andrògens/estrògens és més elevada de forma proporcional, en els fol·licles

petits i atrèsics. Els fol·licles preovulatoris contenen més concentració d'estrògens i progesterona i menys andrògens en proporció. L'acúmul de líquid suposa un augment del tamany fol·licular que arriba fins als 2 cm de diàmetre, fet que comporta una compressió de l'estroma que envolta el fol·licle, constituïnt la teca externa. En aquest moment, i sota l'estímul de la FSH, apareixen els receptors de LH que assoleixen el seu màxim nombre en el període preovulatori. També ho fan els receptors de prolactina i prostaglandines en les cèl·lules de la granulosa. La interacció entre FSH i estradiol, importants fins a arribar a aquest moment, també sembla responsable de la selecció del fol·licle destinat a ovular (Fritz i Speroff, 1982). Cap al dia 5è-7è del cicle es produeix un augment dels nivells de 17- $\beta$ -estradiol en la sang venosa de l'ovari que posteriorment ovularà. D'aquesta forma, es produeix un feedback negatiu sobre els nivells de FSH, que conduirà a l'atrèsia de tots els fol·licles, exceptuant el dominant. Això es deu a que, tot i que el fol·licle dominant segueix depenent de la FSH pel seu desenvolupament, pot escapar de l'atrèsia gràcies a tres mecanismes:

- El fol·licle dominant, degut a la major proliferació de cèl·lules de la granulosa, presenta major nombre de receptors per la FSH fet que li permet continuar amb l'aromatització i la síntesi d'estradiol.
- La millor vascularització, juntament a un major desenvolupament de la teca, li permet l'arribada de major concentració de FSH que a la resta de fol·licles.
- L'acció de factors ovàrics no esteroïdals, com la inhibina produïda per les cèl·lules de la granulosa, que actua sobre la hipòfisi frenant la secreció de gonadotrofines: Sembla que així es contribuiria a la selecció, en els primers moments del desenvolupament fol·licular, quan els nivells estrogènics produïts pel fol·licle dominant són massa baixos per frenar l'alliberació de la FSH.

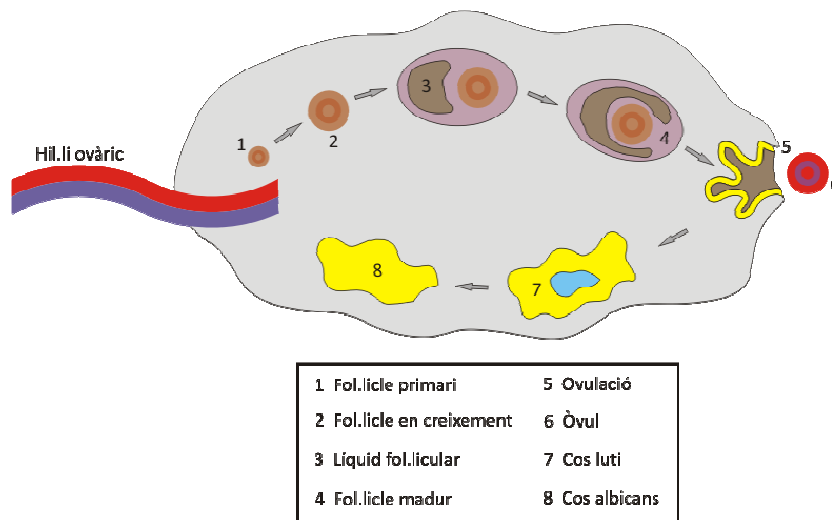
En aquest moment s'establiria el que Di Zerega i Hodgen, van definir el 1981 com l'assimetria ovàrica o fase unigonadal, que reflecteix la dominància d'un dels dos ovaris a través del fol.licle dominant i que continua fins al final de la fase lutea, moment en què es restableix la simetria ovàrica sense que cap d'ells domini, fins que en el cicle següent un nou fol.licle n'assumeixi la responsabilitat. Mentre no hi ha dominància, ambdós ovaris es comporten com una única unitat fol.licular a partir de la qual se'n realitzarà la selecció.

### ***1.1.2.b. El fol.licle preovulatori***

Un cop assolida la maduresa definitiva del fol.licle, aquest s'apropa a la superfície ovàrica, les cèl.lules de la granulosa augmenten de tamany adquirint inclusions lipídiques, i la teca es vacuolitza i vascularitza intensament. Sembla ser el propi fol.licle el que desencadena l'estímul ovulatori a través de la producció estrogènica. La FSH indueix sobre la granulosa, l'aparició de receptors de LH i la producció d'esteroides, els quals augmenten bruscament, i quan assoleixen un nivell basal de 200 pg/ml d'estradiol durant un mínim de 50 hores, produeixen un efecte de retroalimentació positiu que desencadena el pic ovulatori de LH. També en fase preovulatòria hi ha un augment de progesterona degut a la luteïnitzaació de les cèl.lules de la granulosa. Aquest fenomen s'observa 24-48 hores abans de l'ovulació i és fonamental per a la mateixa, degut a que potencia l'efecte de l'estradiol desencadenant el pic de LH i perquè sense la progesterona no apareix el pic de FSH que acompanya al de LH en el transcurs de l'ovulació. Les funcions d'aquest pic de FSH són contribuir a l'expulsió de l'ovòcit en el moment de l'ovulació i induir la formació d'un nombre adequat de receptors de LH en les cèl.lules de la granulosa per tal d'assegurar una adequada producció de progesterona durant la fase lútea. El pic de LH és el responsable de l'ovulació, unes 10-12 hores després del pic màxim, i 28-32 hores després de l'inici de l'ascens de la LH.

A nivell ovocitari podem dir que el desenvolupament complert dels ovòcits dóna lloc a dos estirps cel.lulars diferents: una és l'ovòcit secundari i l'altra el primer corpuscle polar. Unes 12 hores posteriors a l'ovulació, els ovòcits secundaris inicien la segona divisió meiòtica que aquest cop acabarà en metafase II, esperant a ser fecundat per tal de completar la segona divisió meiòtica i formar un segon corpuscle polar.

**Figura 3.** Fases de la fol.liculogènesi



**FOL.LICULOGÈNESI**

*Dibuix esquemàtic de les diferents fases de la fol.liculogènesi i la seva distribució en el còrtex ovàric.*

**1.1.2.c. Luteogènesi i luteolisi**

Després de l'ovulació el fol.licle es transforma en cos luti degut a una sèrie de canvis. Els capil.lars penetren en la làmina basal augmentant de forma significativa la vascularització, procés mediat per factors angiogènics fol.liculars, fet que permetrà l'arribada de colesterol LDL que serveix al cos luti de substrat per a la síntesi de progesterona. Al mateix temps, les cèl.lules de la granulosa es luteinitzen i juntament

amb les cèl.lules de la teca i l'estroma circumdant formen el cos luti. A partir dels 14 dies, en cas d'absència de gestació, comença la seva regressió transformant-se en cos albicans. La LH és la responsable del manteniment del cos luti, exceptuant quan es produeix la gestació. En la gestació, la HCG secretada pel trofoblast fetal manté la capacitat del cos luti de secretar progesterona fins que es realitza el recanvi luteoplacentari.

#### **1.1.2.d. Atrèsia fol.licular**

Tots els fol.licles que comencen el seu desenvolupament sense aconseguir fer-se dominants acaben en atrèsia, transformant-se en cossos fibrosos. Les cèl.lules tecals passen a l'estroma ovàric i responen a la LH amb la secreció d'andrògens durant la fase mitja del cicle. La secreció d'andrògens sembla actuar localment, induint l'atrèsia dels fol.licles que no hagin arribat a la dominància, i a nivell sistèmic, augmentant la líbido en la fase més fèrtil del cicle.

#### **1.1.3. Cicle endometrial**

Sota la influència de les hormones ovàriques estrogen i progesterona, l'endometri mostra una sèrie de canvis cíclics característics, indispensables per a l'adequada receptivitat endometrial. Morfològicament hi podem distingir dues capes: la capa funcional, que és la que experimenta predominantment els canvis cíclics i que es desprèn en el moment de la menstruació, i la capa basal que serveix d'element regeneratiu després de cada cicle.

Segons els canvis histològics que experimenta l'endometri, es pot dividir el cicle menstrual en tres fases: proliferativa, secretora i menstruació.

**1.1.3.a. Fase proliferativa**

Associada al creixement fol·licular ovàric i consegüentment a l'increment de la secreció d'estrògens. L'epiteli superficial es regenera ràpidament a partir de les glàndules, fins i tot abans que la descamació sigui completa. El gruix augmenta ràpidament de 1 a 3 mm, en relació a la concentració plasmàtica d'estrògens, bàsicament a expenses de les glàndules que al principi són estretes, rectilínies i revestides per un epiteli cúbic monoestratificat. Les mitosis són escasses. A partir del dia 10-13 del cicle les glàndules són més nombroses, la llum s'eixampla, el seu epiteli s'eleva, i les cèl·lules tenen nuclis allargats d'aparença pseudoestratificada degut a la col·locació dels nuclis a diferent alçada. Cap al desè dia, l'estroma s'edematitza per la incorporació d'ions, aigua i aminoàcids i les seves cèl·lules adquireixen límits poc clars amb nuclis més densos. Atravessant l'estroma, els vasos espirals s'extenen immediatament per sobre de la superfície de l'epiteli glandular formant una red capil·lar laxa. Les seves cèl·lules endotelials comencen a expressar, entretant, receptors estrogènics.

La proliferació de cada un dels components del teixit endometrial (glàndules, cèl·lules de l'estroma i cèl·lules endotelials) està marcada per l'augment de l'activitat mitòtica i l'increment d'ADN nuclear i ARN citoplasmàtic. Les concentracions intranuclears de receptors d'estrògens i progesterona assoleixen un pic a la meitat del cicle, prèviament a l'ovulació.

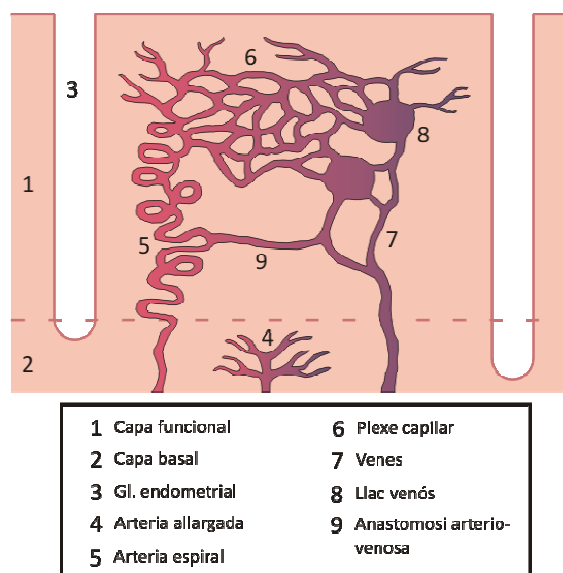
**1.1.3.b. Fase secretora**

Després de l'ovulació l'endometri mostra certa sensibilitat a l'acció combinada dels estrògens i la progesterona. El gruix endometrial no es modifica a partir del màxim preovulatori (5-7 mm), tot i prosseguir la influència estrogènica.

Aquesta estabilització sembla ser induïda per la progesterona i està associada a un decliu en les mitosis i síntesis d'ADN degut a la interferència de l'expressió de

receptors d'estrògens i l'estimulació per la progesterona de la 17-beta-hidroxiesteriode-deshidrogenasa i sulfotransferasa, que converteixen l'estradiol en sulfat d'estrona que és ràpidament excretat per la cèl.lula. Cap al dia 21 del cicle l'estroma està impregnat en una substància fonamental rica en polisacàrids, i els vasos s'han diferenciat formant espirals en resposta als esteroides sexuals, les prostaglandines i els factors autocrins i paracrins produïts en resposta a estrògens i progesterona. El procés de decidualització comença en la fase lutea sota la influència de la progesterona. Les cèl.lules deciduais produeixen una sèrie de substàncies com la prolactina, relaxina, renina i factors de creixement 'insulin-like'. Els estrògens entretant van sensibilitzant les cèl.lules de l'estroma. En els dies 27-28 del cicle l'estroma disminueix el seu espessor i l'endometri es decidualitza. Les arterioles espirals obstrueixen mecànicament la circulació sanguínea i es degeneren creant l'estasi premenstrual.

**Figura 4.** Histologia de l'endometri



#### HISTOLOGIA ENDOMETRIAL

*Dibuix esquemàtic de la histologia de l'endometri de la dona en edat fèrtil.*

### **1.1.3.c. Fase menstrual**

En absència de fertilització i implantació es produeix la involució del cos luti i baixen els nivells d'estrògens i progesterona. Això determina una reacció vasomotora i el col.lapse a nivell de les arterioles espirals i la consegüent menstruació. El contingut de prostaglandines PGF-2 $\alpha$  i PGE2 en l'endometri secretor assoleix els nivells màxims durant la menstruació.

## **1.2. FECUNDACIÓ *IN VITRO* (FIV)**

Com ja s'ha exposat a l'inici de la introducció, l'adequat funcionament de la fisiologia genital és tan important com els factors metodològics de cares a maximitzar el rendiment de les tècniques de reproducció assistida. A continuació definirem en què consisteix i de quines fases consta el tractament de fecundació *in vitro* (FIV).

La FIV és una tècnica de reproducció assistida que està indicada en parelles amb fallada de tractament d'inseminació artificial, endometriosis severa, obstrucció tubàrica bilateral i factor masculí sever, entre d'altres.

El protocol amb antagonista és el que s'ha seguit en aquest treball, i consta de varies etapes:

- *Estimulació hormonal ovàrica*: Tractament amb preparats que contenen FSH  $\pm$  LH recombinant/urinària purificada, d'administració subcutània diària que s'inicia durant el segon-cinquè dia del cicle menstrual amb la finalitat d'hiperestimar els ovaris. En els protocols d'estimulació, la dosi inicial utilitzada es determina tenint en compte diferents paràmetres com l'edat de la pacient, els índexs hormonals basals, l'índex de massa corporal, la valoració ecogràfica basal de fol.licles antrals i la resposta en cicles d'estimulació previs. Pel que fa a la frenació hipofisària s'utilitzen antagonistes de la GnRH. Aquesta fase es realitza sota control ecogràfic a dies alterns, i ocasionalment analític (determinació



d'estradiol) abans de la inducció de l'ovulació. Acostuma a tenir entre 10 i 12 dies de durada.

- *Inducció de l'ovulació:* Un cop s'ha assolit l'estimulació òptima del desenvolupament fol·licular s'administren 250 µg de coriogonadotropina subcutània o bé 5000-7500 UI de HCG intramuscular que gràcies a la seva acció LH, i simulant el pic fisiològic, produeix la represa de la meiosi ovocitària, el trencament fol·licular, la formació del cos luti i la producció de progesterona i estradiol pel cos luti. L'ovulació també es pot desencadenar, en aquest tipus de protocol, administrant anàlegs agonistes de la GnRH.
- *Punció fol·licular:* Es realitza a quiròfan sota sedació. Consisteix en la punció transvaginal ecoguiada dels fol·licles ovàrics estimulats i l'aspiració del corresponent líquid fol·licular que es manté en condicions estèrils i a temperatura corporal per tal d'evitar-ne la seva degradació. En el líquid fol·licular emmagatzemat al laboratori, els embriòlegs hi identificaran els òvuls que posteriorment s'inseminaran.
- *Inseminació:* En el moment de la punció fol·licular la parella de la pacient obté una mostra d'esperma, de la qual se seleccionaran els espermatozous per a fecundar els ovòcits. La inseminació es pot realitzar mitjançant dues tècniques diferents.
  - Fecundació *in vitro* (FIV): Consisteix en posar en contacte els oòcits obtinguts amb una quantitat adequada d'espermatozous per tal que segueixin el curs natural de la fecundació.
  - Microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozous (ICSI): Mitjançant un micromanipulador s'introdueix un espermatozou dins de cada òvul. Els espermatozous es poden obtenir de l'ejaculat o d'una biòpsia de testicle en cas que en l'ejaculació no hi hagi espermatozous suficients, o bé que aquesta no sigui possible.

- *Cultiu embrionari*: 24 hores posteriors a la inseminació s'identifiquen els òvuls fecundats, que ja reben el nom d'embrions. Aquests embrions romandran en cultiu durant 48-72 hores per tal d'afavorir la divisió embrionària.
- *Transferència embrionària*: 2-5 dies després de la punció es dipositen 1 ó 2 embrions a nivell endometrial per via vaginal, mitjançant un catéter. Es realitza amb l'ajuda d'una ecografia en un procés indolor per a la pacient. Posteriorment es recomana un repòs absolut d'uns 30 minuts per tal d'evitar moviments en la bombolla endometrial que s'origina després de la transferència.
- *Congelació embrionària*: Els embrions que no es transfereixen romanen congelats en el banc del laboratori fins que són novament requerits.

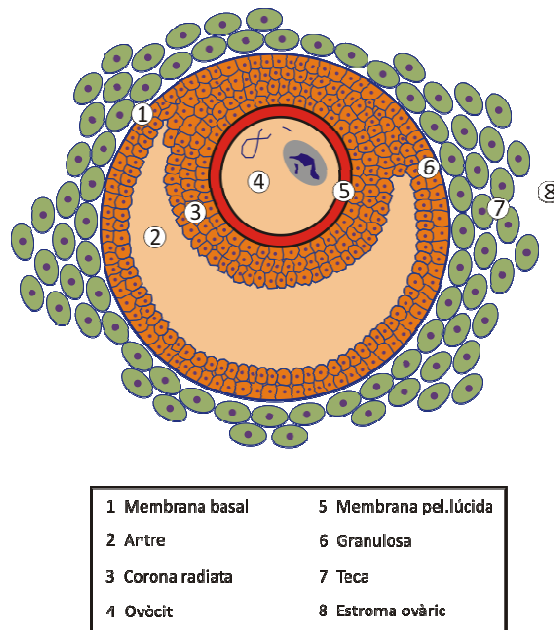
### **1.3. PARÀMETRES DE RESPOSTA. EXPRESSIÓ DE *GREM1*, *HAS2* I *PTGS2***

Com s'ha descrit anteriorment, els fol·licles preovulatoris estan constituïts, a part de l'estructura oocitària, per dues subpoblacions de cèl·lules de la granulosa que inclouen les cèl·lules murals i les cèl·lules del cúmul. Les cèl·lules de la granulosa murals, adherides a la membrana basal del fol·licle i adjacents a les cèl·lules de la teca, expressen gens importants per la ruptura del fol·licle. Les cèl·lules del cúmul, que romanen properes a l'oòcit durant el desenvolupament fol·licular i l'ovulació, són mediadores de les senyals paracrines de l'oòcit i del seu potencial de desenvolupament, facilitant-li funcions com per exemple el metabolisme dels carbohidrats. Aquestes funcions són essencials pel desenvolupament oocitari i pel procés de fertilització (Matzuk *et al*, 2002). En el període periovulatori, les cèl·lules del cúmul s'expandeixen per formar la *corona radiata* en resposta al pic de LH (o a la HCG exògena). Durant l'expansió, les cèl·lules

del cúmul secreten àcid hialurònic, que adhereix l'òocit amb el cúmul facilitant l'extrusió fol·licular, la captura de l'òvul per part de les fímbries tubàriques i la penetració i fertilització per part de l'espermatozou (Salustri *et al*, 1996).

L'edat de la dona avançada afavoriria alteracions en l'expansió del cúmul, fet que disminuiria les qualitats estructurals de l'òocit traduint-se en una disminució de les capacitats reproductives.

**Figura 5.** Composició del fol·licle antral



#### FOL·LICLE ANTRAL

*Estructura, histologia i composició del fol·licle ovàric durant la fase d'antral.*

L'expansió del cúmul està regulada pel factor de diferenciació de creixement 9 (GDF9), membre de la superfamília dels factors de creixement (TGF- $\beta$ ) secretat per l'òocit. Al mateix temps, GDF9 sembla ser que indueix l'expressió de determinats

gens en les cèl·lules del cúmul, incloent *HAS2* i *PTGS2*, en presència de FSH (Gui *et al*, 2005) i *GREM1*. Aquests gens són coneguts per regular les senyals oocitàries i per tenir funcions importants en l'expansió i metabolisme del cúmul. Variants genètiques de *GDF9* s'han associat a síndrome de l'ovari poliquístic, fallada ovàrica prematura (Gilchrist, 2008), reserva ovàrica disminuïda i resultats pobres en FIV (Wang *et al*, 2010).

Alguns d'aquests gens crítics pel desenvolupament oocitari expressats pel cúmul, estan sota control de senyals derivades tant de l'oòcit com maternes i per tant, s'ha proposat que la seva expressió és representativa tant dels estadis de maduració de l'oòcit com de l'ambient matern.

L'aspecte morfològic de l'embrió, basat en el nombre i tamany de les cèl·lules, la multinucleació i la fragmentació, és l'eina clínica utilitzada habitualment per identificar l'embrió amb millor potencial per establir una gestació. L'habilitat d'un embrió per donar lloc a un nou-nat està relacionada amb la qualitat dels gamets dels quals prové, particularment de l'oòcit (Ebner *et al*, 2003) no obstant, els paràmetres morfològics donen poca informació sobre la competència oocitària.

L'expressió dels gens *HAS2*, *PTGS2* i *GREM1* en les cèl·lules del cúmul durant l'expansió s'han relacionat recentment, amb les seves característiques morfològiques i fisiològiques proporcionant un enfocament innovador per predir el potencial de desenvolupament dels embrions humans (McKenzie *et al*, 2004), (Cillo *et al*, 2007), (Gebhardt *et al*, 2011), (Adriaenssens *et al*, 2011). Segons això, l'adquisició de la competència de l'oòcit seria, en part, dependent de la funció de les cèl·lules del cúmul.

El gen *PTGS2* codifica l'enzim ciclooxigenasa2 (COX2), que sintetitza prostaglandines. L'expressió de *PTGS2* en cúmuls bovins i primats participaria en la sincronització de la maduració i la qualitat oocitària (Calder *et al*, 2001), (Srois *et al*, 2004), (Duffy *et al*, 2005). També s'ha associat a morfologia embrionària (McKenzie *et al*, 2004). En rates, el gen *PTGS2* i la seva prostaglandina resultant (PGE2) faciliten l'expansió del

cúmulo mitjançant la inducció dels gens de la seva matriu, essent importants per la seva supervivència. Segons aquestes dades, Gebhardt (Gebhardt, 2011) ha afirmat que el paper del gen PTGS2 seria per tant, el de promoure l'expansió del cúmulo i la competència oocitària.

GDF9 també indueix l'àcid hialurònic sintasa 2 (HAS2) en les cèl·lules del cúmulo, que estimula la producció d'àcid hialurònic tenint un paper rellevant en l'expansió del cúmulo.

GREM1, un altre gen regulat a través de GDF9 inhibeix selectivament la senyalització de la proteïna morfogènica òssea (BMP), fet que facilitaria la luteïtzació de la granulosa mural, permetent al mateix temps l'expansió del cúmulo (Pangas, 2004). L'expressió de *GREM1* en cèl·lules de la granulosa prediria 3 paràmetres: maduresa, potencial de fertilització i qualitat embrionària (Mc Kenzie *et al*, 2004), (Cillo *et al*, 2007), contribuint a una millor formació del blastocist i a una major taxa de gestació, estadísticament no significativa. Jindal *et al* han demostrat (Jindal *et al*, 2012) que l'expressió de *GREM1* està 3.08 vegades disminuïda en dones amb reserva ovàrica compromesa respecte els controls.

Segons aquestes dades, el potencial fèrtil dels oòcits i per tant, dels embrions humans, seria un reflexe de l'expressió gènica de les cèl·lules del cúmulo.

Pel que fa a l'expressió d'aquests gens a nivell vaginal, cervical i endometrial se sap que el plasma seminal indueix la transcripció de PTGS2 de manera dosi-depenent en les seves cèl·lules epitel·lials (O'Leary, 2004), essent el seu producte, PGE2, el principal responsable dels canvis inflamatoris en aquests teixits. Aquesta seqüència s'ha demostrat en biòpsies (postcoitals) cervicals i endometrials humanes, creient que forma part de la resposta inflamatòria necessària per activar les adaptacions immunològiques requerides per la promoció de la fertilitat (Sharkey, 2007). A més, les prostaglandines endometrials són mediadors importants en el procés de la decidualització i en l'augment de la permeabilitat vascular endometrial durant la implantació. Les disrupcions en el gen de la COX-2 (PTGS2) en rates, han donat com a

resultat múltiples errors en els processos reproductius, incloent l'ovulació, fertilització, implantació i decidualització (Lim *et al*, 1997).

En relació als gens HAS1, HAS2 i HAS3 a nivell de la cèrvix uterina, se sap que promouen la síntesi d'àcid hialurònic a través de l'enzim àcid hialurònic sintasa. L'àcid hialurònic és el glicosaminoglicà més abundant en els teixits i fluids del tracte reproductor. Aquest pot formar grans estructures que promouen l'augment de la viscositat, la hidratació i els canvis de la matriu cel.lular afavorint la maduració i la dilatació cervical durant el treball de part. Els nivells d'àcid hialurònic cervicals augmenten del 19% (del total de glucosaminoglicans) en la gestació incipient, al 71% en la gestació a terme. El gen HAS2 està en part regulat pels estrògens, i durant el període de dilatació, gran part del contingut d'àcid hialurònic cervical en humans prové de l'expressió augmentada de mRNA de HAS2 (Akgul *et al*, 2012).

A nivell endometrial, Raheem *et al* (Raheem *et al*, 2013) han demostrat un augment significatiu de l'expressió de HAS2 durant la fase proliferativa en relació amb la fase secretora, suggerint que les altes dosis d'estradiol durant la fase fol.licular estimularien l'expressió de HAS2, mentre que les altes dosis de progesterona durant la fase luteínica regularien a la baixa la seva expressió.

El gen *GREM1* està sobreexpressat en l'endometri eutòpic de dones amb endometriosi. Aquest tindria una activitat proangiogènica que contribuiria sinèrgicament a la promoció de la proliferació i a la inhibició de l'apoptosi, facilitant la invasió peritoneal de l'endometri ectòpic via paracrina. Fins el moment actual no es coneix la publicació de cap article que revisi aquest gen com a factor involucrat en la receptivitat endometrial.

## 1.4. EIX HIPOTÀLEM-HIPÒFISI-TIROÏDAL

L'adequat funcionament hormonal és indispensable tant pel desenvolupament i la funció sexuals, com per la gametogènesi. Així com les hormones sexuals tant proteiques com esteroïdals estan considerades les principals responsables de l'activitat genital, hi ha altres sistemes hormonals que també participen en la seva regulació.

Un dels sistemes que participen activament en el procés reproductiu és el tiroïdal, amb un intrincat d'actuacions a nivell perifèric, cel.lular i tissular altament complex, com es veurà a continuació.

### 1.4.1. Regulació central de la funció tiroïdal

La tirotropina ó TSH (thyroid-stimulating hormone) és l'hormona glicoproteica determinant de la funció tiroïdal. La sintetitzen i secreten les cèl.lules tirotropes de la glàndula pituitària anterior, controlades en part per l'hipotàlem via TRH (tirotropin releasing hormone) i per altres mol.lècules. L'hipotàlem exerceix un control estimulador sobre la funció tiroïdal a través de la mediació de la TSH. Aquest control és dut a terme per la TRH, un tripèptid produït per neurones hipotalàmiques i transportat a través dels seus axons cap a nervis terminals en l'eminència mitja de l'hipotàlem on s'allibera cap a la sang portal hipofisària. En resposta a l'estimulació per la TSH, la glàndula tiroide secreta dues hormones, la tiroxina i la triiodotironina, anomenades habitualment T4 i T3, que exerceixen un efecte profund sobre el metabolisme de l'organisme.

Un component clau en l'eix hipotàlem-hipofisari-tiroïdal és l'acció inhibidora de les hormones tiroïdals circulants. Aquesta acció s'exerceix primàriament sobre les cèl.lules tirotropes però també en menor grau sobre les neurones hipotalàmiques alliberadores de TRH. Addicionalment, una gran varietat de moduladors secundaris

tenen control sobre la secreció de TSH, el resultat del qual és el manteniment de la secreció adequada d'aquesta hormona i per tant, d'hormones tiroïdals. Aquests moduladors secundaris són la somatostatina i la dopamina, que contribueixen a la inhibició de la funció dels tiròtrofs i les vies alfa-adrenèrgiques que són en general, estimuladores. Altres moduladors de la funció tiroïdal inclouen les hormones glucocorticoides, el pèptid derivat de l'adipòcit leptina, varies citoquines i altres mediadors inflamatoris. Addicionalment a les seves accions sobre els tiròtrofs, la TRH pot tenir un paper important en l'estimulació de l'alliberació de prolactina (PRL), d'hormona del creixement (GH) en determinades circumstàncies, i d'hormona adrenocorticotropa (ACTH) en alguns pacients amb Sd. de Cushing.

#### **1.4.2. Producció i transport plasmàtic de les hormones tiroïdals**

La glàndula tiroide secreta tant T4 com T3. La secreció de T4 és unes 20 vegades superior a la de T3. Quantitats substancials de la T4 secretada són metabolitzades a T3 en la circulació perifèrica. No obstant, la ratio plasmàtica T4/T3 és propera a 60/1, reflectint una major taxa de depuració de T3. Tant la T4 com la T3 estan unides a proteïnes plasmàtiques circulant poca quantitat d'hormona de forma lliure. Les concentracions lliures estimades de les dues formes d'hormones tiroïdals són  $2 \times 10^{-11} \text{M}$  per la T4 i  $6 \times 10^{-12} \text{M}$  per la T3. La T3 és més activa que la T4, de forma paral·lela a la seva afinitat pels receptors nuclears.

En humans, només el 0.02% de la T4 i el 0.2% de la T3 circulen en sang de forma lliure. En condicions fisiològiques, al voltant del 75% de la concentració de T4 circulant total és transportada per TBG (Thyroxine-Binding Globulin), amb 10-15% unida a la TTR (Transthyretin) i 10-15% a l'albumina. Una fracció menor de T4 i T3 circulants van associades a lipoproteïnes.

La fracció lliure de T4 i T3 circulant determina l'acció hormonal i l'eliminació, així com el feedback sobre la secreció pituïtària de la TSH. El fet que les concentracions



d'hormona total variïn àmpliament en resposta a diferents patrons d'hormona transportadora mentre es mantenen relacions relativament constants d'hormona lliure, dóna suport a aquesta hipòtesi. Concentracions de proteïna transportadora poden variar per motius independents a l'estatus tiroïdal. Quan la concentració de TBG varia, les concentracions totals de T4 i T3 es modificaran per restablir la concentració preexistent d'hormona tiroïdal lliure, tal i com ve determinat per la relació de feedback amb la TSH. La unió a les proteïnes plasmàtiques és no covalent i ràpidament reversible. Cal remarcar que la fracció més gran de l'hormona lligada té funció de reserva. La dissociació de l'hormona lligada gairebé instantàniament restableix la concentració d'hormona lliure, mentre que aquesta fracció és captada pel teixit o depurada irreversiblement.

#### **1.4.3. Transport intracel.lular de les hormones tiroïdals**

La qüestió sobre com l'hormona tiroïdal plasmàtica entra a la cèl.lula i va guanyant accés cap als receptors nuclears, ha rebut una atenció considerable. A jutjar per l'estructura lipofílica de l'hormona tiroïdal es va creure durant molts anys que aquesta entrava a la cèl.lula per difusió passiva. El 1986 Hennemann va evidenciar el transport facilitat a través de la membrana plasmàtica. Posteriorment es va afirmar que existien transportadors hormonals tiroïdals i que l'activitat dels mateixos determinaven en part, la concentració intracel.lular d'hormona tiroïdal. En relació a aquest fet s'ha demostrat, mitjançant tècniques de dilució isotòpiques, que hi ha 58 vegades més quantitat de L-T3 i 4 vegades més de D-T3 en el nucli que en el citosol cel.lular (Oppenheimer, 1985).

En els diferents teixits hi ha grans diferències en el gradient de concentració hormonal tiroïdal a través de la membrana nuclear i plasmàtica, suggerint que aquest procés alteraria el repartiment hormonal en els diferents teixits diana. Aquest sistema sofisticat de regulació juntament amb el fenomen de la deiodització, permet a les cèl.lules i als teixits rebre la quantitat apropiada d'hormona tiroïdal en el

moment adequat, de forma independent als nivells hormonals tiroïdals sèrics protegint-se de les variacions hormonals perifèriques.

Com s'ha avançat anteriorment, s'ha demostrat que la captació cel.lular de T4 i T3 està mediada per transportadors específics. Alguns d'ells són els membres de la família dels transportadors d'anions orgànics (OATP) (Abe, 1998). Els OATP comprenen una gran família de transportadors responsables del transport transmembrana independent de Na<sup>+</sup>, de components orgànics amfipàtics, com les hormones tiroïdals, esteroïdals i nombroses drogues. S'han identificat uns 40 OATP diferents. Aquesta família consta de grans proteïnes d'uns 652-848 aminoàcids, amb 12 dominis de transmembrana. La majoria d'elles s'expressen en múltiples teixits de forma específica.

Altres transportadors hormonals tiroïdals són el polipèptid cotransportador de Na<sup>+</sup>/taurocolat (TCP) (Friesema, 1999) així com membres de la família de transportadors aminoàcids heterodimèrics (HAT) (Friesema, 2001).

Una altra família de transportadors hormonals tiroïdals és la dels transportadors monocaReproductive biomedicine onlinexilat vinculats a protons (MCTs) que juguen un paper important en el metabolisme energètic muscular i cerebral.

L'activitat d'aquests transportadors en qualsevol teixit sembla ser un factor clau en la determinació de l'efecte de la concentració sèrica de T3 sobre els nivells de T3 intracel.lulars. T4 també és activament transportada a l'interior de les cèl.lules, però més enllà de l'activitat dels transportadors, la seva contribució als nivells de T3 intracel.lulars també ve determinada per les variacions de l'activitat de la D2 intracel.lular.

La T4 exerceix a més, una sèrie d'efectes no mediat per receptors nuclears a nivell de la membrana cel.lular, citoesquelet o a nivell intracel.lular.

#### 1.4.4. Mecanismes d'acció de l'hormona tiroïdal. Receptors tiroïdals

La T3 s'uneix als seus receptors amb una afinitat de 10 a 15 vegades superior que la T4. Les constants de dissociació pels receptors nuclears hepàtics mesurats in vitro són  $2 \times 10^{-9} \text{M}$  per la T4 i  $2 \times 10^{-10} \text{M}$  per la T3. Aquestes característiques d'unió condicionen que poca hormona circulant estigui unida als seus receptors. No obstant, els receptors nuclears estan saturats en aproximadament el 75% per hormona tiroïdal en cervell i pituïtària, i 50% en ronyó. El fet que els receptors no estiguin completament ocupats en la majoria de teixits condiona que canvis en els nivells hormonals tiroïdals alterin l'activitat del seu receptor.

Les hormones tiroïdals tiroxina (T4) i triiodotironina (T3) tenen multitud d'efectes fisiològics, exercint accions en tots els teixits i actuant sobre la majoria de les vies metabòliques. Les accions fisiològiques de les hormones tiroïdals es poden dividir en dues grans categories: efectes en la diferenciació i desenvolupament, i efectes en les vies metabòliques. Òbviament, aquestes dues accions estan interrelacionades de tal forma que per a que hi hagi alteracions en el creixement i desenvolupament calen canvis concomitants en el metabolisme. De forma similar, canvis en la diferenciació cel·lular poden donar lloc a alteracions de patrons d'expressió gènica, de tal manera que poden influir sobre les vies metabòliques.

En adults, els efectes principals de les hormones tiroïdals es manifesten per modificacions metabòliques, incloent canvis en el consum d'oxigen i en el metabolisme de les vitamines, lípids, carbohidrats i proteïnes. Les hormones tiroïdals també alteren la taxa de síntesi i degradació d'altres hormones i factors de creixement, influenciant altres vies endocrines. Les característiques clíniques de l'hipotiroïdisme i l'hipertiroïdisme recorden que les hormones tiroïdals tenen efectes que reflecteixen les seves accions sobre diferents vies i òrgans diana. Com s'ha mencionat, una de les accions hormonals tiroïdals reconeguda com a principal és l'alteració del consum d'oxigen. Clínicament, aquest aspecte de l'acció hormonal tiroïdal constitueix la base per a la determinació de la

taxa metabòlica basal (TMB), que està reduïda en l'hipotiroïdisme i augmentada en l'hipertiroïdisme. La mesura del consum d'oxigen en teixits individuals ha permès crear un índex d'òrgans que són diana pels efectes metabòlics de les hormones tiroïdals. El consum d'oxigen està augmentat per l'hormona tiroïdal en el cor, múscul esquelètic, fetge, ronyó i òrgans gastrointestinals, mentre que melsa, cervell i gònades són metabòlicament menys responedors. Les causes de la resposta metabòlica variable en els diferents òrgans encara no es coneixen completament. Cada un d'aquests teixits depèn del metabolisme aeròbic i conté els enzims necessaris per augmentar el consum d'oxigen. Aquesta variabilitat de resposta es deu en part a la composició dels receptors hormonals tiroïdals.

Les hormones tiroïdals desencadenen els seus efectes genòmics clàssics interactuant amb receptors específics de les cèl·lules dels teixits diana. Com s'ha vist, la majoria dels seus efectes estan mediat per l'hormona tiroïdal activa T3 a través de mecanismes d'acció mediat per receptors en el compartiment nuclear o mitocondrial implicant la modulació o transcripció dels gens nuclears o mitocondrials.

Varis autors han demostrat la localització nuclear dels TR (Evans, Kirkland i Mukku, 1983). Aquests modulen la transcripció unint-se a llocs del DNA coneguts com 'elements de resposta tiroïdal' (TREs) (Goglia, 1999). També s'ha demostrat la localització dels TR en la mitocondria (Morel, 1996) exercint aquests un paper major en la regulació de la biogènesi mitocondrial i interferint en la proliferació, diferenciació, maduració i regulació de l'expressió gènica mitocondrial, incrementant l'estat d'equilibri dels nivells de RNAm mitocondrials, la respiració, l'activitat enzimàtica i la síntesi proteica (Mutvei, 1989).

El temps de resposta genòmica a l'estimulació hormonal tiroïdal varia d'hores a dies (Aranda i Pascual, 2001). Alguns efectes hormonals tiroïdals succeeixen en pocs minuts (s'anomenen resposta no genòmica), i s'associen a vies de senyalització amb missatgers secundaris, com la proteïn quinasa mitogen-activada (MAPK) (Losel i

Wehling, 2003). La tiroxina promou aquests efectes unint-se a la superfície cel·lular i activant els complexos MAPK, en particular el ERK en el cas del receptor hormonal tiroïdal  $\beta$ 1. L'efecte de la T4 sobre la fosforilació de MAPK i la subseqüent activació de TR $\beta$ 1 es fa efectiu als 10 minuts i assoleix el seu pic màxim d'activitat als 30-40 minuts (Davis, 2000).

El nombre de receptors tiroïdals (TR) per nucli és relativament baix. No obstant, teixits com l'adenohipòfisi i el fetge, molt responedors a l'hormona tiroïdal, contenen aproximadament 10.000 receptors per nucli. En general, hi ha una correlació entre el nombre de receptors i la resposta tissular a la T3, fet que s'ha corroborat pels índexs de consum d'oxigen.

#### **1.4.4.a. Estructura, expressió i isoformes dels receptors horminals**

Els DNAC dels receptors tiroïdals van ser clonats el 1986 per dos grups de forma independent i sense buscar-ho explícitament cap dels dos: Sap (Sap, 1986) i Weinberger (Weinberger, 1986). La troballa es va dur a terme per la gran homologia amb la seqüència de l'oncogen viral v-erbA. A més dels receptors tiroïdals, la superfamília de receptors relacionada amb v-erbA inclou els receptors d'estrògens, progesterona, glucocorticoides, mineralcorticoides, andrògens, vitamina D, àcid retinoic, així com multiplicitat de receptors nuclears orfes que pot ser que s'uneixin o no a lligands específics. Els membres d'aquesta família es caracteritzen per un domini central d'unió al DNA i un domini C-terminal d'unió a l'hormona. Les regions N-terminals són més variables entre les diferents classes de receptors, així com entre subgrups (TR $\alpha$  i TR $\beta$ ).

Els Receptors Hormonals Tiroïdals o **Thyroid Hormone Receptors** (RHT, THRs o TRs) són receptors nuclears de l'hormona tiroïdal T3 i factors de transcripció (TF) gènica. N'existeixen 2 classes amb un total de 6 isoformes: els **TR $\beta$**  (**c-erb-A $\beta$** ; TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, TR $\beta$ 3) codificats al cromosoma 3, regió p21; i els **TR $\alpha$**  (**c-erb-A $\alpha$** ; TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\alpha$ 3), al

cromosoma 17, regió q21. Cada un d'aquests receptors té una distribució específica depenent del teixit, i el seu nivell d'expressió es regula durant el desenvolupament (Hodin, 1990); per tant es distribueixen de forma diferent en els teixits adults (Forrest, 1990).

El TR $\alpha$  té funcions específiques en el cor, cervell, múscul esquelètic i contribuint en funcions reguladores de la temperatura en el greix marró. Els TR $\beta$  juguen un paper essencial en l'oïda interna, desenvolupament cerebel·lós i retinià, regulació hormonal tirotròpica, i intervenint en les accions metabòliques de la T3 en el fetge (Weiss, 1998). TR $\beta$ 1 té una expressió majoritària a cervell, ronyó i fetge, mentre que TR $\beta$ 2 ho fa principalment a adenohipòfisi, àrees específiques de l'hipotàlem, així com cervell, oïda interna i retina.

Tant els TR $\alpha$  com TR $\beta$  s'uneixen a T3 amb gran afinitat i reconeixen els mateixos llocs d'unió als elements de resposta tiroïdal (TRE), però alguns estudis han suggerit que els receptors tiroïdals  $\alpha$  i  $\beta$  tindrien diferent predilecció per determinats gens diana (Denver, 1999). Tots ells excepte el TR $\alpha$ 2, presenten un elevat grau d'homologia pel domini d'unió al lligant (T3); així mateix, tots menys el TR $\alpha$ 2 depenen del canvi conformacional derivat de la unió a lligant per dur a terme la seva funció com a factor de transcripció. La isoforma TR $\alpha$ 2, gràcies a l'*splicing* alternatiu del pre-mRNA de *c-erb-A $\alpha$* , perd una part de la informació del 9è exó i, amb ella, la capacitat d'unir-se a T3, tot i que la seva capacitat d'unió a les seqüències TRE no es veu afectada. D'aquesta manera, TR $\alpha$ 2 es converteix en un antagonista en funció per la resta de TRs en ser capaç d'unir-se a les mateixes seqüències que els altres però bloquejant l'efecte promotor (Zhang and Lazar, 2000). Aquesta isoforma s'ha proposat ser un inhibidor endogen de la funció del receptor tiroïdal, degut a que s'ha observat la disminució dels efectes metabòlics en els teixits on hi ha una alta expressió del mateix, com en cervell i testicle. Sembla ser que en els efectes inhibidors de  $\alpha$ 2 hi ha implicat més d'un mecanisme.

Una altra variant, el TR $\alpha$ 3 és similar a TR $\alpha$ 2 exceptuant que li manquen els primers 39 aminoàcids que es troben en l'única regió de TR $\alpha$ 2. Tampoc s'uneix a l'hormona, actuant com a antagonista dèbil in vitro, amb un paper desconegut in vivo.

Degut a que el gen *erbA $\alpha$*  dona lloc de forma majoritària, tant al receptor TR $\alpha$ 1 (activador) com al TR $\alpha$ 2 (el seu inhibidor específic), la regulació del processament de l'ARNm  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 constitueix un mecanisme important per modular la resposta a les hormones tiroïdals. Així doncs, l'equilibri entre TR $\alpha$ 1/TR $\alpha$ 2 és responsable de les variacions en la 'sensibilitat' d'hormona tiroïdal entre els diferents teixits. El rati TR $\alpha$ 1/TR $\alpha$ 2 és teixit específic i depèn de l'estatus de diferenciació cel.lular (Reyne, 1996; Hastings, 1997).

En contrast amb el gen TR $\alpha$ , les variants de l'splicing del gen TR $\beta$ , involucren el segment N-terminal del receptor. Una de les variants, la TR $\beta$ 2, s'expressa predominantment en hipotàlem, hipòfisi i còclea. La funció del fragment N-terminal del receptor tiroïdal no és gaire ben conegut, tot i que es creu que podria estar implicat en la modulació de la translació, interaccions amb altres proteïnes cel.lulars, expressió del promotor específic i control del turnover del receptor.

Segons Hodin i Satoh (Hodin *et al*, 1989) i (Satoh *et al*, 1996), les isoformes TR $\beta$ 1 i TR $\beta$ 2 funcionen de forma similar en la majoria d'assaigs d'expressió gènica. No obstant, s'han observat diferències en les activitats transcripcionals de TR $\beta$ 1 i TR $\beta$ 2 en certs gens diana. La importància de la isoforma TR $\beta$ 2 reflectiria la seva expressió per un promotor diferent, de tal manera que permetria patrons d'expressió i regulació únics. Com es descriu més endavant, l'expressió de TR $\beta$ 2 està regulada a la baixa per l'hormona tiroïdal, mentre que l'expressió de TR $\beta$ 1 no s'afecta o bé augmenta per l'hormona tiroïdal. D'aquesta manera, l'expressió del promotor TR $\beta$ 2 proporcionaria un nivell de regulació d'hormona tiroïdal addicional en teixits com hipotàlem i hipòfisi, implicats en el control de la TSH.

#### **1.4.4.b. Regulació de l'expressió del receptor hormonal tiroïdal**

La distribució del receptor tiroïdal en els teixits de l'adult ha estat avaluat en moltes espècies. En general, les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  del receptor es distribueixen àmpliament i exhibeixen patrons d'expressió solapats. Teixits amb poca expressió de receptors  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  com la melsa i el testicle, indiquen una mínima resposta metabòlica a l'hormona tiroïdal. La isoforma  $\alpha 2$  en canvi, s'expressa àmpliament en varis teixits, particularment cervell i ronyó.

L'expressió dels receptors tiroïdals en els mamífers està autoregulada per l'hormona tiroïdal, efecte que podria tenir conseqüències importants en la resposta biològica de la T3. L'hormona tiroïdal influeix en l'expressió de varis receptors tiroïdals, de forma diferencial i teixit específica. En la majoria de teixits la T3 provoca la disminució aproximada del 70% de l'ARNm de  $TR\alpha 1$  i  $TR\alpha 2$ , mentre que no interfereix en l'expressió de  $TR\beta 1$ . La regulació del receptor en la glàndula pituitària és diferent de la dels altres teixits. En aquesta glàndula, l'hormona tiroïdal multiplica per 3'4 vegades els nivells de  $TR\beta 1$ , disminueix un 43% els nivells de  $TR\beta 2$  i disminueix  $TR\alpha 1$  i  $TR\alpha 2$  un 22%.

#### **1.4.5. Expressió d'ADR $\beta 2$**

El receptor adrenèrgic  $\beta 2$  (ADR $\beta 2$ ), també conegut com adrenoreceptor  $\beta 2$ , és una proteïna integral de membrana que actua com a receptor beta adrenèrgic. El mateix terme també defineix al gen que codifica al receptor, localitzant-se en el cromosoma 5, en una regió molt propera al lloc de codificació del receptor adrenèrgic  $\alpha 1$ . Degut a la propietat de la T3 d'induir la sobreregulació tant dels  $\beta 1$  com dels  $\beta 2$ -adrenoreceptors (Viticchi *et al*, 1992) i a que els agonistes betaadrenèrgics regulen els mRNA dels receptors tiroïdals, indicant una regulació bidireccional (Shahrara, 2000), aquests receptors (ADR $\beta 2$ ) han estat considerats en el nostre estudi, com a marcadors adrenèrgics de la funció tiroïdal.



#### **1.4.6. Accions extranuclears de les hormones tiroïdals**

Tot i que està establert que la majoria d'accions hormonals tiroïdals estan mediades per l'alta afinitat dels receptors nuclears, s'està considerant l'acció hormonal tiroïdal sobre possibles llocs extranuclears. S'han descrit accions no genòmiques de les hormones tiroïdals en la membrana plasmàtica, el citoesquelet i la mitocòndria, però tot i així, i a diferència d'altres receptors hormonals esteroïdals, hi ha pocs receptors tiroïdals en el citoplasma.

#### **1.4.7. Les concentracions hormonals tiroïdals regulen els patrons i nivells d'expressió gènica**

Com s'ha vist, l'hormona tiroïdal s'uneix al receptor nuclear, que al mateix temps actua sobre elements de resposta hormonal tiroïdal en gens diana específics. Els receptors tiroïdals treballen conjuntament amb un gran nombre de proteïnes addicionals que potencien la seva unió al DNA i modulen la seva activitat transcripcional. Després de l'activació per l'hormona tiroïdal, el receptor provoca alteracions en l'expressió gènica, bé estimulants ó reprimint l'activitat transcripcional del gen diana. Aquests canvis en la transcripció gènica es reflecteixen per alteracions en els nivells de l'ARNm i subseqüentment, per canvis en la biosíntesi de proteïna.

Per norma general, els objectius de l'acció hormonal tiroïdal han estat analitzats mesurant l'estat d'equilibri de l'ARNm o dels nivells de proteïna. Aquestes mesures integren un nombre de passos biosintètics incloent la transcripció gènica, processament i estabilització de l'ARNm i l'eficiència translacional. L'hormona tiroïdal sembla ser que actua en cada un d'aquests passos. Per alguns gens, l'hormona tiroïdal afecta tant la transcripció com l'estabilitat de l'ARNm, causant relativament majors increments en l'estat d'equilibri de l'ARNm influint tant en la síntesi com en la degradació. Per altres gens, els efectes de l'hormona tiroïdal poden ser primàriament transcripcionals ó post-transcripcionals. Tot i que els efectes nets d'aquests esdeveniments són similars i augmenten la quantitat de proteïna sintetitzada, els

mecanismes i la cinètica són diferents. Els esdeveniments transcripcionals produeixen canvis ràpids en els nivells d'ARNm, mentre que els canvis en l'estabilitat de l'ARNm afecten al temps requerit per arribar a un nou estat d'equilibri, així com a la persistència de l'ARNm sintetitzat. En el model més senzill d'estimulació transcripcional, el receptor s'uneix directament a seqüències de DNA específiques en el promotor i indueix la transcripció mitjançant interaccions amb altres factors de transcripció en el promotor. Deleccions ó mutacions en llocs d'unió al receptor dins d'aquests gens eliminen ó redueixen substancialment la resposta hormonal tiroïdal. A diferència de la regulació transcripcional positiva, els mecanismes de la repressió transcripcional per part de les hormones tiroïdals és menys ben conegut. La regulació negativa induïda per l'hormona tiroïdal hauria de ser contrastada amb el procés de la repressió basal que succeeix amb els elements de resposta hormonal positius que estan inhibits en absència d'unió hormonal. La veritable regulació negativa és hormonodepenent. Per exemple, en l'hipotiroïdisme, l'expressió gènica de TSH $\alpha$  i TSH $\beta$  està molt augmentada. L'addició d'hormona tiroïdal causa repressió transcripcional de forma proporcional a l'ocupació del receptor per l'hormona.

Tot i aquests exemples de gens que estan regulats directament per receptors tiroïdals, la majoria de gens que responen a l'hormona tiroïdal poden ser regulats indirectament. Aquest concepte està recolzat pel fet que en alguns casos les cinètiques dels canvis en l'expressió gènica són relativament lents, requerint algunes hores. Els mecanismes indirectes de l'acció hormonal tiroïdal proporcionen un mitjà de gran abast per alterar els patrons d'expressió gènica. Si l'hormona tiroïdal en primer lloc causa la inducció d'un factor de transcripció o quinasa, aquesta proteïna pot al seu torn, alterar l'expressió de la cascada de gens addicional. De forma anàloga, l'hormona tiroïdal pot canviar patrons d'expressió gènica participant en el procés de diferenciació cel.lular. Més enllà, és possible que alguns efectes de l'hormona tiroïdal siguin directes, per exemple la transcripció, mentre que altres efectes estiguin mediat per una via indirecta, per exemple l'estabilitat de l'ARNm.

L'hormona tiroïdal també exerceix efectes indirectes a nivell fisiològic. Per exemple, en la rata estimula l'ARNm del factor de creixement insulín-like-1 (IGF-1). Alguns dels efectes de l'hormona tiroïdal sobre els enzims hepàtics impliquen interaccions complexes amb altres hormones. L'activació de les vies de la protein quinasa poden inhibir l'estimulació hormonal tiroïdal d'alguns enzims lipogènics. L'estat nutricional també té un efecte profund sobre la inducció dels enzims hepàtics per la T3. Per exemple, una dieta molt rica en carbohidrats amplifica els efectes de la T3 sobre la producció de glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa, augmentant els seus nivells fins a 40 vegades. Per la majoria de gens que responen a les hormones tiroïdals, el nivell d'activitat transcripcional integra algunes vies de senyalització addicionals a l'hormona tiroïdal. De fet, l'hormona tiroïdal sovint juga el paper de modulador que amplifica els efectes d'altres hormones. Aquesta regulació hormonal tan complexa reflecteix el gran nombre de vies de senyalització i factors de transcripció que regulen un gen determinat. Un gran nombre de gens ben caracteritzats han demostrat unir-se a una gran proporció de proteïnes reguladores en les seves regions promotores, addicionals als factors de transcripció basals que es requereixen per a que l'ARN polimerasa iniciï la transcripció.

#### **1.4.8. Metabolisme de les hormones tiroïdals**

La secreció de T4 i T3 des de la glàndula tiroïdal proporciona un punt d'ajust general per l'activitat d'aquest eix hormonal. No obstant, com en el cas d'altres hormones i en particular les del còrtex adrenal i gonadal, els mecanismes que governen la captació cel·lular i el metabolisme hormonal tiroïdal tenen una important influència en les concentracions plasmàtiques. Aquests processos pre-receptor també són determinants crítics pel nivell intracel·lular de T3 disponible per unir-se als receptors hormonals tiroïdals nuclears. El destí metabòlic de les hormones tiroïdals en teixits perifèrics serveix per tant, com un important mecanisme de control de l'acció hormonal tiroïdal.

El principal producte de secreció de la glàndula tiroïdal, T4, passa per una sèrie complexa de modificacions metabòliques intracel·lulars en els teixits perifèrics. Algunes d'aquestes reaccions, com la 5'-deiodització de la T4 per donar lloc a la T3 o la desaminació i desaminació de T3 per formar un anàleg de l'àcid acètic anomenat Triac, dona lloc a compostos amb major biopotència intrínseca, degut a la seva afinitat augmentada pels receptors hormonals tiroïdals. Altres reaccions donen lloc a la formació de components aparentment inactius, tal com la T3 reversa (rT3), formada per la 5-deiodització de la T4 o les formes sulfatada o glucuronitzada de la T4 i T3 formades per la conjugació del grup hidroxil de l'anell fenòlic. La deiodització progressiva de T4, T3 i rT3 comporta la formació de diverses tironines monoioditzades i diioditzades i finalment, de tironina (T0). Es creu que aquests compostos tenen poca o cap activitat biològica. Una excepció n'és la 3,5-diiodotironina (3,5-T2) i 3-3'-T2, que s'ha demostrat que tenen efectes sobre la funció mitocondrial.

A més de les reaccions de deiodització de reducció intracel·lular per part de les deiodinases, les hormones tiroïdals també són metabolitzades via modificació de la seva cadena lateral d'aminoàcids, conjugació del grup fenòlic OH- o oxidació del pont difenil-éter (Meinhold *et al*, 1991).

#### **1.4.9. Deiodització de la iodotironina**

En referència a la fisiologia tiroïdal a nivell tissular, ja fa més de 50 anys que Gross i Pitt-Rivers van demostrar que la T3 es considerava més potent que la T4 i que a més, estava present en quantitats més baixes en la glàndula tiroide (Pitt-Rivers *et al*, 1953). Dos dècades de recerca posteriors han confirmat la importància fisiològica de la 5' i 5 deiodització, responsable de la transformació de tiroxina en la seva forma més activa 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3). Gràcies a aquest fet s'han definit els paràmetres bioquímics d'aquestes reaccions enzimàtiques, s'han determinat els factors de regulació que influencien les activitats de les deiodinases i s'han identificat

les claus determinants de l'estructura de les proteïnes que catalitzen aquestes reaccions.

Mentre que les concentracions circulants de les hormones tiroïdals lliures controlades per l'eix hipotàlam-hipòfisi-tiroïdal són els majors determinants de la captació cel.lular de T4 i T3, l'activitat biològica de l'hormona tiroïdal està regulada a nivell tissular per les deiodinases de la iodotironina.

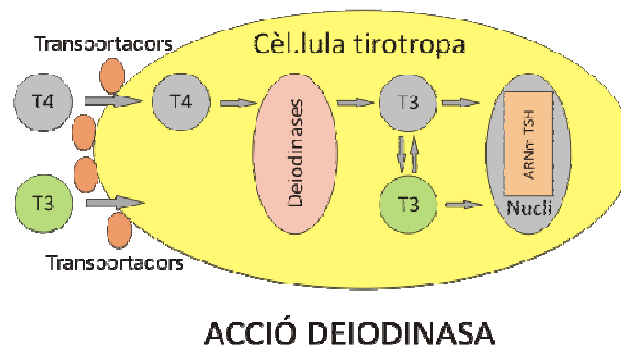
Les deiodinases són proteïnes de membrana que contenen selenocisteïna, un element crític per a l'activitat enzimàtica amb el seu *locus* actiu situat a nivell cel.lular citoplasmàtic, i que juguen un paper important en la regulació de la bioactivitat hormonal tiroïdal a nivell tissular.

Les seves accions locals contribueixen a incrementar o reduir les concentracions plasmàtiques i tissulars de T3 de forma que en condicions normals, fins a un 80% de la producció en un individu adult deriva de processos de teixits extratiroïdals. Curiosament, l'efector més potent per l'expressió de les deiodinases és la pròpia T3, actuant a través dels receptors TR $\beta$ 1 (Ammal *et al*, 2001).

Fins el moment actual s'han identificat 3 isoformes de deiodinases anomenades D1, D2 i D3. Totes elles difereixen en les seves propietats catalítiques, en els seus patrons d'expressió tissular i en els seus mecanismes de regulació, jugant cada una d'elles un rol fisiològic diferent (St. Germain, 1997). Les deiodinases estan localitzades en el reticle endoplasmàtic cel.lular, amb l'excepció de la D1 que es colocalitza en la membrana plasmàtica (Leonard, 1978). Les reaccions de deiodització 5' i 5', catalitzades per aquests enzims poden ser àmpliament considerades com processos para, auto i intracrins activadors i desactivadors respectivament. La disponibilitat hormonal tiroïdal local està modulada per reaccions de conjugació de l'anell fenòlic del grup 4'-OH de les iodotironines, que també inactiva les hormones tiroïdals.

Aquest sistema enzimàtic, juntament amb els corresponents transportadors de membrana, poden ser considerats com els 'guardes de les portes' de l'acció del receptor nuclear.

**Figura 6.** Activitat i lloc d'acció de les deiodinases



*Dibuix que mostra gràficament l'activitat de les deiodinases a nivell intracel·lular.*

#### **1.4.9.a. Característiques bioquímiques de les deiodinases i patrons d'expressió tissular**

La glàndula tiroïdal sintetitza i secreta L-tiroxina (T4, 3,3',5,5'-triiodotironina), prohormona posteriorment metabolitzada a la forma hormonal activa T3 per dos isoenzims, la 5'-deiodinasa tipus 1 (5'DI) i tipus 2 (5'DII) (Leonard, 1996). Mentre que la T4 no arriba ni s'uneix als receptors nuclears (ni mitocondrials) de la T3, la T3 i el seu producte de deiodització 3,5-T2, modulen l'activitat dels factors de transcripció dels receptors tiroïdals. Un altre isoenzim de les deiodinases, la 5-deiodinasa (5D o tipus III), inactiva la prohormona T4 via deiodització de l'anell tirosil donant lloc a rT3. D3 també elimina la T3 i el seu producte 3,5-T2 deioditzant novament l'anell tirosil.

Així doncs, la major part de l'hormona unida al receptor ho està en forma de T3, que prové tant de la circulació perifèrica com de la conversió de T4 per les 5'-monodeiodinases. En essència, aquestes són reductases que catalitzen la substitució d'hidrogen per iode en el substrat iodotironina. No se'ls han atribuït altres propietats catalítiques ni es coneixen altres enzims amb activitat deiodinasa. Els enzims, són notables en termes de la seva especificitat de substrat i la localització del iode eliminat.

Un tret intrigant de les deiodinases és el seu patró d'expressió tissular. La D1 es localitza majoritàriament en la glàndula tiroide, fetge, hipòfisi eutiroidea i ronyó, i té poca afinitat per T4. Altres teixits amb presència d'activitat de D1 són pulmó, intestí, múscul, melsa, placenta, glàndula mamària, teixit adipós blanc, limfòcits i glàndula salival (Leonard and Körle, 2006). La D1 és l'única que pot catalitzar tant la 5' com la 5-deiodització, depenent del substracte. La D1 pot extreure iodurs dels anells fenòlics de T4, T3, rT3, 3,3'-T2, 3',5'-T2 i 3'-T1, amb predilecció per  $rT3 > T4 > 3',5'-T2 > 3,3'-T2$ . Que la D1 sigui relativament ineficient convertint la T4 en T3 és una paradoxa considerable, donat que una proporció important de la producció de T3 té lloc en el fetge i en altres teixits que expressen D1. La D1 hepàtica produeix la majoria de T3 circulant (70%) sota condicions metabòliques normals i s'activa per l'hormona tiroïdal entre d'altres, fet que explica en part l'alta producció de T3 en la tirotoxicosi. Per tant, un dels papers de la D1 seria la inactivació de les hormones tiroïdals i els seus conjugats sulfatats en l'hipertiroïdisme.

La D2 només catalitza la 5'-deiodització i converteix de forma molt eficient T4 en T3. La seva funció principal és la producció de T3 intracel.lular a partir de la T4 circulant. La D2 s'indueix pels nivells baixos de T4 augmentant d'aquesta manera, l'eficiència de la producció de T3. La T3 formada d'aquesta manera és un substrat pobre per la 5'-deiodització i no és més metabolitzat per aquest enzim. En contrast, la T3 és un bon substracte per la D2 i per la D1. A diferència de la D1, l'activitat de la D2 s'inactiva ràpidament per nivells elevats de T4 o rT3, mentre que la T3 té efectes menors sobre la seva activitat. L'hipotiroïdisme augmenta la seva activitat estabilitzant la proteïna i

augmentant la seva vida mitja. Aquestes deiodinases requereixen la disponibilitat de cofactors tiol reduïts que provenen de reaccions catalítiques. Aquests presumiblement desplacen el iode des d'un enzim intermediari format durant la reacció i d'aquesta manera generen la deiodinasa activa. La D2 es troba fonamentalment en l'adenohipòfisi, placenta, pell, cervell i greix marró, on converteix la T4 en T3 com a un mecanisme per modular la concentració local de T3. També està present en cor, glàndula tiroide, múscul esquelètic (Salvatore, 1996) i en les cèl.lules estromals subendotelials on es triplica durant la gestació (Galton *et al*, 1999).

La regulació del feedback de la producció i secreció de TSH des de l'adenohipòfisi sembla ser el principal regulador de l'activació de la 'prohormona' T4 a T3. Per tant, la producció local de T3 a partir de T4 per part de D1 i D2 és essencial per la regulació del feedback negatiu (Larsen, 1981).

Com s'ha anomenat anteriorment, la iodotironina deiodinasa tipus 3 (D3) és l'inactivador fisiològic de les hormones tiroïdals, catalitzant la deiodització de la T4 a rT3, i de la T3 a 3,3'-diiodotironina (T2), ambdues inactives. Es localitza principalment en pell, placenta, fetge, intestins i cervell, augmentant la seva activitat en l'hipertiroïdisme i disminuint en l'hipotiroïdisme.

La D3 també s'expressa de forma significativa en tumors cerebrals humans, anomalies vasculars i determinades línies cel.lulars malignes.

El cervell és un dels pocs teixits que expressa les tres deiodinases, suggerint que el metabolisme hormonal tiroïdal en aquest teixit és intensament complex i potser dissenyat per mantenir un control estricte sobre els nivells hormonals tiroïdals cel.lulars.



#### **1.4.9.b. Inhibidors de les deiodinases**

A més de les diferències en les seves propietats catalítiques les deiodinases també presenten diferent susceptibilitat per determinats inhibidors. La més remarcable és la sensibilitat de la D1 al propiltiouracil (PTU). Aquest agent forma un complex inactiu amb la D1, unint-la covalentment al seu lloc actiu. La D2 i D3 tenen poca o cap susceptibilitat a la inhibició del PTU. El metimazol té molt poc efecte inhibitor sobre la deiodització. Els compostos àurics reaccionen amb el lloc actiu selenocisteïna en la glutatión peroxidasa i inhibeixen la seva activitat. Aquest compost també inhibeix les tres isoformes de deiodinases, sobretot la D1.

S'han descrit altres inhibidors no selectius de D2 i D3 en estudis experimentals, amb significat limitat fins el moment actual.

#### **1.4.9.c. Regulació de les deiodinases**

Les deiodinases estan regulades per múltiples hormones, factors de creixement i factors ambientals i nutricionals. Sobretot, entre aquests factors hi figuren les hormones tiroïdals. Les alteracions en l'estatus tiroïdal indueixen canvis profunds en l'activitat enzimàtica. Altres efectes reguladors importants en l'activitat de les deiodinases apareix en la glàndula tiroïdal, on la TSH i les immunoglobulines estimulants de la tiroide augmenten l'activitat de D1 i D2 en el teixit adipós marró, on l'exposició al fred estimula l'activitat de la D2; i en el fetge, on la privació nutricional i la diabetis disminueixen l'activitat de la D1.

## 1.5. LÍQUID FOL·LICULAR I FISIOLOGIA TIROÏDAL

El líquid fol·licular és un fluid extracel·lular complexe, groguenc i semi-viscós, diferent i únic per cada fol·licle, que s'acumula en l'antre dels fol·licles ovàrics en el curs del seu creixement. Constitueix un entorn favorable pel creixement i diferenciació de les cèl·lules fol·liculars així com per la maduració nuclear i citoplasmàtica dels oòcits. Intervé en el moment de l'ovulació afavorint el pas de l'oòcit a la trompa, i en el moment de la fecundació atraient l'espermatozou al lloc de la fecundació i estimulant-ne la reacció acrosòmica.

Com s'ha vist, la maduració oocitària és dependent de la composició del líquid fol·licular, havent de crear la concentració hormonal un entorn fisiològic òptim per l'oòcit. Mentre que altes concentracions d'estradiol (E2) s'associen a fol·licles sans amb contingut d'un oòcit capaç de dur terme la meiosi, altes concentracions d'andrògens desencadenen canvis atrèsics. S'ha demostrat que la ràtio entre E2 i andrògens en líquid fol·licular de fol·licles amb diàmetre superior a 6 mm sembla ser un dels paràmetres més precisos per distingir els fol·licles sans dels fol·licles atrèsics (Lefevre and Bomsel-Helmreich, 1981). Andersen també ha demostrat (Andersen, 1993) que el líquid fol·licular dels oòcits amb resultat de gestació en pacients sotmeses a FIV tenen una ràtio de  $E_2/T$  superior als dels oòcits que no ho fan.

Des de 1928 se sap que la concentració de iode en l'ovari és més alta que en qualsevol altre òrgan excepte a la tiroide. El descobriment recent del simportador de sodi-iode (NIS) en els ovaris ha ofert el possible mecanisme per la captació ovàrica de iode i altres similituds funcionals amb el seu homòleg tiroïdal. La importància de la capacitat excepcionalment elevada del teixit ovàric per a la captura de iode i l'acumulació en cèl·lules i líquid fol·licular en vivo segueix essent desconeguda i necessita estudis addicionals. Hi ha encara cert dubte sobre la presència d'un nivell òptim de iode elemental durant les etapes de desenvolupament dels fol·licles. Sembla ser que els fol·licles en creixement i els petits absorbeixen més de iode que els grans, essent l'acumulació de iode crucial per al procés de suport a la cèl·lula

granulosa. No obstant, no s'han demostrat interrelacions entre l'acumulació de iode en l'ovari i l'activitat de l'eix hipofisari-tiroïdal.

La presència d'hormones tiroïdals en el líquid fol·licular s'ha establert recentment. De Silva va publicar l'any 1994, nivells de TSH fol·liculars similars als sèrics en pacients estimulades amb HMG, i va concloure que aquests estaven augmentats en dones amb hipotiroidisme primari, havent demostrat uns anys abans que la TSH estimulava l'expansió del cúmul òofor en oòcits de rata cultivats. Wakim va ser el primer en demostrar el 1993, la presència de T4 i T3 en líquid fol·licular de dones estimulades per FIV. Va concloure que els valors de T4, T4L i T3 fol·liculars estaven dins dels paràmetres plasmàtics normals, que els diferents fol·licles de la mateixa pacient tenien concentracions similars d'hormones tiroïdals i que no hi havia correlació entre el volum aspirat i els valors hormonals fol·liculars.

Slebozinski va observar el 2005, concentracions menors de T4 i concentracions similars o superiors de T3 en líquid fol·licular d'animals mamífers respecte a les concentracions sèriques. No obstant, la fracció lliure de T3 va ser similar o menor a la plasmàtica en estudis fets per Wakim (Wakim *et al*, 1993) i Zhang (Zhang *et al*, 1997). Resumint els articles que s'han pogut revisar, els nivells de T3 intrafol·liculars difereixen dels nivells plasmàtics, essent els fol·liculars superiors, en la majoria dels estudis. La fracció lliure de la T3 en líquid fol·licular és similar o lleugerament inferior a la sèrica en pacients eutiroides.

L'origen de les proteïnes específiques del líquid fol·licular (hormones, factors de creixement, interleukines, etc.) difereix entre elles. Així com les concentracions intrafol·liculars de FSH i LH depenen de les concentracions circulants, les de GH i la prolactina depenen també de la producció local (Revelli, 2009). L'inhibina i l'activina, tanmateix, són produïdes per les cèl·lules de la granulosa reflectint-ne el nombre i activitat de les mateixes. La variació intergonadal dels nivells de T4 es deu, aparentment, als mateixos mecanismes pels quals passen la barrera hemàtica en altres teixits (Slebozinski *et al*, 2005). S'assumeix també que hi ha transportadors

específics, la família de transportadors monocaReproductive biomedicine onlinexilat (MCT), que facilitaria el pas d'hormones tiroïdals per l'endoteli capilar (Visser *et al*, 2007). Al mateix temps les concentracions relatives de proteïna total en el líquid fol.licular (Hess, 1998) també influirien en el procés.

Degut a les variacions intrafol.liculars d'hormones tiroïdals de T4 i T3 lliures i totals al llarg d'un cicle d'estimulació ovàrica realitzat en vaques, Ashkar va concloure el 2010, que l'estatus fisiològic dels fol.licles antrals bovins afectarien a l'acumulació de T4 total en el líquid fol.licular i que l'hiperestimulació ovàrica augmentaria els nivells circulants de T4 lliures i el contingut fol.licular de T4 total. Aquest estudi evidenciava que les concentracions fol.liculars de T4 total i lliure en dia 12, eren superiors a les del dia 5 d'estimulació. Sato postula en un article del 2001, que sota la influència dels estrògens fol.liculars, els fol.licles dominants estarien més vascularitzats i conseqüentment exposats a una major quantitat d'hormones tiroïdals circulants que els fol.licles subordinats. No obstant, Muller *et al*, l'any 2000 van observar una disminució dels nivells de T4 lliures després d'una hiperestimulació ovàrica controlada en humans.

Darrerament s'ha demostrat la presència del sistema ovàric 5'-monodeiodinasa en el líquid fol.licular capaç de generar T3 (a nivell ovàric) per deiodització de l'anell extern de T4. El significat fisiològic exacte d'aquest sistema generador de T3 i coexistent amb altres formes de receptors d'hormones tiroïdals en cèl.lules de la granulosa encara està per concretar. Com s'ha vist, en l'ovari, la 5'monodeiodinasa també coexisteix amb una gran varietat de receptors hormonals tiroïdals (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 i TR $\beta$ 2) en oòcits, cúmuls i cèl.lules de la granulosa. L'activitat de la 5'MD sembla ser que es correlaciona positivament amb els nivells de T4 sèrics, però no amb els de T3. No obstant, existeix una correlació entre els nivells de T3 fol.liculars i l'activitat de la 5' MD en el mateix compartiment.

Segons això es podria especular que l'existència de diferències entre concentracions sèriques i fol.liculars d'algunes fraccions d'hormones tiroïdals seria indicatiu del

transport selectiu que s'ha vist abans, juntament amb processos de deiodització intraovàrica.

En conclusió podem dir que el líquid fol·licular és un medi dinàmic, únic per a cada fol·licle i dependent del seu estatus metabòlic, la composició del qual és almenys tan complexa com la del sèrum.

## 1.6. FUNCIÓ TIROÏDAL I REPRODUCCIÓ

L'estatus tiroïdal, controlat per l'eix hipotàlem-hipofisari-tiroïdal, es troba freqüentment alterat en dones en edat reproductiva del nostre medi (4,6%-9,9% d'hipotiroïdisme subclínic vs 1,6% d'hipotiroïdisme establert) (Berbel, 2009). Tal i com s'ha mencionat amb anterioritat, la contribució de l'activitat tiroïdal sobre la fisiologia genital és indiscutible: tant l'hipo com l'hipertiroïdisme afecten al metabolisme esteroïdal sexual i la funció ovàriques, associant-se a irregularitats en el cicle menstrual, infertilitat i dificultat per mantenir la gestació.

Per datar-ne alguns exemples, Williams ja va demostrar l'any 1944, que el tractament amb drogues supressores de la funció tiroïdal produïen atròfia ovàrica i aturada de la maduració fol·licular; Dunn va publicar el 1976 que la tiroïdectomia produïa la disminució dels nivells plasmàtics basals de FSH i LH; i Brayshaw (Brayshaw *et al*, 1986) va suggerir que l'hipotiroïdisme lleu s'associava a la síndrome premenstrual en una significativa proporció de casos.

Podem afirmar també que l'hipotiroïdisme lleu, definit per l'elevació aïllada de TSH sèrica o per una exagerada resposta de la TSH a la TRH, s'associa a menorràgia (Wilansky, 1989), cicles anovulatoris i disfunció de la fase lútea. En casos d'hipotiroïdisme sever es pot observar la disrupció de la funció ovàrica normal (Krassas, 2000) donant lloc a ovaris poliquístics (Van Voorhis, 1994). En aquests

casos, defectes ovulatoris, hiperprolactinèmia i galactorrea són reversibles amb la teràpia substitutiva amb tiroxina.

A la disminució de la funció tiroïdal també se li ha atribuït la responsabilitat en determinats avortaments de repetició duplicant-se les probabilitats de presentar avortaments en casos d'hipotiroïdisme establerts (Winikoff, 1975).

Un altre indicatiu de la repercussió del sistema tiroïdal a nivell genital és la concentració de iode en els ovaris humans que, a part de ser la més alta després de la de la glàndula tiroide, sembla variar en funció de les diferents etapes reproductives: és baixa en la pre-adolescència i la post-menopausa, alta en els estadis de creixement fol·licular i disminuïda durant la gestació (Slebodzinski, 2005).

La precocitat puberal desencadenada per l'hipotiroïdisme sever, àmpliament reconeguda i reversible amb el tractament substitutiu, n'és un altre exemple. Tot i que l'associació entre hipotiroïdisme primari i precocitat sexual va ser descrita per primer cop el 1906 per Kendle, els seus mecanismes subjacents encara romanen desconeguts. S'han proposat varis mecanismes com a possibles causes de l'estimulació gonadal en pacients amb hipotiroïdisme, incloent:

- secreció augmentada de gonadotropines a conseqüència d'un solapament en el feedback negatiu de la TSH (Grumbach, 1960)
- augment de la sensibilitat ovàrica a les gonadotropines
- actuació de la TSH via receptor de FSH causant l'estimulació gonadal
- la hiperprolactinèmia que provoca augment de la producció estrogènica o de la secreció de gonadotropines

La falta de consens en els possibles mecanismes suggereixen una mancança en els coneixements de l'estimulació gonadal relacionada amb l'hipotiroïdisme (Suarez, 2007).

Tot i la gran varietat d'articles que deixen entreveure les interrelacions entre els dos eixos hormonal, hi ha pocs estudis que demostrin l'efecte directe de l'hormona tiroïdal sobre la funció ovàrica a nivell cel.lular. Un d'aquests és el que Maruo va publicar el 1987, que afirmava que la T3 semblava tenir una acció sinèrgica amb la FSH, i que no tindria per si sola, per induir la diferenciació de cèl.lules de la granulosa i la inducció de receptors de LH així com la d'enzims esteroïdals com l'aromatasa, en fol.licles ovàrics porcins. Ell mateix postulava que els transtorns menstruals apareguts durant els estats hipo o hipertiroïdals s'explicarien pels nivells inadequats de T3 disponibles a nivell de la cèl.lula de la granulosa. No obstant, Cecconi afirmava posteriorment (Cecconi *et al*, 1999) que la T3 inhibiria l'activitat aromatasa induïda per la FSH en cèl.lules de la granulosa. Els efectes de les hormones tiroïdals a nivell fol.licular també van ser avaluats per Spicer el 2001, mostrant que T4 i T3 contribuïen sinèrgicament amb la LH sobre la producció d'androstendiona per part de cèl.lules tecals bovines. Estudis addicionals també han suggerit que la T3 per se, té un impacte positiu sobre la producció de progesterona induïda per la FSH per part de les cèl.lules de la granulosa en fol.licles preovulatoris de gallines ponedores (Sechman, 2009), i que disminuiria l'expressió de LH hipofisària juntament amb la disminució de la producció d'estradiol per part de l'aromatasa.

El paper de l'habilitat de la T3 per modular l'activitat genital ha quedat doncs àmpliament documentat i no queda cap dubte de la seva repercussió en els esdeveniments endocrins, autocrins i paracrins que intervenen en l'esfera reproductiva. No obstant, els mecanismes exactes pels quals actuen encara estan per establir.

### **1.6.1. Receptors hormonal tiroïdals (TR) i reproducció**

Les primeres publicacions que fan referència a l'expressió de receptors tiroïdals a nivell ovàric daten de la dècada dels 80. El fet que les hormones tiroïdals, de forma sinèrgica amb la FSH, augmentessin l'activitat de la cèl.lula de la granulosa immadura

en porcs (en termes de diferenciació morfològica, augment de receptors de LH i inducció d'enzims esteroidals com l'aromatasa) (Maruo, 1987) va fer pensar en la possibilitat que aquestes cèl.lules disposessin de receptors tiroïdals. De fet, Wakim va ser el primer en descriure (el mateix any) la presència d'un grup de llocs d'unió d'alta afinitat per T3 en cèl.lules de la granulosa porcines.

L'expressió de RNA de erb-A en cèl.lules de la granulosa porcines va ser demostrada mitjançant tècniques de Northern blot per Maruo l'any 1992, conclouent que aquests eren més abundants en cèl.lules de fol.licles petits que en fol.licles més avançats i que per tant, l'hormona tiroïdal actuaria en la maduració fol.licular inicial a nivell dels seus receptors en les cèl.lules de la granulosa, tot amplificant les accions de la FSH en la diferenciació de les mateixes.

Wakim publicava el 1993 un article on evidenciava, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, la presència de llocs d'unió a T3 en cèl.lules de la granulosa humanes de pacients estimulades per sotmetre's a cicles de FIV, mostrant una preponderància de TR $\alpha$ 1 sobre TR $\beta$ . Un any més tard, el mateix autor demostrava també amb les mateixes tècniques, l'expressió de mRNA de TR $\alpha$  i TR $\beta$  en cèl.lules de la granulosa i estromals ovàriques humanes no estimulades, suggerint un paper per les hormones tiroïdals tant sobre l'esteroidogènesi com sobre la fol.liculogènesi. No va ser fins el 1997 que Zhang va demostrar mitjançant tècniques de RT-PCR, seguit d'un anàlisi Southern Blot, que tant oòcits com cèl.lules del cúmul, així com la resta de cèl.lules de la granulosa expressaven RNAm de TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\beta$ 1 i TR $\beta$ 2. En aquest estudi es va determinar que el patró d'expressió en cèl.lules del cúmul i en cèl.lules murals, és similar. La presència de RNAm i proteïna de TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 i TR $\beta$  també va ser corroborada per Rae el 2007 en cèl.lules epitelials ovàriques, a través de tècniques immunohistoquímiques, suggerint la seva participació en la regulació hormonal gonadal.

L'expressió ovàrica, en cèl.lules epitelials i cèl.lules de la granulosa humanes, d'ARNm de TR $\alpha$ 1, c-erbA $\alpha$ 2 i TR $\beta$ 1 també han estat confirmades per Aghajanova, (Aghajanova,



2009). Els seus anàlisis histoquímics van concloure que les cèl.lules de la granulosa dels fol.licles antrals expressaven moderada quantitat de proteïna de TR $\beta$ 1 i menor de TR $\alpha$ 1, mentre que els fol.licles secundaris mostraven només molt poca quantitat de proteïna de TR $\beta$ 1. Al mateix temps, les cèl.lules de la granulosa dels estadis precoços del desenvolupament fol.licular no expressaven proteïnes de receptors tiroïdals, suggerint que aquestes no participarien en aquesta fase, en la unió hormonal tiroïdal.

Aquestes troballes han fet suggerir als diferents autors que la T3 actuaria a nivell oocitari a través de les cèl.lules del cúmul, modulant la secreció d'àcid hialurònic (causant de l'expansió del cúmul) i interferint en la ruptura de la vesícula germinal, la maduració nuclear i l'ovulació. A nivell de les cèl.lules de la granulosa, les hormones tiroïdals tindrien el seu paper regulant la fol.liculogènesi, l'esteroidogènesi i la síntesi de líquid fol.licular.

Pel que fa a la resta d'òrgans genitals, estudis de Kirkland i Evans (Kirkland i Evans, 1983) en humans i rates respectivament, han documentat l'existència de receptors d'alta afinitat per T3 a nivell uterí, tant endometrials com miometrials, amb una concentració intermitja entre els nivells detectats a cor i cervell. Uns estudis previs de Kirkland (Kirkland *et al*, 1978) avaluant els efectes de l'hipotiroïdisme sobre el creixement i desenvolupament uterins induïts pels estrògens, van concloure que les hormones tiroïdals hi tindrien un paper premissiu més aviat que un paper directe. No obstant, un assaig fet posteriorment pel mateix autor amb rates hipofisectomitzades va fer que ell mateix ho posés en dubte. Evans conclou en el seu estudi que degut a que l'acció dels receptors estrogènics uterins disminueix amb l'administració de T4 en la rata madura, el paper de les hormones tiroïdals en la regulació de la fisiologia uterina seria més significant en el creixement i diferenciació durant el desenvolupament (prepuberal) que en els canvis cíclics de la femella adulta.

Posteriorment, Öner (Öner, 2007) va publicar que TR $\alpha$ 1 i TR $\alpha$ 2 es distribueixen tant a nivell nuclear com citoplasmàtic (mitocondrial) en les cèl.lules tubàriques i uterines

(miometrials i endometrials). Al mateix temps s'ha demostrat la presència d'ARNm i proteïnes de TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 i TR $\beta$ 1 en cèl·lules endometrials suggerint que les hormones tiroïdals hi actuarien directament de forma paracrina, amb un predomini de TR $\alpha$ 1 i TR $\beta$ 1 a nivell d'epitel·li luminal i glandular i amb un màxim d'expressió en fase secretora (Aghajanova, 2005 i 2010). Segons Catalano (Catalano *et al*, 2007) que també ha demostrat transcripció de TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 i TR $\beta$ 1 en endometri humà, aquesta expressió estaria regulada via receptors esteroïdals (concretament de progesterona) durant les diferents fases del cicle menstrual, amb nivells d'expressió màxima també durant la fase secretora.

Segons tot això, es podria dir que l'ontogènia de l'expressió dels receptors tiroïdals (TR) ha començat a generar interès en el camp de la fertilitat, tot i que en l'actualitat encara es desconeix quina és la seva contribució exacta sobre els processos fisiopatològics reproductius.

### **1.6.2. Receptor de TSH (TSHR) i reproducció**

Tot i que no està clar el paper definitiu del receptor de TSH (TSHR) en el tracte genital, en els darrers anys s'ha confirmat l'existència de proteïnes de TSHR en cos luti boví on s'ha postulat que estaria implicat en la síntesi d'hormones tiroïdals i en la modulació de la síntesi local de progesterona (Mutinati, 2010). Kumar va demostrar l'expressió de TSHR en ovòcits de cetacis l'any 2000, suggerint que la TSH tindria un paper directe en la gametogènesi. Segons Sun (Sun, 2010) la determinació inmonohistoquímica d'AMPc de TSHR funcional en cèl·lules de la granulosa madures, suggereix que el TSHR participaria en la regulació de la funció ovàrica. En el seu estudi en rates, Sun observa diferents nivells d'expressió d'ARNm de TSHR en cèl·lules de la granulosa éssent aquest, 6.5 vegades superiors en ovaris inmadurs que en ovaris madurs, suggerint que la seva expressió estaria regulada durant la maduració ovàrica i que estaria íntimament controlada per les gonadotropines.

Pel que fa a l'endometri, Aghajanova va demostrar l'augment de concentracions d'hormones tiroïdals després de l'estimulació mitjançant TSH suggerint la presència de receptors de TSH actius en cèl.lules endometrials capaços d'unir-se a la tirotropina i iniciar la secreció d'hormones tiroïdals actuant independentment del sistema hipotàlem-hipofisari-tiroïdal. Ella mateixa va demostrar posteriorment (Aghajanova, 2010) l'expressió d'ARNm i proteïna de TSHR en cèl.lules endometrials.

En base a aquestes dades es pot especular que el TSHR pot tenir un paper en la regulació dels processos reproductius. No obstant, encara roman incert com es controla l'expressió de TSHR, i els papers exactes de TSHR en la fisiologia genital dels mamífers.

### **1.6.3. Transport cel.lular i reproducció**

A nivell fol·licular i oocitari s'ha observat que hi ha varis OATPs capaços de transportar hormones tiroïdals en línies cel·lulars d'oòcits de rana (Hagenbuch, 2007). Prèviament (Abe, 2001) ja s'havien clonat nous membres de la família de transportadors aniònics orgànics (OATP 2 i 3) que transporten hormones tiroïdals amb alta afinitat en oòcits de *Xenopus* injectats amb ARNc. L'OATP1B3 també ha estat testat en el sistema d'expressió oocitari i s'ha demostrat que intervé en la captació de T4 i T3 a dins dels oòcits (Kullak-Ublick, 2001).

### **1.6.4. Deiodinases i reproducció**

Com s'ha vist, la disponibilitat d'hormones tiroïdals en els teixits implica que les fraccions lliures de T4 i T3 sèriques entren a les cèl.lules diana, on la T4, com a prohormona, es converteix en T3, la qual interactuarà amb els receptors nuclears. Addicionalment a les hormones tiroïdals que arriben via hemàtica, la T3 lliure es genera en l'ovari en quantitats suficients per cobrir els requeriments pel creixement

fol·licular. L'existència del sistema de 5' monodeiodinasa (5'MD) ovàric, que converteix la T4 tiroïdal en T3, fa possible aquest procés.

Més enllà, la presència de 5'MD fa que els ovaris siguin temporalment independents de les variacions de l'activitat secretora tiroïdal o dels nivells hormonals tiroïdals sèrics assegurant, amb la generació local de T3, l'aport suficient d'hormona per actuar directament sobre els receptors hormonals tiroïdals. Aquestes troballes tenen implicacions potencials en situacions que condueixen a disminucions temporals dels nivells sèrics de T4. No obstant, encara no s'han establert els mediadors de l'activació ovàrica de la 5'MD, així com els factors que indueixen la conversió de T4 per mantenir els nivells òptims de T3 durant el creixement fol·licular.

En relació a les cèl·lules de la granulosa luteïtzades de pacients en tractament de FIV, fa relativament poc (Aghajanova, 2009) que s'hi ha demostrat l'expressió de deiodinases *DIO2* i *DIO3* (a diferència de *DIO1*), confirmant la capacitat de conversió perifèrica de l'hormona tiroxina (T4) i donant a aquests enzims un possible paper en la regulació del metabolisme de les hormones tiroïdals sobre l'òcit. Les mateixes troballes s'han descrit en cèl·lules de la superfície epitel·lial ovàrica (Rae *et al*, 2007).

Per altra banda, l'alta expressivitat endometrial i trofoblàstica de *DIO3*, així com la ciclicitat en l'activitat de *DIO2*, augmentant els seus nivells en fase premenstrual, suggereixen que la modulació local de l'estatus tiroïdal també és important en la regulació de totes les fases de la reproducció humana (Huang *et al*, 2005).

La gestació humana requereix l'expressió coordinada de les tres iodotironina-deiodinases, així com de les sulfotransferases fetals (Burrow, 1994). La presència de *DIO2* en cèl·lules estromals endometrials es creu que pot ser crítica per tal de generar nivells intracel·lulars de T3 òptims i coordinar la resposta decidual a la implantació (Galton *et al*, 2000). En l'úter de la rata, l'activitat de la *DIO3* també és important en el procés d'implantació, induint-se àmpliament en aquest període (Galton *et al*, 1991).

En la gestació incipient, abans de la implantació, la *DIO2* i *DIO3* uterines disminueixen als nivells de l'úter no gràvid, mentre que 72 hores després de la mateixa augmenten les dues, essent la *DIO3* la que ho fa de forma més accentuada, arribant-se a multiplicar per 200 al llarg de la gestació en l'intent de limitar l'exposició fetal a les hormones tiroïdals maternes (Wasco, 2003). Segons aquest autor, l'activitat de *DIO2* no estaria induïda per l'estímul de decidualització. Degut a que E2 i progesterona són importants en el procés de formació del trofoblast i que augmenten l'expressió de *DIO3* uterina en rates ooforectomitzades, aquestes hormones esteroïdals semblarien contribuir, juntament amb altres estímuls menys definits associats al procés d'implantació, a la regulació de l'expressió de *DIO3* uterina (Wasco, 2003). L'activitat de *DIO3* semblaria respondre als nivells d'estradiol i progesterona, mentre que la de *DIO2* respondria principalment als nivells circulants d'estrogen.

Així doncs, l'úter es converteix en un dels pocs òrgans que s'ha demostrat que expressa tant *DIO2* com *DIO3* (Galton *et al*, 2001) i que a més, *DIO3* hi té uns dels nivells d'activitat més alts en humans adults (Huang *et al*, 2005). En rates, se sap que existeix una separació espacial en l'expressió de *DIO2* i *DIO3*, expressant-se nivells superiors de *DIO3* en la decídua que envolta l'embrió en estadis primaris, i més alts nivells de *DIO2* en les regions uterines que envolten la reacció decidual.

Pel que fa a la gestació evolutiva està demostrat també que els nivells de tiroxina i triiodotironina fetals dels mamífers són menors en el fetus que en la mare durant la major part de la gestació (Burrow, 1994). Això és particularment degut al fet que la glàndula tiroïdal fetal no esdevé funcional fins a la meitat desenvolupament fetal i roman relativament inactiva fins al moment del naixement, però la causa principal és que al fetus només es transfereixen mínimes quantitats de T4 i T3 maternes. Això s'ha atribuït a l'existència de *DIO3* a nivell fetal i placentari. Els alts nivells d'expressió de *DIO3* placentaris han demostrat limitar la transferència d'hormones tiroïdals circulants maternes a dosis inadequades pel fetus.

En relació a la deiodinasa *DIO1* en endometri no gràvid, segons el nostre coneixement només Aghajanova (Aghajanova, 2010) n'ha demostrat la seva expressió. El seu estudi al llarg de totes les fases del cicle menstrual, va demostrar que s'hi expressaven les tres deiodinases amb predomini de *DIO2*, i que l'expressió dels tres enzims era estadísticament menor en la fase secretora comparada amb la resta de fases. Aquests canvis cíclics en les *DIO* en endometri humà va mostrar una relació inversa amb els nivells de progesterona, tal i com havia publicat Catalano el 2010.

Per concloure i emfatitzar la importància de l'estatus tiroïdal sobre l'endometri, podem hipotetitzar que basats en l'expressió i distribució cel.lular endometrial humana de *TSHR*, *TR* i *DIO* la cèl.lula endometrial tindria la maquinària per la síntesi i el metabolisme hormonal tiroïdal, fet indiscutiblement imprescindible pel bon funcionament de la fisiologia reproductiva.



## **2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI**

---





L'avaluació, tractament i pronòstic dels problemes de fertilitat han millorat de forma exponencial en els darrers decennis degut al millor coneixement de la fisiopatologia reproductora i a la introducció i desenvolupament de les tècniques de reproducció assistida. No obstant, tot i l'important progrés experimentat, aquests tractaments tenen a hores d'ara una taxa d'èxit limitada, deixant al descobert moltes parelles que, per motius encara no del tot coneguts fracassen en la seva aplicació.

Per tal de donar resposta a aquestes dones cal aprofundir en l'enteniment de determinats mecanismes, entre ells els hormonal, fet que ens ha despertat la necessitat d'anar més enllà en l'estudi de la repercussió endocrinològica sobre la fertilitat.

Com s'ha documentat anteriorment, és conegut amb certesa per estudis realitzats en humans i en models experimentals, que la concentració perifèrica d'hormones tiroïdals es relaciona amb la capacitat reproductora, tot i que la majoria d'assaigs clínics que estudien la relació entre l'estatus tiroïdal i la funció genital només mencionen els efectes directes de l'hipotiroïdisme sobre l'eix gonadal. Recentment s'ha començat a estudiar la funció tiroïdal a nivell cel.lular i mol.lecular, demostrant la presència de receptors de TSH i hormonal tiroïdals així com deiodinases en ovari, úter i endometri, complementant la teoria que la glàndula tiroide tindria el seu paper en la regulació de la funció reproductora. En la revisió bibliogràfica realitzada no s'ha trobat cap estudi que valori les diferències d'expressió d'aquests receptors ni de deiodinases entre dones fèrtils i estèrils ni si la presència o absència d'aquestes podria condicionar dificultats procreadores. Els mecanismes directes i indirectes de les hormones tiroïdals sobre les dones estèrils tampoc han quedat definitivament establerts.

Amb la intenció d'entendre millor el paper de les hormones tiroïdals sobre la fertilitat, mitjançant aquest estudi es vol identificar si un inadequat funcionament tiroïdal a nivell perifèric, tissular i cel.lular pot influir en la capacitat reproductora femenina. Aquesta aproximació seria útil a l'hora de monitoritzar els efectes de les

modificacions dels protocols d'estimulació ovàrica en dones tributàries d'aquests tractaments.

Seria d'esperar observar diferències pel que fa a l'expressió de receptors tiroïdals i deiodinases a nivell genital, entre dues cohorts de dones fèrtils i estèrils. En cas de certificar-ne la relació, es podrien dur a terme estudis experimentals i assaigs clínics amb la finalitat d'optimitzar la funció tiroïdal per tal d'aconseguir la normalització de la resposta cel·lular. De no ser així, les troballes podrien servir de ben segur per enfocar nous horitzons en l'estudi dels mecanismes tiroïdals sobre la funció genital en futurs treballs d'investigació.

L'aprofundiment en el coneixement dels aspectes endocrins de la regulació de la funció tiroïdal proporcionaria doncs, una eina important que podria tenir la seva rellevància en l'aplicació clínica d'aquests coneixements sobre les mesures terapèutiques en el camp de la reproducció.

## **3. HIPÒTESIS**

---



3.1. Els paràmetres associats a la funció intracel.lular de les hormones tiroïdals, en cèl.lules de la granulosa ovàriques i cèl.lules cervicals uterines, són diferents en dones fèrtils i estèrils.

3.2. Els paràmetres de funció intracel.lular de les hormones tiroïdals, en cèl.lules de la granulosa ovàriques i cèl.lules cervicals uterines, s'associen a diferències en la resposta al tractament de fecundació *in vitro*.



## **4. OBJECTIUS**

---





4.1. Analitzar les diferències en l'expressió dels gens dels receptors hormonals tiroïdals  $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$ ,  $TR\beta$  i les deiodinases  $D1-D2-D3$ , en cèl.lules de la granulosa ovàriques periovulatòries i cèl.lules cervicals uterines, entre una població estèril i una fèrtil sotmeses a cicles d'estimulació ovàrica per fecundació *in vitro*.

4.2. Analitzar si l'expressió d'aquests gens ( $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$ ,  $TR\beta$  i  $D1-D2-D3$ ), en cèl.lules de la granulosa ovàriques periovulatòries, cèl.lules cervicals uterines i cèl.lules endometrials, s'associen a altres paràmetres relacionats amb la funció tiroïdal intracel.lular com són la concentració circulant i intrafol.licular d'hormones tiroïdals i l'expressió del receptor adrenèrgic ( $ADR\beta 2$ ).

4.3. Analitzar si l'expressió dels gens associats a fertilitat  $GREM1$ ,  $HAS2$  i  $PTGS2$  es relaciona amb variacions en l'expressió gènica dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular  $TR\alpha$ ,  $TR\beta$  i  $D1-D2-D3$ , en cèl.lules de la granulosa ovàriques, cèl.lules cervicals uterines i cèl.lules endometrials.

4.4. Analitzar les diferències en l'expressió gènica de  $TR\alpha$ ,  $TR\beta$  i  $D1-D2-D3$  en cèl.lules de la granulosa del fol.licle ovàric periovulatori i cèl.lules cervicals uterines, entre la població estèril que no ha obtingut gestació i el grup fèrtil, els oòcits de les quals han donat lloc a gestació.



## **5. SUBJECTES I MÈTODES**

---



## 5.1. DISSENY DE L'ESTUDI

Es tracta d'un estudi descriptiu prospectiu de dues cohorts consistents en dones fèrtils i estèrils de dos centres diferents.

## 5.2. PARTICIPANTS

Es van incloure, prospectivament, totes les dones de la Unitat de Reproducció del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta (HUGDJT) i del Centre de Medicina Reproductiva i Embrionària Girexx que complien els criteris d'inclusió, sotmeses a hiperestimulació ovàrica controlada per tècniques de fecundació *in vitro* (FIV) i per donació d'òcits respectivament, durant el període de temps comprès entre gener de 2012 i juny de 2013 (ambdós inclosos) en un sol cicle de tractament.

### 5.2.1. Grup dones estèrils

#### 5.2.1.a. Criteris d'inclusió

Van ser incloses a l'estudi totes les dones estèrils subsidiàries de tractament mitjançant tècniques de reproducció assistida (FIV), provinents de la Unitat de Reproducció del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'HUGDJT que complien els següents criteris:

- Dones majors de 20 anys i menors de 40.
- Dones que haguessin firmat el consentiment informat.
- Dones amb diagnòstic d'esterilitat d'origen desconegut, amb fallada de dos o més cicles d'inseminació artificial i/o d'un cicle de FIV previs.
- Exploració mamària, ginecològica i ecogràfica normals.

- Analítica bioquímica, hemograma, coagulació i estudi hormonal i serològics normals.

#### **5.2.1.b. Criteris d'exclusió**

- Parelles tributàries de Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP).
- Indicació de FIV per factor masculí.
- Factor tubàric bilateral aïllat.
- Dones amb fills previs.
- Dones amb 2 o més cicles de FIV en el mateix o altre centre.
- Obesitat grau I (IMC > 30kg/m<sup>2</sup>).
- Parella masculina HIV, VHB i/o VHC positiva.
- Factor masculí que requerís biòpsia testicular per a l'obtenció d'espermatozous fecundants.
- Tractament amb anticonceptius orals el cicle previ a la realització de les determinacions hormonals.
- Alteracions endocrinològiques:
  - Hiper o hipotiroïdisme subclínic o establerts, amb o sense tractament mèdic, agafant com a rang de normalitat: TSH 0,2-4,9 UI/mL i T4L 0,8-1,9 ng/dl.
  - Diabetis Mellitus tipus 1.
  - Hiperplàsia suprarrenal congènita.
  - Sd. de Cushing.
  - Tractament hormonal amb agonistes dopaminèrgics, corticoides, insulina, betabloquejants, perclorat, tiocianat, tioureas (PTU, metamilazol), liti o amiodarona.
- Contraindicacions mèdiques de la FIV:
  - Patologia que contraindiqués la gestació.

- Masses annexals quístiques ó sòlides no funcionals, pòlips endometrials superiors o iguals a 1 cm, tumoracions uterines que modifiquessin la línia endometrial, hidrosàlpinx uni o bilateral visibles per ecografia.
- Contraindicació pel tractament inductor de l'ovulació.
- No presentar una previsible suficient capacitat de resposta al tractament d'hiperestimulació ovàrica controlada.

## **5.2.2. Grup dones fèrtils**

### **5.2.2.a. Criteris d'inclusió**

Van ser incloses en l'estudi totes les donants d'ovòcits del Centre de Medicina Reproductiva i Embrionària Girexx, que complien els següents criteris:

- Dones majors de 18 anys i menors de 35.
- Antecedent de gestació prèvia.
- Dones que haguessin firmat el consentiment informat.
- Anàlítica bioquímica, hemograma, coagulació, estudi hormonal i cariotip normals.
- Exploració mamària, ginecològica i ecogràfica normals.

### **5.2.2.b. Criteris d'exclusió**

- Tractament amb anticonceptius orals el cicle previ a la realització de les determinacions hormonals.
- Obesitat grau I (IMC > 30kg/m<sup>2</sup>).
- Alteracions endocrinològiques:



- Hiper o hipotiroïdisme subclínic o establerts, amb o sense tractament mèdic, agafant com a rang de normalitat: TSH 0,2-4,9 UI/mL i T4L 0,8-1,9 ng/dl.
- Diabetis Mellitus tipus 1.
- Hiperplàsia suprarrenal congènita.
- Sd. de Cushing.
- Tractament hormonal amb agonistes dopaminèrgics, corticoides, insulina, betabloquejants, perclorat, tiocianat, tioureas (PTU, metamazol), liti o amiodarona.
- Criteris legals de la donació d'ovòcits:
  - Antecedents personals o familiars de primer grau de malalties genètiques i/o hereditàries \*
  - Estudi genètic de la fibrosi quística positiu (CFTR).
  - Serologia positiva per RPR, HIV, VHB i/o VHC.

\* *Sd. Down (T21), Sd. Klinefelter (47XXY), Sd. Turner (45, X0), Sd. Patau (T13), Sd. Edwards (T18), Distròfia muscular de Becker, Steinert ó Duchenne, espina bifida, llavi leporí, paladar fes, osteogènesi imperfecta, atròfia muscular espinal, acondroplasia, fibrosi quística, Diabetis tipus I o II, metabolopaties congènites, hemocromatosi, dèficit de 21-hidroxilasa, hemofília, beta-talasèmia, trombofília, trastorn bipolar, epilèpsia, suïcidi, corea de Huntington, Esquizofrènia, Sd. X fràgil, càncer de mama, ovari i colon, retinoblastoma, neurofibromatosi i miopia magna.*

- Contraindicacions mèdiques de la donació d'ovòcits:
  - Contraindicació pel tractament inductor de l'ovulació.
  - No presentar una previsible suficient capacitat de resposta al tractament d'hiperestimulació ovàrica controlada.
  - Masses annexals quístiques ó sòlides no funcionals.

### 5.3. ESTUDI DIAGNÒSTIC D'ESTERILITAT

La bateria rutinària de proves diagnòstiques i terapèutiques realitzades a totes les dones de l'estudi per tal de fer el diagnòstic d'esterilitat, descartar contraindicacions i procedir al tractament de FIV van ser les següents:

- Analítica general amb estudi de la funció ovàrica:
  - *hemograma, bioquímica, coagulació.*
  - *determinació hormonal en primera fase del cicle: FSH, LH, E2, PRL, TSH i T4l.*
  - *serologies: RPR, HIV, VHB i VHC.*
- Ecografia transvaginal.
- Histerosalpingografia postmenstrual (en funció de les alteracions presumibles).
- Punció fol·licular: Per tal d'aspirar el líquid fol·licular d'ambdós ovaris i procedir a l'obtenció dels ovòcits.

En les pacients del nostre estudi aquestes proves van servir a més per valorar que es complien els criteris d'inclusió i per descartar la presència de criteris d'exclusió. En cas de diagnosticar alteracions analítiques ó qualsevol altra patologia ginecològica que pogués o no interferir sobre el resultat gestacional, es va procedir al corresponent estudi i tractament.

#### 5.3.1. Protocol experimental

Les determinacions que es van afegir per tal de dur a terme el protocol experimental van ser les següents:

- Quantificació de l'expressió dels receptors tiroïdals TR en les isoformes *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2* i *TR $\beta$* , dels gens *ADR $\beta$ 2*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i de les deiodinases *DIO1-DIO2-DIO3*, en cel.lularitat cervical i en les cèl.lules de la granulosa obtingudes durant la punció fol.licular.

#### 5.4. RUTINA D'ESTUDI DE LA DONANT D'OVÒCITS

La bateria habitual de proves i tractaments mèdics realitzats en el nostre centre en aquestes dones per tal de descartar contraindicacions, comprovar la normalitat de la funció reproductora i procedir a la donació ovocitària van ser els següents:

- Anàlítica general:
  - *hemograma, bioquímica, coagulació, cariotip, estudi genètic de la fibrosi quística (CFTR).*
  - *serologies: RPR, HIV, VHB i VHC.*
- Ecografia vaginal.
- Citologia cervical.
- Punció fol.licular: Per tal d'aspirar el líquid fol.licular d'ambdós ovaris i procedir a l'obtenció dels ovòcits.

En les dones de l'estudi aquestes proves van servir a més per valorar que es complien els criteris d'inclusió i descartar la presència de criteris d'exclusió. En cas de diagnosticar alteracions analítiques ó altra patologia ginecològica es va procedir al seu estudi i corresponent tractament.

#### 5.4.1. Protocol experimental

Les exploracions que es van afegir per tal de dur a terme el protocol experimental van ser les següents:

- Determinació hormonal en primera fase del cicle: FSH, LH, E2, PRL, TSH i T4I.

Quantificació de l'expressió dels receptors tiroïdals TR en les isoformes *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2* i *TR $\beta$* , dels gens *ADR $\beta$ 2*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i de les deiodinases *DIO1-DIO2-DIO3* en cel.lularitat cervical, endometrial i en les cèl.lules de la granulosa obtingudes durant la punció fol.licular.

### 5.5. PROTOCOL DE TRACTAMENT INDUCTOR DE L'OVULACIÓ

Tant en el cas de les dones tributàries a FIV/ICSI (injecció intracitoplasmàtica) com en les donants es va realitzar l'anomenat **protocol amb antagonista**.

L'inici del tractament va ser determinat pel dia proposat de punció fol.licular. Un cop seleccionada aquesta data es va programar una menstruació a les dones d'ambdós grups mitjançant anticonceptius orals.

Entre el segon i cinquè dia de la menstruació, coincidint amb el dotzè dia previ a la punció prevista es va iniciar l'autoadministració subcutània de FSH recombinant i/o urinària  $\pm$  LH recombinant o urinària a dosis ajustades en funció de la previsible capacitat de resposta (150-450UI FSH  $\pm$  0-150UI LH dosi mínima i màxima respectivament).

Els dies 4rt-5è, 6è-7è i 8è-9è de l'estimulació es van realitzar controls ecogràfics (3 en total) per tal de determinar la resposta ovàrica, modificant la dosi de fàrmac en cas de baixa resposta o de risc d'hiperestimulació ovàrica.

A partir d'un tamany fol.licular màxim de 14-15 mm la pacient es va autoadministrar diàriament i de forma subcutània fins el dia de la inducció de la ovulació, un

antagonista de la GnRH (cetorelix/ganirelix) per tal d'evitar el pic endogen de LH i la consegüent ovulació espontània.

Entre els dies 9è-11è de l'estimulació, quan un mínim de 2-3 fol·licles van tenir un diàmetre mig de 18 mm, es va procedir a l'administració única de 250 mcg de coriogonadotrofina alfa recombinant (equivalent a 6500 UI) o bé de 0,2 mg de triptorelina (anàleg agonista de la GnRH) en algunes dones amb risc d'hiperestimulació ovàrica, per tal de desencadenar la maduració i l'ovulació ovocitària unes 36 hores després, moment en què es va programar la punció fol·licular.

El tractament d'estimulació es va suspendre i la punció fol·licular es va cancel·lar en cas d'absència de resposta al tractament (<2 fol·licles preovulatoris) o en cas que es predigués una hiperestimulació ovàrica moderada-severa, moment en què es va decidir el tractament adequat per tal de minimitzar els riscos per a la pacient.

La punció fol·licular es va realitzar sota sedació, per via vaginal i controlada mitjançant ecografia. El material utilitzat va ser un equip d'ultrasonografia amb sonda vaginal i guia, una agulla de punció i una bomba de buit amb regulació contínua, així com un bloc tèrmic per mantenir els tubs d'aspiració a 37º. Es van punxionar tots els fol·licles visibles de més de 13 mm de diàmetre en presència del biòleg assignat.

Aprofitant l'efecte de l'anestèsia a la que estaven sotmeses, prèviament a la punció fol·licular es va realitzar citologia cervical a totes les dones i biòpsia d'endometri mitjançant cànula d'aspiració a totes les donants.

La cel·lularitat endometrial i cervical va ser processada en tubs separats i posteriorment va ser congelada en el laboratori a -80ºC.

L'aspirat fol·licular va ser traslladat al laboratori d'embriologia en condicions òptimes de temperatura i asèpsia on es va procedir a l'aïllament cel·lular i a la catalogació de l'ovòcit en funció del seu estat de maduració nuclear i de l'aspecte de la corona-cúmul. Un cop els ovòcits van ser classificats, van ser mantinguts en cultiu en estufa

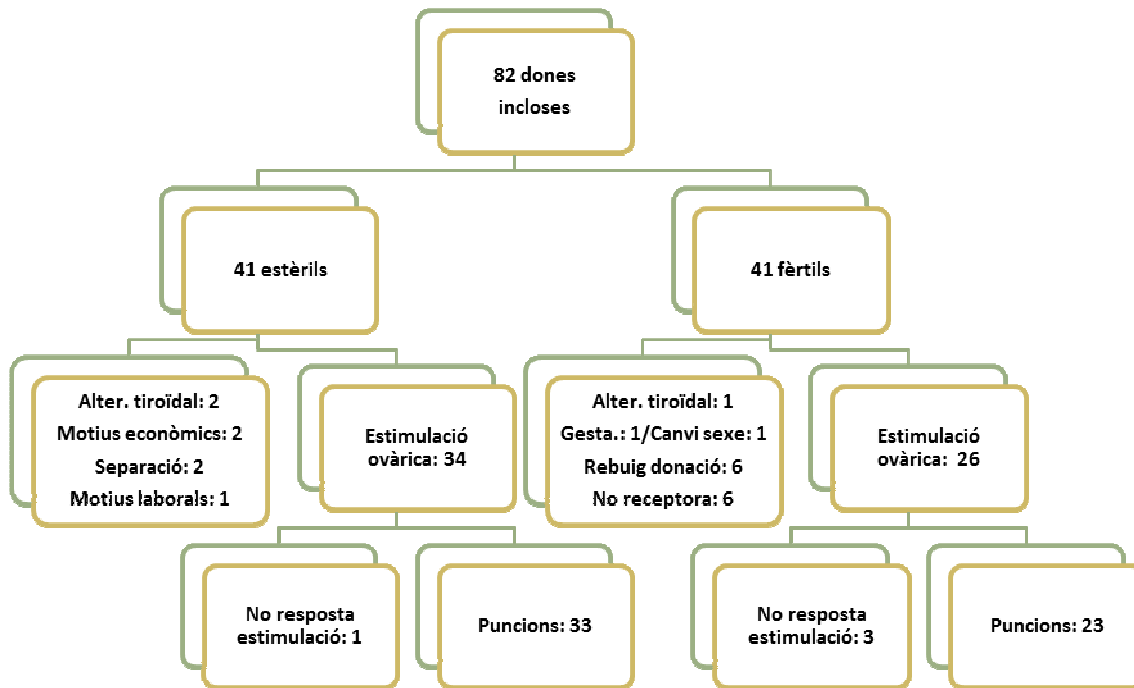
de CO<sub>2</sub> i a 37°C durant unes hores fins a la seva inseminació ó microinjecció. El líquid sobrant va ser centrifugat i el sobrenadant congelat al laboratori a -80°C.

L'aportació de les donants d'òcits va acabar aquí, moment en què es va donar per finalitzat el seu tractament, procedint a una revisió ginecològica 2-3 setmanes posteriors en cas que no s'hagués presentat cap incidència.

En el cas de les pacients de FIV/ICSI la transferència d'embrions es va dur a terme mitjançant una ecografia transabdominal, en un ambient estèril unes 48-72 hores després de la punció. Es van transferir tal i com recomana la llei un màxim de 3 embrions, congelant-ne la resta en cas d'excedents. Per a la realització de la transferència, abans de la introducció del catéter a nivell del fundus endometrial per via transcervical es van fer rentats vaginals amb sèrum, aspiració del moc cervical i aplicació del medi de cultiu a nivell cervical per facilitar la viabilitat dels embrions. Posteriorment a la transferència, les pacients van fer un mínim de 30 minuts de repòs en decúbit supí seguits de 48 hores de repòs relatiu.

El suport de la fase lútea es va realitzar mitjançant l'administració via vaginal de 200 mg de progesterona micronitzada cada 12 hores, que s'inicià 2 dies abans i es doblà la dosi a partir del dia de la transferència. Aquest tractament es va perllongar fins a les 10-11 setmanes de gestació en cas de resultat favorable.

El diagnòstic de gestació va ser realitzat amb una determinació sèrica de  $\beta$ -hCG 12 dies posteriors a la transferència. Es va considerar positiu quan aquest va ser igual o superior a 50 mUI/mL. En aquests casos es va realitzar una ecografia a les 7 setmanes d'amenorrea. Es va diagnosticar l'existència de gestació evolutiva només quan a l'ecografia es va veure almenys un sac embrionari, independent de la seva localització, amb embrió i batec positiu.

**Figura 7.** Distribució de les dones avaluades en ambdues cohorts

*Diagrama descriptiu dels subjectes inclosos i exclosos, motiu d'exclusió i nombre de puncions finals realitzades en cada cohort.*

Com mostra la figura 7, de les 41 dones estèrils incloses se'n van descartar 2 per alteracions de la funció tiroïdal, mentre que 5 van desestimar el tractament de FIV per voluntat pròpia (2 per motius econòmics, 2 per separació de la parella i 1 per motius laborals). De les 34 estimulacions ovàriques realitzades, una no va obtenir resposta suficient per arribar a la punció fol·licular.

De la cohort de dones fèrtils, 41 en total, una va ser descartada per alteracions de la funció tiroïdal, una per gestació i una per canvi de sexe. 6 donants van rebutjar la donació i altres 6 no van tenir receptora adjudicada en el moment de finalitzar el període d'estudi. De les 26 induccions de l'ovulació iniciades en aquest grup hi va haver 3 casos que no van respondre suficientment com per procedir a la punció fol·licular.

## 5.6. PARÀMETRES EXPERIMENTALS

Es van centralitzar totes les mostres al Laboratori de Recerca de l'IdIBGi (Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta) dirigit pel Dr. José Manuel Fernández-Real.

### 5.6.1. Creació de la seroteca

L'extracció de sang es va realitzar durant la primera fase del cicle menstrual abans d'iniciar qualsevol tractament hormonal, en totes les participants de l'estudi. L'extracció sanguínea de les donants i la centrifugació de les respectives mostres es va realitzar al Centre d'Anàlisi Girona (CAGI), mentre que la de les dones estèrils es va realitzar a l'Hospital de Dia del Servei d'Endocrinologia de l'HUGDJT (UDEN). De cada dona es van extreure 4 tubs de 5 ml (dos de sèrum i dos de plasma/EDTA) que van ser immediatament centrifugats (1600g, 10 min, 4°C). Aquest procediment aconseguí la separació del sobrenadant (sèrum i plasma respectivament) de la fracció cel.lular. La fracció cel.lular del tub de plasma queda constituïda per dos seccions: una primera part superficial de grans cèl.lules nucleades (limfòcits, monòcits i macròfags, d'aspecte blanc-vermellós) i una segona secció formada pels eritròcits. Tant el plasma com el sèrum van ser congelats en Eppendorfs de 1.5 ml. De cada tub de plasma es va aliquotar també el *Buffy coat* (la primera fracció formada per les cèl.lules nucleades, ric en DNA) i congelar a -80°C.

### 5.6.2. Determinacions sèriques

Les determinacions sèriques de FSH (mUI/mL), LH (mUI/mL), 17- $\beta$ -estradiol (pg/mL), TSH (UI/mL), T4L (ng/dl), T3L (nmol/L), PRL (ng/mL) i  $\beta$ hCG (mUI/mL) de totes les participants, es van realitzar el mateix dia mitjançant tècniques



d'electroquimioluminiscència (ECLIA) amb l'aparell Modular E170 (Roche, España) al Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta.

### **5.6.3. Recol.lecció del líquid fol.licular i aïllament de cèl.lules de la granulosa**

El líquid fol.licular dels subjectes sotmesos a punció fol.licular va ser recollit en tubs. Un cop separats els ovòcits es va reagrupar el contingut dels múltiples fol.licles de cada pacient de forma individual, descartant el líquid hemàtic. Els tubs van ser centrifugats a 1000 g durant 3 minuts. El pellet resultant, ric en cèl.lules de la granulosa, va ser resuspès en RNA later (QIAgen, EUA) així com el líquid sobrenadant, i posteriorment van ser congelats a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el posterior processament en el Laboratori de Recerca de l'IdIBGi.

Les determinacions hormonals en líquid fol.licular es van dur a terme conjuntament el mateix dia, mitjançant tècniques d'electroquimioluminiscència (ECLIA) amb un aparell Modular E170 (Roche, España) al Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta.

La determinació de l'expressió gènica de *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , *ADR $\beta$ 2*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i de les deiodinases *D1-D2-D3* es va realitzar mitjançant la tecnologia Taqman Real Time PCR al Parc Científic Tecnològic.

### **5.6.4. Recol.lecció i aïllament de cèl.lules endometrials i cervicals**

Una biòpsia d'endometri de totes les donants (obtinguda mitjançant cànula d'aspiració de Cornier de 3 mm de diàmetre), i una citologia cervical de totes les dones (realitzada només a exocèrvix, mitjançant espàtula de Ayre) van ser obtingudes immediatament abans de la punció fol.licular, dipositades en tubs amb sèrum fisiològic i centrifugades a 1000 g durant 3 minuts. El pellet resultant va ser

resuspès en RNA later (QIAgen, EUA) i posteriorment conservat a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el moment del seu processament al Laboratori de Recerca de l'IdIBGi.

La determinació de l'expressió de *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , *ADR $\beta$ 2*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i de les deiodinases *D1-D2-D3* es va realitzar mitjançant la tecnologia Taqman Real Time PCR al Parc Científic Tecnològic.

### 5.6.5. Extracció de l'RNA

El primer pas per l'extracció de l'RNA de les mostres obtingudes va consistir en la col·locació en la nevera per tal de procedir a una descongelació lenta.

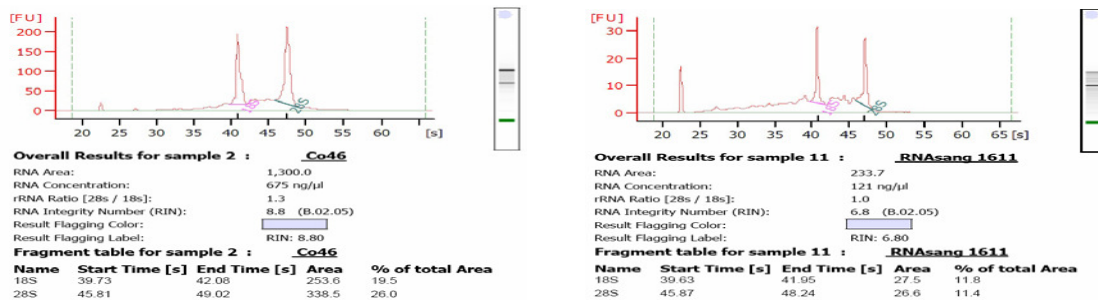
Les mostres descongelades van ser centrifugades a 6000g a  $4^{\circ}\text{C}$  durant 10'. Posteriorment es va rebutjar el sobrenadant per tal de sustreure l'RNA later (QIAgen, EUA) afegit abans de la congelació. Es va agregar a cada alícuota 600  $\mu\text{l}$  de *QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent (QIAgen, EUA)* fred i es va vortejar durant 10s. El *QIAzol<sup>®</sup>* és una barreja comercial de guanidina, tiocianats, fenols i alcohols que condiona la degradació de les cèl·lules permetent l'extracció del material nucleic íntegre. El *QIAzol<sup>®</sup>* estableix el DNA i l'RNA, inactivant les nucleases que podrien degradar-los. Dins d'aquest solvent i mitjançant l'ús d'un homogenitzador (*Ultraturrax Werke<sup>®</sup>; Londres*) es va triturar la mostra a nivell subcel·lular ( $>20000$  rpm durant 20-40s).

Després d'un període de repòs de 5 minuts es va afegir 200 $\mu\text{L}$  de cloroform a la solució i es va vortejar durant 15s. A continuació la solució es va centrifugar per un període de 15 minuts a  $4^{\circ}$  i 1200g. D'aquesta manera la barreja perd la seva homogeneïtat i acaba mostrant tres fases clarament diferenciades de les quals, la fase superior completament incolora d'aspecte aquós, és la que conté l'RNA dissolt. Una segona interfase blanca constituïda en la seva totalitat pel DNA, i una hipofase vermellova inferior amb restes cel·lulars i proteïnes. Aquesta primera fase d'uns  $\sim 600$   $\mu\text{L}$  es va transferir a un nou *Eppendorf<sup>®</sup>* estèril on es va barrejar amb un volum equivalent d'etanol absolut, fred i estèril.

Després de vortejar vigorosament la barreja és possible que el material genòmic contingut en la solució comenci a ser visible degut a la desnaturalització de les cadenes de RNA: cal mantenir-lo dissolt abans de passar la solució per la *RNeasy® Mini Spin column*, una columneta cromatogràfica col.locada a un tub de centrifuga de 2mL. Van seguir una sèrie de rentats i centrifugacions a 8000g durant 15seg a t<sup>a</sup> ambient. Els tampons comercials que inclou el kit (*Buffer RPE i RW1*) n'asseguren un rentat complet de restes lipídiques, proteiques i/ó fenòliques per tal d'aconseguir una puresa òptima. Una última centrifugació a màxima velocitat (14000g) de 2 min garanteix la deshidratació de la membrana, encara amb l'RNA adherit. Finalment es va transferir la columna final a un nou tub de col.lecció estèril correctament etiquetat i amb tap, i es va eluir l'RNA passant 50µL d'aigua *RNase-free* directament a través del centre de la membrana i centrifugant a 8000g 1 min (RT). Es va repetir el procés una segona vegada amb els mateixos 50 µL d'aigua per tal de maximitzar-ne la concentració i assegurar l'eficiència de l'extracció.

La puresa i concentració del RNA obtingut s'estima mitjançant mètodes espectrofotomètrics. El *NanoDrop™* (*Thermo Fischer Scientific; Wilmington*) permet valorar de forma precisa la concentració de RNA de la solució final i la seva puresa a través dels espectres d'absorció a una longitud d'ona de 260 nm. Un *Bioanalitzador* (*Bioanalyzer™, Agilent Technologies; Santa Clara, EUA*) és una plataforma microfluídica útil per quantificar el grau de la degradació del material genòmic obtingut. Es basa en la presència relativa de les principals subunitats ribosomals, la 18S i la 28S, ambdues molt abundants, per valorar la integritat de la mostra.

Entre l'obtenció del RNA i la retrotranscripció es va procedir a l'eliminació d'aigua per tal de concentrar la mostra. Aquest procediment es va aconseguir centrifugant les mostres al buit durant 30' a 45°C.

**Figura 8.** Diagrama de la integritat del RNA

Exemple del diagrama que proporciona el Bioanalyzer® representant la integritat de l'RNA d'una solució aquosa. Els pics corresponen a la presència de les subunitats ribosòmiques 18S i 28S i, la base dels mateixos, un marcador de la integritat general de l'RNA. El RNA Integrity Number (RIN) es calcula a partir dels darrers i es considera òptim pels anàlisis d'expressió gènica per sobre de 7.5. Al costat de cada gràfica, una representació digital del que seria l'equivalent en bandes d'un gel d'agarosa.

### 5.6.6. Retrotranscripció de l'RNA

Tot i l'absència de RNases, l'RNA en solució aquosa és extremadament làbil. Els cicles de congelació i descongelació comporten la formació de cristalls que poden fragmentar les seqüències dels oligoribonucleòtids i reduir la presència real de les mateixes a l'hora de l'anàlisi per RT-PCR. Donada l'extremada sensibilitat de la RT-PCR, aquest fenomen lligat a la naturalesa estructural de cada seqüència pot derivar en resultats i interpretacions errònies. El més indicat per evitar aquest error és rebutjar qualsevol mostra de RNA després del 3r cicle de congelació/descongelació.

L'alternativa més adequada per allargar el temps de vida útil d'aquests tipus de mostres és la retrotranscripció del RNA missatger (mRNA) a cDNA, DNA monocatenari, sintetitzat a partir dels mRNAs en suspensió però més estable, que aguanta ben bé fins a 10 cicles de congelació/descongelació. Amb aquesta finalitat,

kits comercials com el *High Capacity® cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems; Dinamarca) permeten, mitjançant l'ús d'encebadors aleatoris, nucleòtids lliures i una retrotranscriptasa termosensible, la conversió de tots els mRNAs a cDNAs. Aquests *primers* aleatoris n'asseguren la síntesi de cDNA a partir de qualsevol espècie de mRNA existent a la mostra. Al final del procés, totes i cada una de les seqüències de RNA missatger hauran estat transformades a cDNA.

D'aquesta manera per retrotranscriure 50µL de mostra amb 0.1-10 µg de RNA pur a concentracions entre 0.002 i 0.2 µg/µL, es realitza una MIX (50µL/mostra) amb components del kit, sempre treballant sobre gel i en condicions estèrils. Aquests reactius són un tampó adient per promoure la retrotranscripció (*10x Reverse Transcription Buffer*, 10 µL), la solució de *desoxiribonucleòtids* lliures (*25x dNTPs*, 4µL), una solució d'encebadors aleatoris (*10x Random Primers*, 10 µL) i la retrotranscriptasa, normalment de naturalesa vírica (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 50U/µL, 5µL). Finalment s'enrasarà la solució amb 21µL d'aigua destil·lada *RNAsa-free* i es barrejaran les 2 solucions, els 50µL de mostra amb els 50 µL de MIX, per obtenir 100µL d'una solució de 0.1-10µg de cDNA pur.

La reacció de retrotranscripció consta de 2 etapes, una de *melting* o associació de seqüències complementàries (encebadors amb molècules de mRNAs) de 10 min a 25°C i una altra d'elongació de seqüències i degradació de molècules de mRNA dirigida per l'acció de les retrotranscriptases a 37°C durant 120 min. La retrotranscriptasa degrada les mol·lècules de RNA a mesura que les retrotranscriu a la meitat de la concentració de l'RNA inicial.

#### **5.6.7. Anàlisi de l'expressió gènica via Real-time PCR**

L'anàlisi dels nivells d'expressió gènica en cèl·lules i teixits és, un cop optimitzada, un eina molt útil per la caracterització cel·lular a nivell molecular. Gràcies a que el sistema es fonamenta en la *multiplicació de seqüències*, representa una tècnica

extremadament sensible que permet la determinació de petits canvis a nivells d'expressió molt baixos.

La RT-PCR permet estimar els *nivells d'expressió relatius* d'un gen determinat. Cada assaig té una sonda única específica per un gen determinat i situada al mig d'un *amplicó* (la seqüència, específica pel gen estudiat, amplificada entre ambdós encebadors).

També pot fer-se ús del fluorocrom comercial *Sybr® Green* (*Applied Biosystems, Darmstadt*) que, com que només emet fluorescència quan les molècules de DNA polimeritzen, facilita la monitorització de les duplicacions d'un gen problema al llarg del temps.

La PCR quantitativa es realitza en un termociclador amb capacitat de fer incidir sobre cada mostra un feix de llum d'una longitud d'ona determinada i de detectar la fluorescència emesa pel fluorocrom excitat.

Cada mostra de cDNA sintetitzada a partir de l'RNA extret es diluirà a una concentració constant per tal de carregar amb 11.25µL de solució entre 10-100ng de cDNA. A cada pouet s'aplicaran a continuació 13.75µL d'una MIX constituïda per 12.5µL de *TaqMan® PCR Master Mix* (solució prefabricada per AB amb la totalitat de components necessaris per dur a terme l'amplificació gènica, menys els encebadors) i 1.25µL de l'assaig o combinació de *primers* (i sonda) necessaris segons el gen estudiat.

La integritat de l'ADN, l'eficiència enzimàtica i altres factors poden conduir a una variabilitat que condueixi a un error en la quantificació. Per aquest motiu s'han desenvolupat sistemes d'estandarització, com per exemple la quantificació relativa del gen d'estudi respecte a un altre anomenat 'normalitzador', que se selecciona degut a la seva expressió constant. D'aquesta manera, efectuant en cada experiment la medicció dels gens d'interès i dividint-los per l'expressió del gen normalitzador seleccionat, és possible comparar els primers.

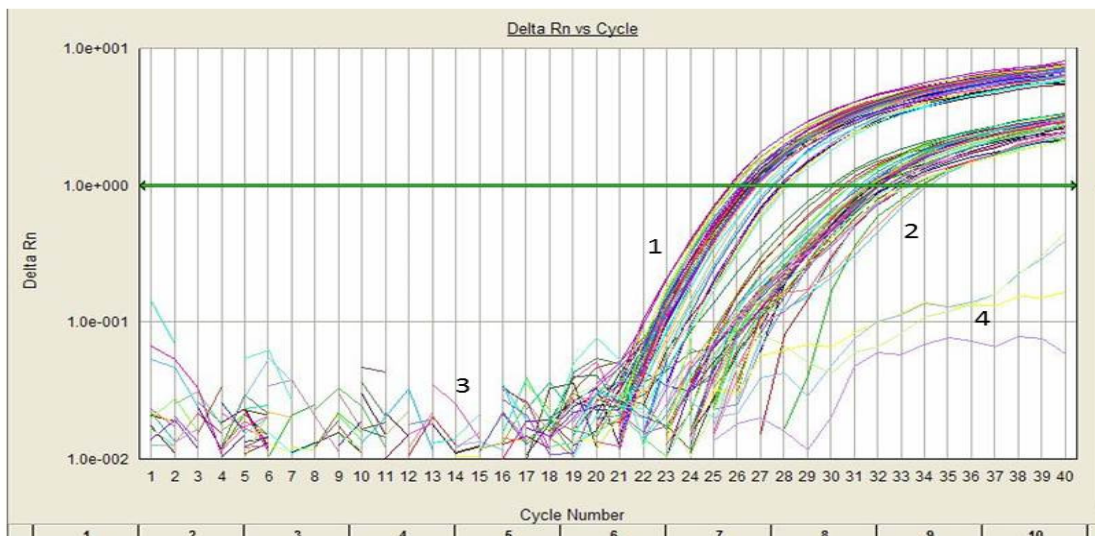
En aquest cas concret es va seleccionar com a normalitzador la *Ciclofilina A* (*Cyclophilin A, PPIA*; RefSeq. NM\_002046.3). Les *ciclofilines* (*Cyp40*) són proteïnes que s'uneixen a la ciclosporina i actuen com a immunosupressors. Tenen sobretot activitat *isomerasa peptidil-prolil* és a dir, catalitzen la isomerització de l'enllaç peptídic per formar enllaços *cis* a partir dels enllaços *trans* dels residus prolina, facilitant el replegament proteic. Actuen essencialment com a proteïnes *xaperones*. En el cas de la *isomerasa peptidil-prolil A* (*CypA* o *PPIA*) humana parlem d'una proteïna citosòlica que combina un full beta amb 2 hèlix alpha, interacciona amb la ciclosporina A i inhibeix la *fosfatasa dependent dels complexos Ca<sup>2+</sup>/calmodulina*. En qualsevol cas, s'estima que la seva expressió és constitutiva i relativament constant, independent de l'estat metabòlic de les cèl·lules, especialment útil en l'estudi dels canvis en els patrons d'expressió. Així doncs, per cada determinació s'analitzarà el control endogen.

El procés de la PCR consisteix en una sèrie de canvis de temperatura que es repeteixen 45 vegades anomenats cicles tèrmics (Cts). Cada cicle tèrmic té un mínim de 3 etapes: la primera, al voltant dels 95°C, permet la separació dels àcids nucleics de doble cadena, el segon a una temperatura al voltant dels 50-60°C, permet l'alineació dels encebadors al motle d'ADN; i el tercer a 68-72°C, facilita la polimerització per part de l'ADN polimerasa.

De la sigmoïdal resultant al llarg de 40 cicles d'amplificació (o cicles tèrmics, Ct) podem deduir un nivell d'expressió per gen i assaig, a partir dels cicles necessaris per assolir un llindar de fluorescència determinat (o *threshold*), definit normalment entre el valor de fluorescència màxim que assoleix la sigmoïdal i el de la fase de creixement exponencial. El valor Ct són els cicles necessaris per assolir aquest llindar i depèn de la quantitat inicial del transcrit analitzat de forma que, a més transcrit a la solució inicial (més expressió d'un gen determinat), menys Ct són necessaris per assolir aquest llindar. L' $\Delta Ct$  es calcula com la diferència entre el Ct del gen problema i el Ct del control endogen o gen de referència en una mateixa mostra. Els valors

representatius de l'expressió normalitzada dels diferents gens estudiats per cada mostra s'obtenen mitjançant la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001).

**Figura 9.** Amplificació dels transcrits de cDNA



*Corbes sigmoïdals Cts vs. Fluorescència* per l'amplificació dels transcrits cDNA d'un control endogen PPIA (1) i d'un gen diana, en aquest cas l'ACC (2), per un seguit de mostres obtingudes a partir de l'RNA, en aquest cas extret del teixit adipós de diversos pacients. Pels 2 assajos utilitzats, un *threshold* de 1.0 i un cicle inicial vàlid a partir de 18 cicles (3), resumeixen les condicions adients per l'anàlisi. Cal destacar la poca dispersió de les corbes mostra/pacient pel control endogen respecte a les del gen diana, tot i haver-ne carregat la mateixa quantitat de cDNA de partida (4).

Canvis relatius entre mostra (entre individus, teixits o tractaments) respecte al control endogen son determinats més tard a través de la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  segons les indicacions del proveïdor (Livak and Schmittgen, 2001), de forma que els valors d'expressió son expressats finalment com a *ràtio d'expressió relativa respecte a l'expressió del control endogen*, en aquest cas PPIA.



### 5.6.8. Kits, reactius i assajos comercials. Equipament

**Taula 1.** Assajos comercials desenvolupats i testats per Applied Biosystems (AB) per realitzar anàlisis d'expressió gènica mitjançant la tecnologia TaqMan® (primers i sondes)

<b>TaqMan®</b>	<b>Gen</b>	<b>Seq. de referència</b>
Hs99999904_m1	PPIA	NM_002046.3
Hs00153133_m1	PTGS2	NM_000963.2
Hs00193435_m1	HAS2	NM_005328.2
Hs01879841_s1	GREM1	NM_001191322.1 NM_001191323.1 NM_013372.6
Hs00240532_s1	ADRB2	NM_000024.5
Hs01554724_m1	DIO1	NM_213593.3
Hs00988260_m1	DIO2	NM_001007023.3 NM_001242502.1
Hs00956431_s1	DIO3	NM_001362.3
Hs00230861_m1	THRβ	NM_000461.4 NM_001128176.2 NM_001128177.1 NM_001252634.1

**Taula 2.** Parelles d'encebadors per l'anàlisi via SybrGreen® (primers i Sybr® Green, un fluorocrom específic pel marcatge del ssDNA sintetitzat de novo)

<b>Sybr® Green</b>	<b>Forward/Reverse Primers</b>
THRα1	5'-GTTCCCAGGACCCCATCCT/GGGTGAGTTGAGGGCATCTTC-3'
THRα2	5'-GGCCCCAACTCAAGTGTAC/CCTGGGAAACAGACTCATGCC-3'
PPIA	5'-CAAATGCTGGACCCAACACAA/CCTCCACAATATTCATGCCTTCTT-3'

## 5.7. VARIABLES ANALITZADES

### 5.7.1. Variables personals

- Edat en el moment de la punció. Anys. Variable discreta.
- Pes. Kg. Variable contínua. (2 decimals).
- Alçada. Metres. Variable contínua. (2 decimals).
- Índex de massa corporal (IMC). Kg/m<sup>2</sup>. Variable contínua. (2 decimals).
- Tabaquisme. Qualsevol quantitat. Binària.
- Nombre de fills previs de la dona. Discreta.
- Nombre d'avortaments espontanis. Discreta.
- Nombre d'avortaments voluntaris. Discreta.
- Antecedents personals (sense interès, endocrinològics, quirúrgics ginecològics, infecciosos, altres). Variable categòrica.
- Indicació principal de la FIV (factor ovulatori, tubàric, endometriosi, esterilitat d'origen desconegut, altres). Variable categòrica.
- Tractament mèdic (agonistes dopaminèrgics, fàrmacs antitiroïdals, betabloquejants, corticoïds, insulina, liti, amiodarona, perclorat, tiocianat, cap dels anteriors, altres). Variable categòrica.
- Determinació de l'índex de FSH en la darrera determinació analítica realitzada el 2n-5è dia del cicle. mUI/mL. Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de LH en la darrera determinació analítica realitzada el 2n-5è dia del cicle. mUI/mL. Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de 17-β-estradiol (E2) en la darrera determinació analítica realitzada el 2n-5è dia del cicle. pg/mL. Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de TSH en la darrera determinació analítica realitzada el 2n-5è dia del cicle. (UI/mL). Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de T4L en la darrera determinació analítica realitzada el 2n-5è dia del cicle. (ng/dl). Contínua. 2 decimals.

- Determinació de l'índex de PRL en la darrera determinació analítica realitzada el 2n-5è dia del cicle. (ng/ml). Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de FSH en el líquid fol·licular obtingut el dia de la ovulació. mUI/mL. Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de LH en el líquid fol·licular obtingut el dia de la ovulació. mUI/mL. Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de TSH en el líquid fol·licular obtingut el dia de la ovulació. (UI/mL). Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de T4L en el líquid fol·licular obtingut el dia de la ovulació. (ng/dl). Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de T3L en el líquid fol·licular obtingut el dia de la ovulació. (ng/dL). Contínua. 2 decimals.
- Determinació de l'índex de PRL en el líquid fol·licular obtingut el dia de la ovulació. (ng/ml). Contínua. 2 decimals.
- Expressió de deiodinasa *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* en cèl·lules endometrials. Contínua. 5 decimals.
- Expressió de deiodinasa *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* en cèl·lules cervicals uterines. Contínua. 5 decimals.
- Expressió de deiodinasa *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* en cèl·lules de la granulosa fol·liculars ovàriques. Contínua. 5 decimals.
- Expressió de *TRα1*, *TRα2*, *TRβ* i ràtio *TRα1:TRα2* en cèl·lules endometrials. Contínua. 5 decimals.
- Expressió de *TRα1*, *TRα2*, *TRβ* i ràtio *TRα1:TRα2* en cèl·lules cervicals uterines. Contínua. 5 decimals.
- Expressió de *TRα1*, *TRα2*, *TRβ* i ràtio *TRα1:TRα2* en cèl·lules de la granulosa fol·liculars ovàriques. Contínua. 5 decimals.
- Expressió dels gens *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i *ADRβ2* en cèl·lules endometrials. Contínua. 5 decimals.

- Expressió dels gens *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i *ADRβ2* en cèl.lules cervicals uterines. Contínua. 5 decimals.

Expressió dels gens *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2* i *ADRβ2* en cèl.lules de la granulosa fol.liculars ovàriques. Contínua. 5 decimals.

### 5.7.2. Variables de resultats

- Punció cancel.lada. Binària.
- Motiu de cancel.lació de la punció (petició pròpia, baixa resposta, risc d'hiperestimulació ovàrica, altres). Categòrica.
- Transferència cancel.lada. Binària.
- Motiu de cancel.lació de la transferència (petició pròpia, risc d'hiperestimulació ovàrica, no obtenció d'ovòcits madurs, endometri discordant, altres). Categòrica.
- Dosi total FSH (UI) rebuda. Discreta.
- Dosi total LH (UI) rebuda. Discreta.
- Inducció de l'ovulació amb agonista GnRH/hCG recombinant. Categòrica.
- Nombre de fol.licles superiors a 14 mm en el darrer control fol.licular. Discreta.
- Nombre d'ovòcits obtinguts. Discreta.
- Nombre d'ovòcits MII obtinguts. Discreta.
- Nombre d'embrions obtinguts. Discreta.
- Nombre de transferències realitzades en un sol cicle. Variable discreta.
- Nivells de  $\beta$ hCG superiors o iguals a 50 mUI/mL 12 dies posteriors a la transferència embrionària. Binària.
- Nivells de  $\beta$ hCG superiors a 0.1 i inferiors a 50 mUI/mL 12 dies posteriors a la transferència embrionària. Binària.
- Gestació clínica al finalitzar el cicle, determinada per l'observació d'embrió amb batec positiu a les 7 setmanes d'amenorrea. Binària.

### 5.7.3. Variables principals de valoració

- Expressió relativa de *TRα1*, *TRα2*, *TRβ*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2*, *ADRβ2*, *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* en cel.lularitat endometrial, cervical i granulosa ovàrica de dones fèrtils.
- Expressió relativa *TRα1*, *TRα2*, *TRβ*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2*, *ADRβ2*, *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* en cel.lularitat cervical i granulosa ovàrica de dones estèrils.

### 5.7.4. Variables secundàries de valoració

- Pronòstic reproductiu basat en el nombre de fol.licles >14mm en el darrer control fol.licular, nombre d'òcits, nombre d'òcits MII, embrions, gestació bioquímica i gestació evolutiva a les 7 setmanes d'amenorrea, en funció de l'expressió de *TRα1*, *TRα2*, *TRβ*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2*, *ADRβ2*, *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* a nivell cervical i cèl.lules de la granulosa ovàriques en el transcurs d'una estimulació ovàrica per fecundació *in vitro*, en una població femenina estèril.
- Pronòstic reproductiu basat en el nombre de fol.licles >14mm en el darrer control fol.licular, num oòcits, num oòcits MII, embrions, gestació bioquímica i gestació evolutiva (de la receptora) a les 7 setmanes d'amenorrea, en funció de l'expressió de *TRα1*, *TRα2*, *TRβ*, *GREM1*, *HAS2*, *PTGS2*, *ADRβ2*, *DIO1*, *DIO2* i *DIO3* a nivell cervical, endometrial i cèl.lules de la granulosa ovàriques en el transcurs d'una estimulació ovàrica per fecundació *in vitro*, en una població femenina donant d'òcits.

## 5.9. ANÀLISI DELS RESULTATS

S'han inclòs un total 82 dones, a 56 de les quals se'ls ha practicat 33 cicles d'hiperestimulació ovàrica controlada per fecundació *in vitro*, mentre que a 23, se'ls ha realitzat un protocol d'hiperestimulació ovàrica per tal de procedir a la donació d'ovòcits.

La taxa de gestació en el grup estèril ha estat del 38%, amb 13% de gestacions ectòpiques, 6% d'avortaments i 19% de gestacions evolutives.

Pel que fa al grup de donants d'òocits, hi ha hagut un 67% de gestacions entre les seves receptores, amb un 10% d'avortaments i 57% de gestacions evolutives més enllà de les 7 setmanes.

## 5.10. SISTEMES D'EMMAGATZEMAMENT I ORGANITZACIÓ

Totes les variables clíniques d'ambdós grups així com les determinacions sèriques, tissulars i els resultats reproductius s'han recollit i codificat en un arxiu específic de base de dades Excel, gràcies al qual posteriorment s'ha pogut analitzar i processar estadísticament mitjançant el paquet estadístic SPSS per a Windows.

## 5.11. TÈCNIQUES DE DEPURACIÓ

S'han utilitzat regles de validació per definir els valors introduïts en el programa de dades Excel. S'ha realitzat una primera revisió dels possibles errors que podrien alterar els resultats de l'estudi. Per a depurar la base de dades s'han calculat els següents estadístics descriptius per a cadascuna de les variables.

- *Freqüències absolutes* de cada una de les categories o valors que pren una variable per verificar que no hi ha cap valor fora dels valors lògics de la variable.
- El *mínim i el màxim* (variables numèriques) per a verificar que no existeixen valors extrems que sobrepassen o no arriben al rang lògic de la variable.

## 5.12. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Abans de procedir a les comparacions entre grups, s'ha avaluat la distribució normal i l'homogeneïtat de variàncies mitjançant el test de Levene. Els resultats obtinguts per les variables amb una distribució normal s'expressen amb la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard (SD). Els resultats referents a variables que no segueixen una distribució normal estan expressades segons la mediana  $\pm$  rang interquartílic. Per comparacions entre parelles de mostres s'ha dut a terme el test t per mostres independents, prèvia transformació logarítmica de les variables amb una distribució no paramètrica. La correlació lineal entre variables quantitatives s'ha analitzat amb models bivariats mitjançant el test de Pearson o el test de Spearman en funció de si la variable era paramètrica o no. També s'han realitzat anàlisis de regressió múltiple 'stepwise' controlant per edat i tabaquisme. Aquests models múltiples tenen en compte diverses variables independents per determinar el seu efecte en la dispersió d'una independent. En aquests models, beta és el coeficient de regressió estandarditzat que permet avaluar la importància relativa de la variable independent. L'R al quadrat multiplicada per cent permet expressar el percentatge de la variància explicada per les variables independents dels diferents models. L'anàlisi estadístic i els gràfics han estat realitzats amb el programa SPSS (versió 13.0; SPSS, Chicago, IL).

## 5.13. ASPECTES ÈTICS

El desenvolupament d'aquest projecte d'investigació s'ha ajustat als principis ètics per a la investigació mèdica sobre éssers humans establerts per la World Medical Association en la declaració d'Hèlsinki.

En tots els casos, els subjectes d'estudi han estat informats sobre el treball d'investigació i han accedit a participar-hi mitjançant un consentiment informat signat.

Totes les determinacions analítiques i exploracions complementàries són les pròpies del protocol d'estudi i seguiment de les tècniques de reproducció assistida, a excepció de la biòpsia endometrial i la citologia cervical, motiu pel qual l'estudi no ha suposat una sobrecàrrega d'exploracions.

Per la recollida de dades s'ha creat un programa informàtic que ha assegurat la confidencialitat de les dades sense incorporar cap informació que permeti la identificació de les dones. Les participants de l'estudi han estat codificades de tal forma que no hi ha possibilitat d'identificació fora de l'àmbit de la recerca.

#### **5.13.1. Selecció de donants**

Segons la llei 14/2006 del 26 de maig sobre tècniques de reproducció humana assistida, les donants han de tenir una edat compresa entre 18 i 35 anys, sense antecedents familiars de malalties de transmissió gènica, un estudi físic i psíquic dins de la normalitat, un estudi negatiu per a malalties de transmissió sexual i un cariotip 46 XX normal. Aquestes són sotmeses a una estimulació ovàrica i posteriorment a una captació oocitària en un procés regulat per la llei, de caràcter anònim i altruista, mitjançant el qual són compensades econòmicament pel temps i les molèsties derivades del tractament.





## 6. RESULTATS

---



## 6.1. CARACTERITZACIÓ DE LES COHORTS

Es van estudiar 23 dones fèrtils i 33 estèrils que van ser comparables en IMC. Les dones estèrils van ser significativament més grans ( $p < 0,0001$ ) i menys freqüentment fumadores que les dones fèrtils ( $p = 0,01$ ) (Taula 3).

Les concentracions hormonals plasmàtiques van ser determinades entre el segon i el cinquè dia del cicle menstrual, en absència d'estimulació hormonal. Ambdós grups (fèrtil i estèril) van mostrar concentracions similars de FSH, LH, E2, TSH i T4L perifèriques, mentre que les concentracions de PRL van ser superiors en les estèrils (4 dones estèrils amb concentracions  $> 25 \text{ ng/ml}$  versus 1 dona fèrtil) ( $p = 0,008$ ). Malgrat la detecció d'aquesta diferència cal dir que la mitjana de les concentracions de PRL es van mantenir en els dos grups dins dels límits de la normalitat. Un fet a tenir en compte és que les concentracions hormonals perifèriques de 5 dones fèrtils es van obtenir fora de la fase fol·licular i per aquest motiu no estan incloses a la Taula 3.

Les concentracions hormonals en líquid fol·licular van ser determinades el dia de la punció fol·licular, en fase periovulatòria i sota tractament d'estimulació ovàrica. Entre ambdues cohortes totes les concentracions van ser similars a excepció de les de LH, que van ser inferiors en el grup de dones estèrils ( $p < 0,0001$ ).

**Taula 3.** Mitjana d'edat dels subjectes, IMC, percentatge de dones fumadores i concentracions hormonals plasmàtiques i fol·liculars de les dones incloses a l'estudi, distribuïdes en dos grups (fèrtil i estèril)

	FÈRTIL <i>n</i>	Mitjana $\pm$ DS	ESTÈRIL <i>n</i>	Mitjana $\pm$ DS	<i>p</i>
<b>Edat</b> (anys)	23	26.82 $\pm$ 4.12	33	33.64 $\pm$ 3.20	<b>&lt;0.0001</b>
<b>IMC</b> (kg/m <sup>2</sup> )	23	22.93 $\pm$ 3.24	33	22.41 $\pm$ 3.01	0.542
<b>Tabac</b> (% fumadores)	19	63	33	27	<b>0.010</b>

**Taula 3.** Mitjana d'edat dels subjectes, IMC, percentatge de dones fumadores i concentracions hormonals plasmàtiques i fol·liculars (LF) de les dones incloses a l'estudi, distribuïdes en dos grups (fèrtil i estèril)

	FÈRTIL	Mitjana±DS	ESTÈRIL	Mitjana±DS	<i>p</i>
	<i>n</i>		<i>n</i>		
<b>FSH plasma</b> (mUI/mL)	18	6.12±1.54	33	6.99±1.85	0.097
<b>LH plasma</b> (mUI/mL)	18	6.52±2.68	33	5.25±1.93	0.089
<b>E2 plasma</b> (pg/mL)	18	57.16±71.91	33	58.90±26.95	0.708
<b>TSH plasma</b> (UI/mL)	18	1.67±0.57	33	2.06±0.89	0.104
<b>T4L plasma</b> (ng/dL)	18	1.21±0.12	32	1.30±0.17	0.069
<b>PRL plasma</b> (ng/mL)	18	11.99±7.80	32	18.03±7.27	<b>0.008</b>
<b>FSH LF</b> (mUI/mL)	20	7.02±2.72	32	7.71±2.91	0.401
<b>LH LF</b> (mUI/mL)	21	3.60±2.15	33	0.95±1.18	<b>&lt;0.0001</b>
<b>TSH LF</b> (UI/mL)	20	1.62±0.56	31	1.90±0.72	0.146
<b>T4L LF</b> (ng/dL)	20	1.22±0.12	32	1.24±0.18	0.675
<b>T3L LF</b> (nmol/L)	20	3.19±0.28	32	3.17±0.30	0.831
<b>PRL LF</b> (ng/mL)	20	30.58±14.52	32	36.68±14.88	0.153

Al comparar les concentracions de FSH, TSH i T4L entre sang perifèrica i líquid fol·licular es va observar que eren similars en ambdós compartiments i en els 2 grups de subjectes. En canvi, les concentracions de LH van ser inferiors al líquid fol·licular en relació al plasma, i les de PRL superiors, tant en el grup fèrtil com en el grup estèril (Taula 4).

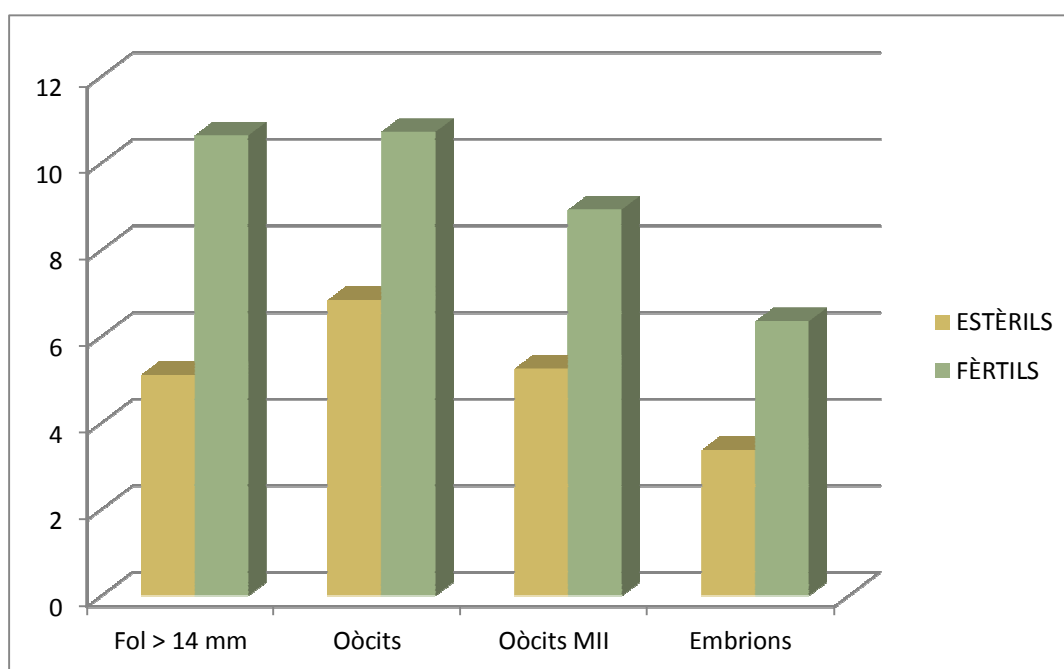
**Taula 4.** Diferències entre concentracions de les hormones analitzades en plasma i líquid fol·licular, en les dones estèrils, fèrtils i en tots els subjectes

		<i>n</i>	Mitjana±DS L.FOL.LICULAR	Mitjana±DS PLASMA	<i>p</i>
<b>ESTÈRILS</b>	<b>FSH</b> (mUI/mL)	32	7.71±2.91	6.99±1.85	0.221
	<b>LH</b> (mUI/mL)	33	0.95±1.18	5.25±1.93	<b>&lt;0.0001</b>
	<b>TSH</b> (UI/mL)	31	1.90±0.72	2.06±0.89	0.520
	<b>T4L</b> (ng/dL)	32	1.24±0.18	1.30±0.17	0.55
	<b>PRL</b> (ng/mL)	32	36.68±14.88	18.03±7.27	<b>&lt;0.0001</b>
<b>FÈRTILS</b>	<b>FSH</b> (mUI/mL)	18	7.02±2.72	6.12±1.54	0.248
	<b>LH</b> (mUI/mL)	18	3.60±2.15	6.52±2.68	<b>0.03</b>
	<b>TSH</b> (UI/mL)	18	1.62±0.56	1.67±0.57	0.554
	<b>T4L</b> (ng/dL)	18	1.22±0.12	1.21±0.12	0.909
	<b>PRL</b> (ng/mL)	18	30.58±14.52	11.99±7.80	<b>&lt;0.0001</b>
<b>GLOBAL</b>	<b>FSH</b> (mUI/mL)	50	7.467±2.872	6.657±1.818	0.089
	<b>LH</b> (mUI/mL)	51	1.794±1.979	5.664±2.291	<b>&lt;0.0001</b>
	<b>TSH</b> (UI/mL)	49	1.789±0.669	1.915±0.819	0.398
	<b>T4L</b> (ng/dL)	50	1.231±0.168	1.278±0.162	0.076
	<b>PRL</b> (ng/mL)	50	35.11±15.14	15.77±8.077	<b>&lt;0.0001</b>

La dosi de FSH requerida per assolir una estimulació ovàrica adequada en cada subjecte va ser similar en ambdós grups (2626.59±607.47UI en fèrtils, *versus* 2816.64±718.43UI en estèrils) ( $p=0.312$ ), mentre que la de LH va ser superior en el grup estèril (703.79±447.43UI *versus* 40.91±191.88UI) ( $p<0.0001$ ).

En relació als resultats de la punció fol·licular, la mitjana de fol·licles >14mm el darrer control ecogràfic va ser de 10.64±6.499 pel grup fèrtil vs 5.12±2.98 pel grup estèril ( $p<0.0001$ ); el nombre d'òocits obtinguts de 10.72±6.46 en les fèrtils vs 6.85±5.90 en les estèrils ( $p=0.002$ ); el d'òocits en metafase II de 8.92±5.30 en fèrtils i 5.26±4.46 en estèrils ( $p<0.0001$ ) i el d'embrions de 6.35±4.04 i 3.38±3.32, respectivament ( $p=0.001$ ) (Figura 10).

**Figura 10.** Resultats del tractament d'estimulació ovàrica en termes de nombre de fol·licles >14 mm el darrer control ecogràfic, nombre d'òcits totals, òcits en metafase II i nombre d'embrions obtinguts en ambdues cohorts.



Els òcits aspirats van ser utilitzats pel procediment posterior de fecundació *in vitro*. La taxa d'obtenció d'embrions a partir d'aquests òcits va ser similar en el grup estèril i en el grup fèrtil (Taula 5). La taxa d'èxit de la fecundació *in vitro* va ser avaluada a través de la concentració de  $\beta$ HCG plasmàtica el 12è dia de la transferència embrionària ( $\beta$ HCG>50 mUI/mL), que va ser superior en el grup fèrtil així com la gestació evolutiva a les 7 setmanes d'amenorrea. En canvi, la taxa de gestació ectòpica va ser superior al grup estèril mentre que la taxa d'avortament clínic va ser similar en els dos grups.

**Taula 5.** Resultats del tractament de fecundació in vitro en ambdues cohorts

	FÈRTIL	Mitjana	ESTÈRIL	Mitjana	<i>p</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Obtenció embrions	23	82	33	72	0.411
$\beta$ HCG>50 (mUI/mL)	23	67	33	38	<b>0.001</b>
Avortament	23	10	33	6	0.666
Gestació ectòpica	23	0	33	13	<b>0.044</b>
Gestació evolutiva	23	57	33	19	<b>0.003</b>

## 6.2. ANÀLISI DELS RESULTATS DEL PRIMER OBJECTIU

*Analitzar les diferències en l'expressió dels receptors tiroïdals TR $\alpha$ , TR $\beta$  i les deiodinases D1-D2-D3, en cèl.lules de la granulosa ovàriques periovlutòries i cèl.lules cervicals uterines, entre una població estèril i una fèrtil sotmeses a cicles d'estimulació ovàrica per fecundació in vitro.*

### 6.2.1. Expressió gènica dels paràmetres de funció intracel.lular hormonal tiroïdal en la població fèrtil i estèril

En 5 dones del grup fèrtil i 1 dona del grup estèril no es va poder determinar la totalitat dels gens degut a que en alguns casos no es va obtenir prou RNA en les mostres, i en altres, a que no es va disposar de suficient cel.lularitat pel seu processament.



Es va detectar de forma significativa l'expressió de tots els gens estudiats (*TRα1*, *TRα2*, *TRβ* i *D1-D2-D3*) tant en cèl.lules de la granulosa com cervicals, en ambdues poblacions (fèrtil i estèril) (Taula 6).

En cèl.lules cervicals es va observar una major expressió relativa de *TRα1* en relació a *TRα2* i al mateix temps, d'aquest sobre *TRβ*, tant en el grup fèrtil com l'estèril. En canvi en cèl.lules de la granulosa l'expressió de *TRα1* va ser similar a la de *TRα2*.

Una troballa a destacar va ser la sobreexpressió de *TRα2* en el grup estèril en comparació amb el grup fèrtil tant en cèl.lules de la granulosa com cervicals. En cèl.lules cervicals aquesta troballa es va acompanyar d'un augment de l'expressió de *TRα1* en dones estèrils.

En relació a les deiodinases es va detectar expressió de les tres variants gèniques, amb predominància de *D3* sobre *D2* i d'aquesta sobre *D1* en ambdues poblacions i tipus cel.lulars.

Un resultat remarcable és que l'expressió de *D3* en cèl.lules de la granulosa va ser significativament més alta a dones fèrtils mentre que en cèl.lules cervicals no es van observar diferències.

**Taula 6.** *Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl.lules de la granulosa periovlutòries i cervicals uterines en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A (PPIA))*

		FÈRTIL	Mediana (Rang interquartíl.lic)	ESTÈRIL	Mediana (Rang interquartíl.lic)	p
		n		n		
CÈL.LULES	<i>TRα1</i>	18	0.1405(0.1925-0.4947)	31	0.2070(0.1480-0.3370)	0.431
GRANULOSA	<i>TRα2</i>	18	0.2360(0.1515-4.4415)	31	0.5160(0.3450-0.6780)	<b>&lt;0.0001</b>
	<i>TRα1:α2</i>	18	0.6072(0.0908-1.4236)	31	0.4379(0.3272-0.5494)	0.496
	<i>TRβ</i>	18	0.0035(0.0027-0.0045)	31	0.0080(0.0020-0.0140)	0.123
	<i>D1</i>	18	0.0000(0.0000-0.0000)	31	0.0000(0.0000-0.0000)	0.657
	<i>D2</i>	18	0.0010(0.0010-0.0020)	31	0.0020(0.0010-0.0030)	0.196
	<i>D3</i>	18	0.7035(0.0945-2.0157)	31	0.1060(0.0340-0.1610)	<b>0.011</b>

**Taula 6.** *Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl.lules de la granulosa perioovulatòries i cervicals uterines en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A (PPIA))*

		FÈRTIL	Mediana (Rang interquartil.lic)	ESTÈRIL	Mediana (Rang interquartil.lic)	<i>p</i>
		<i>n</i>		<i>n</i>		
<b>CÈL.LULES</b>	<b><i>TRα1</i></b>	15	3.6530(1.0370-17.824)	32	21.376(7.0105-62.452)	<b>0.020</b>
<b>CERVICALS</b>	<b><i>TRα2</i></b>	15	0.4690(0.3500-0.7840)	32	0.7285(0.4150-1.2075)	<b>0.028</b>
	<b><i>TRα1:α2</i></b>	15	7.7889(2.4121-31.540)	32	25.910(7.2774-97.346)	0.380
	<b><i>TRβ</i></b>	15	0.0820(0.0260-0.4200)	32	0.1285(0.0667-0.1210)	0.171
	<b><i>D1</i></b>	15	0.0000(0.0000-0.0010)	32	0.0000(0.0000-0.0010)	0.905
	<b><i>D2</i></b>	15	0.0390(0.0120-0.2170)	32	0.0945(0.0247-0.4520)	0.249
	<b><i>D3</i></b>	15	12.007(1.5900-48.027)	31	32.050(9.4640-66.523)	0.108

En un anàlisi de regressió múltiple, corregint per les variables edat i tabaquisme, es van observar diferències en l'expressió de *TRα2* ( $p=0.029$ , 23.9% de la varianza) i en l'expressió de *D3* ( $p=0.024$ , 11.6% de la varianza) en CG entre dones fèrtils i estèrils. Aquest mateix anàlisi en CC, no va mostrar diferències entre grups, en relació a l'expressió de *TRα1* i *TRα2*.

Per concloure es va observar una associació positiva entre l'expressió gènica del receptor *TRα2* en cèl.lules de la granulosa ovàriques perioovulatòries i l'edat de la dona, independentment del seu grau de fertilitat (Spearman  $r=0.364$ ,  $p=0.01$ ,  $n=49$ ).

Donat que en tractar-se d'un receptor 'orfe', l'expressió de *TRα2* s'associa a una disminució de l'acció intracel.lular de les hormones tiroïdals, es va voler avaluar si a nivell dels tipus cel.lulars estudiats aquests receptors s'associen a diferències en l'expressió d'altres paràmetres d'acció intracel.lular hormonal tiroïdal.

### 6.3. RESULTATS DEL SEGON OBJECTIU

*Analitzar si l'expressió dels gens TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\beta$  i D1-D2-D3, en cèl.lules de la granulosa ovàriques periovulatòries, cèl.lules cervicals uterines i cèl.lules endometrials, s'associen a altres paràmetres relacionats amb la funció tiroïdal intracel.lular com són la concentració circulant i intrafol.licular d'hormones tiroïdals i l'expressió del receptor adrenèrgic (ADR $\beta$ 2).*

#### 6.3.1. Resultats en cèl.lules de la granulosa

En cèl.lules de la granulosa es va objectivar que de forma paral.lela a la major expressió de TR $\alpha$ 2 en el grup estèril, hi havia una menor expressió de ADR $\beta$ 2 i de D3 (Taula 7).

*Taula 7. Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl.lules de la granulosa en fase periovulatòria en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A (PPIA))*

		FÈRTIL	Mediana (Rang interquartíl.lic)	ESTÈRIL	Mediana (Rang interquartíl.lic)	<i>p</i>
		<i>n</i>		<i>n</i>		
<b>CÈL.LULES</b>	<b>TR<math>\alpha</math>2</b>	18	0.2360(0.1515-4.4415)	31	0.5160(0.3450-0.6780)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>GRANULOSA</b>	<b>ADR<math>\beta</math>2</b>	19	0.0102(0.0027-0.0185)	31	0.0002(0.0006-0.0044)	<b>0.001</b>
	<b>D3</b>	18	0.7035(0.0945-2.0157)	31	0.1060(0.0340-0.1610)	<b>0.011</b>

En la taula 8 s'observen les principals associacions entre els diferents paràmetres de funció tiroïdal a nivell cel.lular en cèl.lules de la granulosa. Les dades més destacables corresponen a l'associació inversa entre l'expressió de TR $\alpha$ 2 amb ADR $\beta$ 2 i D3. Altres

associacions remarcables són les que van mantenir  $TR\beta$  i especialment  $ADR\beta 2$ , amb  $D3$ , en aquest cas positives.

L'associació  $ADR\beta 2-D3$  va ser tan significativa que es va mantenir tant en el grup fèrtil com l'estèril, per separat. En el grup estèril l'associació  $TR\beta-D3$  també es va conservar, tot i la menor població d'estudi ( $n=31$ ).

**Taula 8.** Estudi d'associacions entre paràmetres d'expressió gènica de funció intracel.lular hormonal tiroïdal i  $ADR\beta 2$  en cèl.lules de la granulosa, determinats en la població fèrtil i estèril estudiades conjuntament ( $n=49$ ). La significació ( $p$ ) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman ( $r$ )

	$n=49$		$TR\alpha 1/\alpha 2$	ARNm $TR\alpha 1$	ARNm $TR\alpha 2$	ARNm $TR\beta$	ARNm $ADR\beta 2$	ARNm [D1]	ARNm [D2]
	CÈL.LULES GRANULOSA	ARNm $TR\alpha 1$	$r$ $p$	0.834 <0.0001	- -	- -	- -	- -	- -
	ARNm $TR\alpha 2$	$r$ $p$	-0.135 0.362	0.210 0.148	- -	- -	- -	- -	- -
	ARNm $TR\beta$	$r$ $p$	-0.227 0.121	-0.151 0.300	-0.043 0.768	- -	- -	- -	- -
	ARNm $ADR\beta 2$	$r$ $p$	0.118 0.441	0.059 0.698	-0.431 <b>0.003</b>	0.211 0.160	- -	- -	- -
	ARNm [D1]	$r$ $p$	-0.019 0.898	0.040 0.786	0.103 0.480	-0.061 0.675	-0.069 0.698	- -	- -
	ARNm [D2]	$r$ $p$	-0.192 0.191	-0.032 0.830	0.193 0.183	0.080 0.585	-0.001 0.996	0.133 0.361	- -
	ARNm [D3]	$r$ $p$	0.107 0.467	0.021 0.884	-0.395 <b>0.005</b>	0.298 <b>0.038</b>	0.822 <0.0001	-0.084 0.568	-0.031 0.831

L'anàlisi d'associacions entre l'expressió gènica dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular en cèl.lules de la granulosa i les concentracions hormonals intrafol.liculars de FSH, LH, PRL, TSH, T4L i T3L no van demostrar cap associació destacable.

Es va realitzar una altra anàlisi d'associacions entre l'expressió dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular en cèl.lules de la granulosa i la *dosi total de gonadotropines administrades* observant-se associacions positives entre la dosi total de LH administrada i l'expressió de  $TR\alpha 2$  (Spearman  $r=0.472$ ,  $p=0.001$ ) i  $D2$  ( $r=0.380$ ,  $p=0.007$ ), així com entre FSH i  $D2$  ( $r=0.367$ ,  $p=0.009$ ).

### 6.3.2. Resultats en cèl.lules cervicals

En cèl.lules cervicals (taula 9) no es va observar el que succeïa en cèl.lules de la granulosa on de forma paral.lela a la major expressió de  $TR\alpha 2$  en el grup estèril, hi havia una menor expressió de  $ADR\beta 2$  i de  $D3$ . No obstant es va mantenir la sobreexpressió de  $TR\alpha 2$  en el grup estèril en relació al grup fèril.

**Taula 9.** *Valors d'expressió relativa (unitats arbitràries) en cèl.lules cervicals uterines en ambdues cohorts, expressats com a ràtio en relació al control endogen (ciclofilina A (PPIA))*

		FÈRIL	Mediana (Rang interquartil.lic)	ESTÈRIL	Mediana (Rang interquartil.lic)	<i>p</i>
		<i>n</i>		<i>n</i>		
CÈL.LULES	$TR\alpha 2$	15	0.4690(0.3500-0.7840)	32	0.7285(0.4150-1.2075)	<b>0.028</b>
CERVICALS	$ADR\beta 2$	14	0.4617(0.2671-0.6259)	24	0.5763(0.2996-1.0215)	0.380
	$D3$	15	12.007(1.5900-48.027)	31	32.050(9.4640-66.523)	0.108

En l'estudi realitzat en cèl.lules cervicals (taula 10) es va observar de nou l'associació positiva entre  $TR\alpha 1/\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$  ( $r=0.564$ ,  $p<0.0001$ ) i entre  $TR\alpha 1/\alpha 2$  i  $D3$  ( $r=0.532$ ,  $p<0.0001$ ). L'associació inversa entre  $TR\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$  no va ser significativa a nivell de tota la població però sí que ho va ser en el grup estèril estudiat aïlladament (Spearman  $r=-0.482$ ,  $p=0.027$ ). La resta d'associacions significatives amb  $TR\alpha 2$  van correspondre a  $TR\beta$  ( $r=0.284$ ,  $p<0.0001$ ),  $D1$  ( $r=0.428$ ,  $p=0.003$ ) i  $D2$  ( $r=0.306$ ,

p=0.037) en aquest cas, positives. Entre  $ADR\beta 2$ -D3 ( $r=0.711$ ,  $p<0.0001$ ) i entre  $TR\beta$ -D3 ( $r=0.386$ ,  $p=0.008$ ) va tornar a haver-hi associació positiva i significativa. Segons aquestes troballes es van tornar a observar associacions robustes entre l'expressió dels receptors tiroïdals, les deiodinases i els adrenorreceptors de manera concordant amb el que s'havia observat en cèl.lules de la granulosa.

**Taula 10.** Estudi d'associacions entre paràmetres d'expressió gènica de funció intracel.lular hormonal tiroïdal i  $ADR\beta 2$  en cèl.lules cervicals, determinats en la població fèrtil i estèril estudiades conjuntament ( $n=47$ ). La significació ( $p$ ) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman ( $r$ )

	$n=47$		$TR\alpha 1/\alpha 2$	ARNm $TR\alpha 1$	ARNm $TR\alpha 2$	ARNm $TR\beta$	ARNm $ADR\beta 2$	ARNm [D1]	ARNm [D2]
	ARNm	$r$							
CÈL.LULES CERVICALS	$TR\alpha 1$	$p$	0.087 <b>&lt;0.0001</b>	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	$TR\alpha 2$	$p$	-0.434 <b>0.002</b>	-0.112 0.455	- -	- -	- -	- -	- -
	$TR\beta$	$p$	0.002 0.988	0.133 0.373	0.284 <b>&lt;0.0001</b>	- -	- -	- -	- -
	$ADR\beta 2$	$p$	0.564 <b>&lt;0.0001</b>	0.481 <b>0.003</b>	-0.264 0.126	0.066 0.706	- -	- -	- -
	[D1]	$p$	-0.321 <b>0.028</b>	-0.122 0.413	0.428 <b>0.003</b>	0.258 0.080	-0.229 0.185	- -	- -
	[D2]	$p$	0.093 0.535	0.050 0.739	0.306 <b>0.037</b>	0.544 <b>&lt;0.0001</b>	-0.062 0.722	0.236 0.111	- -
	[D3]	$p$	0.532 <b>&lt;0.0001</b>	0.568 <b>&lt;0.0001</b>	-0.061 0.688	0.386 <b>0.008</b>	0.711 <b>&lt;0.0001</b>	0.191 0.204	0.408 <b>0.005</b>

Es va realitzar una altra anàlisi d'associacions entre l'expressió dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular en cèl.lules cervicals i la *dosi total de gonadotropines administrades* sense observar cap associació entre aquestes.

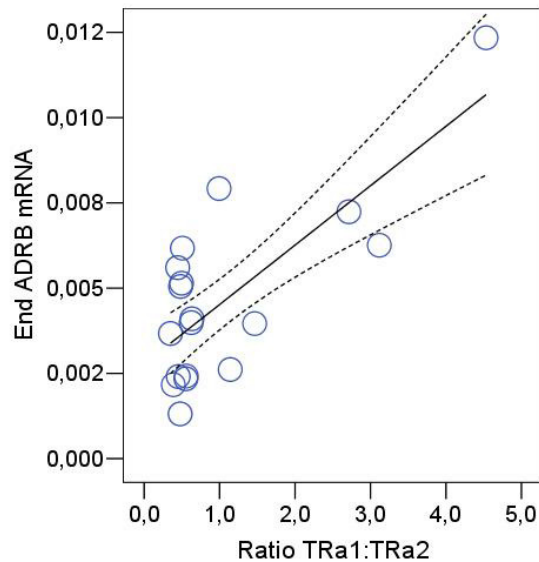
### 6.3.3. Resultats en cèl.lules endometrials

Com s'ha especificat en la metodologia, per qüestions clíniques només es va poder disposar de cel.lularitat endometrial de la cohort de dones fèrtils (Taula 11). Tot i la petita població estudiada (n=19), a l'endometri es va seguir observant l'associació negativa entre  $TR\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$ , i positiva i concordant entre  $TR\alpha 1/TR\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$  (Figura 11). També es va observar igual que en els altres tipus cel.lulars, associació entre  $TR\alpha 1$  i  $D3$ . Segons aquestes troballes es pot afirmar que en cèl.lules endometrials existeixen de nou associacions entre l'expressió dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lulars, entre sí ( $TR$  i *deiodinases*) i amb l'adrenoreceptor  $ADR\beta 2$ .

**Taula 11.** Estudi d'associacions entre paràmetres d'expressió gènica intracel.lular hormonal tiroïdal i  $ADR\beta 2$  en cèl.lules endometrials, determinats en la població fèrtil (n=19). La significació (p) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman (r)

	n=19		$TR\alpha 1:\alpha 2$	ARNm $TR\alpha 1$	ARNm $TR\alpha 2$	ARNm $TR\beta$	ARNm $ADR\beta 2$	ARNm [D1]	ARNm [D2]
	<b>CÈL.LULES ENDOMETRIALS</b>	ARNm $TR\alpha 1$	r p	0.667 <b>0.002</b>	- -	- -	- -	- -	- -
	ARNm $TR\alpha 2$	r p	-0.763 <b>&lt;0.0001</b>	-0.148 0.558	- -	- -	- -	- -	- -
	ARNm $TR\beta$	r p	-0.520 <b>0.033</b>	-0.575 <b>0.016</b>	0.218 0.400	- -	- -	- -	- -
	ARNm $ADR\beta 2$	r p	0.515 <b>0.035</b>	0.349 0.170	-0.542 <b>0.025</b>	0.068 0.803	- -	- -	- -
	ARNm [D1]	r p	-0.211 0.510	-0.494 0.103	-0.189 0.557	0.455 0.147	-0.072 0.825	- -	- -
	ARNm [D2]	r p	-0.422 0.092	-0.494 <b>0.044</b>	0.157 0.548	0.581 0.140	-0.318 0.231	0.596 <b>0.041</b>	- -
	ARNm [D3]	r p	0.520 <b>0.032</b>	0.792 <b>&lt;0.0001</b>	-0.162 0.535	-0.248 0.338	0.469 0.067	-0.569 0.053	-0.478 0.052

**Figura 11.** Gràfica que mostra la relació lineal entre la ràtio TR $\alpha$ 1/TR $\alpha$ 2 en cèl.lules endometrials i l'expressió de l'adrenoreceptor ADR $\beta$ 2 en la població fèrtil ( $r=0,515$ ,  $p=0,035$ ,  $n=19$ )



Posteriorment es va realitzar una altra anàlisi d'associacions entre l'expressió dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular i la *dosi total de gonadotropines* administrades, sense observar cap associació entre aquests en cèl.lules endometrials.

#### **6.3.4. Expressió gènica dels paràmetres de funció intracel.lular hormonal tiroïdal en cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials, i concentració hormonal perifèrica**

En la taula 12 es mostra l'estudi d'associacions entre els paràmetres de funció tiroïdal intracel.lular i la concentració hormonal perifèrica en els tres tipus cel.lulars. En *cèl.lules de la granulosa* es va observar que a major expressió de TR $\alpha$ 2 hi havia major concentració de FSH, PRL i T4L, essent aquestes associacions més significatives en dones fèrtils que estèrils. No obstant a major expressió d'ADR $\beta$ 2 i D3 es va observar



una menor concentració de PRL i T4L. Aquesta associació torna a deixar constància de la relació inversa que existeix entre l'expressió del receptor  $TR\alpha 2$  amb  $ADR\beta 2$  i  $D3$ .

En cèl.lules cervicals es va tornar a demostrar una associació positiva entre l'expressió de  $TR\alpha 2$  i la concentració circulat de PRL i TSH. Aquestes associacions (tant amb PRL com amb TSH) es van mantenir fins i tot treient dos casos extrems de l'anàlisi.

En cèl.lules endometrials una nova associació positiva entre  $TR\alpha 2$  i TSH, i una altra concordant i negativa entre  $ADR\beta 2$  i TSH, van córrer en paral.lel a les troballes en cèl.lules de la granulosa i cervicals. Cal assenyalar que en aquestes cèl.lules hi va tornar a haver associació gairebé significativa entre  $TR\alpha 2$  i PRL ( $r=0.475$ ,  $p=0.074$ ).

**Taula 12.** Estudi d'associacions entre expressió gènica en cèl.lules de la granulosa, cèl.lules cervicals (de les dues cohorts) i endometrials (del grup fèrtil), i concentracions hormonals circulants. La significació ( $p$ ) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman ( $r$ )

			FSH	LH	E2	PRL	TSH	T4L
<b>CÈL.LULES GRANULOSA</b> <i>n=47</i>	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.048	-0.042	-0.001	0.058	-0.042	-0.105
	<b>TR<math>\alpha</math>1</b>	<b>p</b>	0.749	0.781	0.993	0.705	0.783	0.493
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.410	-0.129	0.037	0.308	0.209	0.370
	<b>TR<math>\alpha</math>2</b>	<b>p</b>	<b>0.005</b>	0.394	0.807	<b>0.040</b>	0.163	<b>0.012</b>
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.036	-0.186	-0.072	0.190	0.063	0.051
	<b>TR<math>\beta</math></b>	<b>p</b>	0.813	0.215	0.636	0.211	0.676	0.738
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.139	-0.019	-0.162	-0.381	-0.133	-0.372
	<b>ADR<math>\beta</math>2</b>	<b>p</b>	0.347	0.899	0.270	<b>0.008</b>	0.369	<b>0.009</b>
<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.116	-0.050	-0.078	0.066	0.153	0.130	
<b>[D1]</b>	<b>p</b>	0.442	0.741	0.606	0.668	0.308	0.393	
<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.024	-0.183	-0.118	0.085	0.173	0.027	
<b>[D2]</b>	<b>p</b>	0.875	0.223	0.435	0.580	0.249	0.249	
<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.136	-0.101	-0.015	-0.334	-0.007	-0.359	
<b>[D3]</b>	<b>p</b>	0.367	0.505	0.919	<b>0.025</b>	0.963	<b>0.015</b>	

**Taula 12.** Estudi d'associacions entre expressió gènica en cèl.lules de la granulosa, cèl.lules cervicals (de les dues cohorts) i endometrials (del grup fèrtil), i concentracions hormonals circulants. La significació (p) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman (r)

			FSH	LH	E2	PRL	TSH	T4L
<b>CÈL.LULES CERVICALS n=47</b>	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.128	0.088	-0.029	0.210	0.118	0.091
	<b>TRα1</b>	<b>p</b>	0.409	0.569	0.850	0.177	0.445	0.561
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.075	-0.069	0.039	0.395	0.324	-0.069
	<b>TRα2</b>	<b>p</b>	0.627	0.656	0.800	<b>0.009</b>	<b>0.032</b>	0.662
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.135	0.164	-0.251	-0.004	0.172	-0.149
	<b>TRβ</b>	<b>p</b>	0.382	0.289	0.101	0.982	0.264	0.341
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.041	-0.106	0.082	-0.084	-0.161	0.211
	<b>ADRβ2</b>	<b>p</b>	0.814	0.544	0.638	0.638	0.355	0.214
<b>CÈL.LULES ENDOMETRIALS n=19</b>	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.050	-0.087	0.117	0.055	0.019	-0.266
	<b>[D1]</b>	<b>p</b>	0.746	0.574	0.450	0.725	0.903	0.084
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.009	-0.054	-0.268	-0.037	0.010	-0.091
	<b>[D2]</b>	<b>p</b>	0.953	0.726	0.078	0.813	0.948	0.560
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.078	-0.051	-0.073	-0.033	-0.022	-0.044
	<b>[D3]</b>	<b>p</b>	0.621	0.743	0.642	0.833	0.887	0.780
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.168	0.206	-0.013	-0.452	-0.311	0.150
	<b>TRα1</b>	<b>p</b>	0.549	0.462	0.965	0.091	0.259	0.594
<b>CÈL.LULES ENDOMETRIALS n=19</b>	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.029	-0.193	-0.004	0.475	0.639	-0.170
	<b>TRα2</b>	<b>p</b>	0.919	0.491	0.990	0.074	<b>0.010</b>	0.544
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.099	0.121	0.116	0.090	0.297	0.075
	<b>TRβ</b>	<b>p</b>	0.737	0.681	0.692	0.759	0.303	0.798
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.130	-0.007	0.077	-0.424	-0.618	0.139
	<b>ADRβ2</b>	<b>p</b>	0.659	0.982	0.794	0.131	<b>0.019</b>	0.635
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	-0.215	0.243	-0.388	-0.562	0.049	0.116
	<b>[D1]</b>	<b>p</b>	0.551	0.499	0.267	0.091	0.894	0.749
<b>CÈL.LULES ENDOMETRIALS n=19</b>	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.090	0.147	-0.125	0.007	0.371	0.161
	<b>[D2]</b>	<b>p</b>	0.759	0.615	0.670	0.982	0.191	0.582
	<b>ARNm</b>	<b>r</b>	0.308	0.312	0.125	-0.207	-0.070	0.022
	<b>[D3]</b>	<b>p</b>	0.284	0.277	0.669	0.478	0.811	0.940

Degut a les relacions observades en l'expressió dels paràmetres de funció intracel·lular hormonal tiroïdal a nivell de les cèl·lules de la granulosa, cervicals i endometrials en dones fèrtils i estèrils es va voler analitzar si aquests paràmetres s'associen a variacions en l'expressió dels gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* que, tal i com s'ha vist en la introducció, estan relacionats amb millors qualitat embrionària, resposta inflamatòria cervical per la promoció de la fertilitat i receptivitat endometrial.

## **6.4. RESULTATS DEL TERCER OBJECTIU**

*Analitzar si l'expressió dels gens associats a fertilitat *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* es relaciona amb variacions en l'expressió gènica dels paràmetres de funció intracel·lular hormonal tiroïdal *TR $\alpha$* , *TR $\beta$*  i *D1-D2-D3* en cèl·lules de la granulosa ovàriques, cèl·lules cervicals uterines i cèl·lules endometrials.*

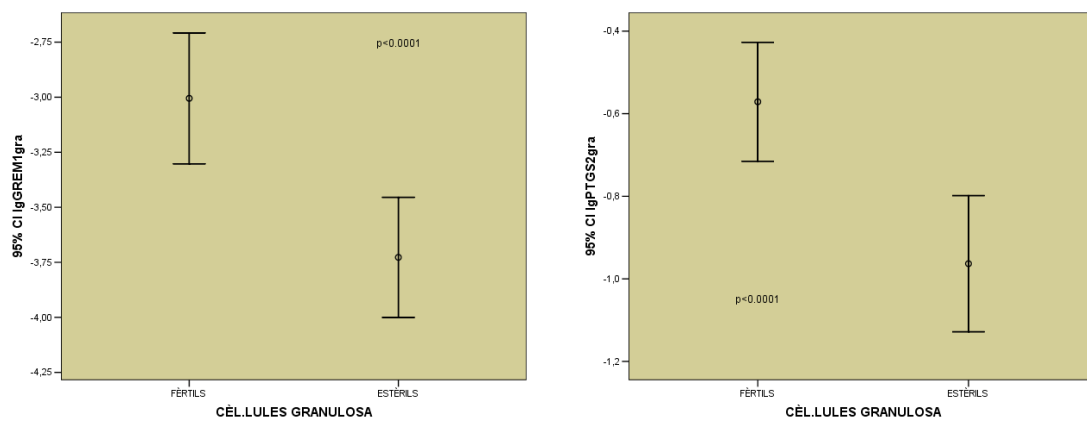
### **6.4.1. Expressió gènica de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl·lules de la granulosa i cervicals**

En cèl·lules de la granulosa es va detectar un augment d'expressió dels factors associats a qualitat oocitària *GREM1* i *PTGS2* en el grup de dones fèrtils en relació al grup estèril (Figura 12). No obstant pel que fa a les cèl·lules cervicals, el grup estèril va expressar més *GREM1* que el grup fèril (Taula 13).

**Taula 13.** Diferències d'expressió dels gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa periovulatòries i cervicals uterines en el grup fèrtil i estèril, relatiu a (PPIA)

		FÈRTIL	Mediana (Rang interquartil.lic)	ESTÈRIL	Mediana (Rang interquartil.lic)	<i>p</i>
		<i>n</i>		<i>n</i>		
CÈL.LULES GRANULOSA	<i>GREM1</i>	19	0.0010 (0.0005-0.0033)	31	0.0001 (0.0001-0.0004)	<0.0001
	<i>HAS2</i>	18	0.0023 (0.0015-0.0070)	31	0.0028 (0.0014-0.0078)	0.764
	<i>PTGS2</i>	19	0.2382 (0.1975-0.3463)	31	0.1015 (0.0652-0.1582)	<0.0001
CÈL.LULES CERVICALS	<i>GREM1</i>	14	0.0526 (0.0367-0.1264)	23	0.1174 (0.0567-0.1869)	0.042
	<i>HAS2</i>	13	0.0023 (0.0008-0.0058)	18	0.0026 (0.0004-0.0016)	0.936
	<i>PTGS2</i>	14	0.7687 (0.2532-7.8000)	24	1.0851 (0.1975-13.119)	0.672

**Figura 12.** Gràfiques que mostren les diferències d'expressió entre *GREM1* ( $p < 0.0001$ ) i *PTGS2* ( $p < 0.0001$ ) entre la població fèrtil i estèril en cèl.lules de la granulosa



#### 6.4.2. Associacions entre l'expressió gènica dels paràmetres intracel·lulars de funció tiroïdal i l'expressió dels gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2*

En l'estudi realitzat en *cèl·lules de la granulosa* (Taula 14), el gen *GREM1* va demostrar, de manera paral·lela a les associacions prèviament descrites, associació inversa amb l'expressió de *TR $\alpha$ 2* i positiva amb l'expressió de *D3* i *ADR $\beta$ 2*, mentre que el gen *PTGS2* va mostrar relació inversa amb l'expressió de *TR $\alpha$ 2* i positiva amb *ADR $\beta$ 2*. Aquestes associacions serien concordants amb el fet que a major funció tiroïdal a nivell intracel·lular hi hauria una major expressió d'aquests gens associats a millor qualitat oocitària.

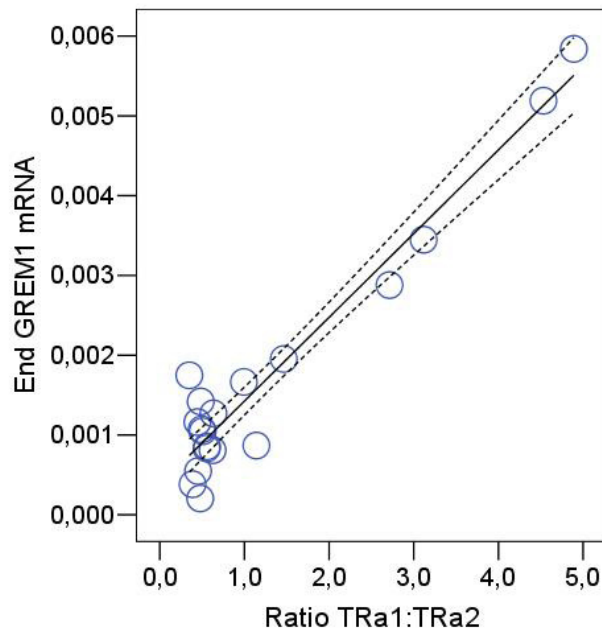
En *cèl·lules cervicals* es va trobar associació positiva i concordant a les troballes anteriors, entre *GREM1*, *TR $\alpha$ 1*, *ADR $\beta$ 2* i *D3*. En relació al gen *HAS2* va existir associació inversa amb *TR $\alpha$ 1* i *ADR $\beta$ 2*, i positiva amb *D1*. Al mateix temps i referent a l'expressió de *PTGS2* en *cèl·lules cervicals*, va haver associació inversa entre aquest i l'expressió de *TR $\beta$* . D'acord al que s'ha comentat en la introducció, l'expressió dels gens *HAS2* i *PTGS2* a nivell cervical, s'han associat a la resposta inflamatòria necessària per a la promoció de la fertilitat, mentre que l'expressió del gen *GREM1*, que és la que en aquest cas ha sortit concordant amb l'augment de la funció tiroïdal a nivell intracel·lular, no s'ha relacionat, fins el moment actual, amb aquesta facultat.

Les associacions en *cèl·lules endometrials* tornen a posar de manifest la relació positiva entre *GREM1* i el rati *TR $\alpha$ 1/TR $\alpha$ 2*, així com *TR $\beta$*  i *ADR $\beta$ 2*, i inversa amb *TR $\alpha$ 2*, de forma concordant amb les troballes prèvies. Les troballes relatives a *GREM1* en *cèl·lules endometrials* suggereixen novament la relació existent entre la funció tiroïdal a nivell cel·lular i la capacitat implantatòria de les mateixes. El gen *PTGS2* ha mostrat també una associació, aquest cop positiva, amb *TR $\alpha$ 2*.

**Taula 14.** Estudi d'associacions en cèl.lules de la granulosa ovàriques, cervicals uterines i endometrials, entre l'expressió de receptors tiroïdals, deiodinases i els gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2*. La significació (*p*) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman (*r*)

CÈL.LULES GRAN. n=49		<i>TRα1/ TRα2</i>	<i>ARNm TRα1</i>	<i>ARNm TRα2</i>	<i>ARNm TRβ</i>	<i>ARNm ADRβ2</i>	<i>ARNm [D1]</i>	<i>ARNm [D2]</i>	<i>ARNm [D3]</i>
<i>ARNm GREM1</i>	<i>r</i>	0.189	0.155	-0.384	0.184	0.944	-0.040	-0.003	0.782
	<i>p</i>	0.215	0.304	<b>0.008</b>	0.221	<b>&lt;0.0001</b>	0.794	0.982	<b>&lt;0.0001</b>
<i>ARNm HAS2</i>	<i>r</i>	-0.194	-0.106	0.131	-0.001	-0.038	-0.074	0.036	-0.045
	<i>p</i>	0.207	0.488	0.389	0.994	0.794	0.629	0.812	0.770
<i>ARNm PTGS2</i>	<i>r</i>	-0.161	-0.274	-0.474	-0.173	0.397	0.154	0.001	0.239
	<i>p</i>	0.291	0.066	<b>0.001</b>	0.250	<b>0.004</b>	0.307	0.993	0.110
CÈL.LULES CERV. n=47		<i>TRα1/ TRα2</i>	<i>ARNm TRα1</i>	<i>ARNm TRα2</i>	<i>ARNm TRβ</i>	<i>ARNm ADRβ2</i>	<i>ARNm [D1]</i>	<i>ARNm [D2]</i>	<i>ARNm [D3]</i>
<i>ARNm GREM1</i>	<i>r</i>	0.730	0.615	-0.246	-0.116	0.831	-0.212	-0.131	0.622
	<i>p</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.161	0.512	<b>&lt;0.0001</b>	0.228	0.459	<b>&lt;0.0001</b>
<i>ARNm HAS2</i>	<i>r</i>	-0.488	-0.286	0.208	-0.279	-0.394	0.476	0.252	-0.310
	<i>p</i>	<b>0.008</b>	<b>0.042</b>	0.288	0.150	<b>0.028</b>	<b>0.011</b>	0.195	0.115
<i>ARNm PTGS2</i>	<i>r</i>	-0.168	-0.162	-0.114	-0.385	0.011	0.079	-0.241	-0.201
	<i>p</i>	0.334	0.352	0.513	<b>0.023</b>	0.946	0.651	0.164	0.254
CÈL.LULES ENDOM. n=19		<i>TRα1/ TRα2</i>	<i>ARNm TRα1</i>	<i>ARNm TRα2</i>	<i>ARNm TRβ</i>	<i>ARNm ADRβ2</i>	<i>ARNm [D1]</i>	<i>ARNm [D2]</i>	<i>ARNm [D3]</i>
<i>ARNm GREM1</i>	<i>r</i>	0.633	0.431	-0.715	0.748	0.748	0.422	-0.314	0.300
	<i>p</i>	<b>0.005</b>	0.074	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.172	0.220	0.241
<i>ARNm HAS2</i>	<i>r</i>	0.077	0.068	-0.001	-0.273	-0.273	-0.026	-0.188	0.157
	<i>p</i>	0.760	0.788	0.997	0.288	0.288	0.935	0.471	0.547
<i>ARNm PTGS2</i>	<i>r</i>	-0.300	0.061	0.496	-0.187	-0.181	-0.113	-0.404	0.206
	<i>p</i>	0.226	0.810	<b>0.036</b>	0.486	0.486	0.726	0.107	0.428

**Figura 13.** Figura que reflecteix la relació lineal entre la ràtio TR $\alpha$ 1/TR $\alpha$ 2 en cèl.lules endometrials i l'expressió del gen associat implantació embrionària GREM1 ( $r=0.633$ ,  $p=0.005$ ,  $n=19$ )



En relació a l'estudi d'associacions entre les *concentracions hormonals intrafol·liculars* i l'expressió de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa, no es van observar associacions rellevants. Tampoc va existir cap associació significativa entre l'expressió d'aquests gens i la *dosi de gonadotropines rebuda*, així com entre aquests i l'edat de les dones, en cap tipus cel·lular estudiat (CG, CC i CE).

#### **6.4.3. Estudi d'associacions entre la concentració hormonal perifèrica i l'expressió dels gens GREM1, HAS2 i PTGS2**

Com es pot observar en la taula 15, de l'estudi d'associacions realitzat entre les concentracions hormonals circulants i l'expressió dels gens associats a fertilitat en *cèl.lules de la granulosa*, se'n desprèn que *GREM1* té associació inversa amb la concentració perifèrica de PRL i T4L, i que *HAS2* té la mateixa associació negativa, amb la d'estradiol.

En cèl.lules cervicals no van existir associacions en aquest nivell, mentre que en cèl.lules endometrials va tornar a haver associació inversa entre *GREM1* i les concentracions plasmàtiques de PRL i TSH.

**Taula 15.** Estudi d'associacions entre l'expressió gènica de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials, i les concentracions hormonals circulants realitzades en tota la població. La significació (*p*) s'ha obtingut mitjançant la correlació de Spearman (*r*)

			FSH	LH	E2	PRL	TSH	T4L
CÈLS. GRANULOSA  n=47	<i>ARNm GREM1</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.144 0.330	-0.084 0.569	-0.224 0.125	-0.434 <b>0.002</b>	-0.116 0.433	-0.327 <b>0,023</b>
	<i>ARNm HAS2</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.111 0.457	0.071 0.637	-0.316 <b>0.030</b>	0.181 0.228	0.278 0.058	0.010 0.949
	<i>ARNm PTGS2</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.120 0.417	0.193 0.190	0.068 0.645	-0.178 0.231	0.167 0.256	-0.180 0.221
CÈLS. CERVICALS  n=47	<i>ARNm GREM1</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.125 0.480	-0.206 0.244	0.088 0.620	0.024 0.894	-0.043 0.809	0.249 0.163
	<i>ARNm HAS2</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.173 0.379	0.055 0.782	0.056 0.778	-0.070 0.723	-0.146 0.460	0.134 0.506
	<i>ARNm PTGS2</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.201 0.247	0.047 0.788	0.215 0.214	0.136 0.442	-0.076 0.664	0.049 0.784
CÈLS. ENDOMETRIALS  n=19	<i>ARNm GREM1</i>	<i>r</i> <i>p</i>	0.036 0.899	0.118 0.676	0.175 0.533	-0.586 <b>0.022</b>	-0.718 <b>0.003</b>	0.154 0.583
	<i>ARNm HAS2</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.070 0.805	0.232 0.405	-0.399 0.141	-0.163 0.562	-0.086 0.761	-0.011 0.970
	<i>ARNm PTGS2</i>	<i>r</i> <i>p</i>	-0.021 0.940	-0.107 0.704	-0.343 0.211	0.221 0.428	0.332 0.226	-0.352 0.199

Finalment com a darrer objectiu es va voler avaluar la presència de diferències en l'expressió dels paràmetres de funció intracel.lular hormonal tiroïdal entre la població que havia obtingut gestació i la que no.



## 6.5. RESULTATS DEL QUART OBJECTIU

*Analitzar les diferències en l'expressió de TR $\alpha$ , TR $\beta$  i D1-D2-D3 en cèl.lules de la granulosa del fol.licle ovàric periovulatori i cèl.lules cervicals uterines entre la població estèril que no ha obtingut gestació i el grup fèrtil, els oòcits de les quals han donat lloc a gestació.*

### 6.5.1. Expressió gènica intracel.lular hormonal tiroïdal i resultat gestacional

No es va trobar cap diferència en els paràmetres d'expressió gènica de funció intracel.lular hormonal tiroïdal en CC i CG de dones fèrtils i estèrils, després del tractament inductor de l'ovulació. Així mateix, l'estudi comparatiu d'expressió gènica dels paràmetres de funció tiroïdal intracel.lular realitzat entre el grup que va obtenir gestació i el que no en va obtenir (independentment de la cohort a la que pertanyessin) no va mostrar tampoc, cap tipus de diferència significativa. No obstant sí que es van trobar diferències en l'expressió d'aquests paràmetres al fer l'anàlisi entre el grup de dones fèrtils amb resultat de gestació, i el grup de dones estèrils sense gestació al final del cicle de fecundació *in vitro* (Taula 16). Les dones estèrils amb  $\beta$ HCG<50 mUI/mL al final del tractament van presentar major expressió de TR $\alpha$ 2 en cèl.lules de la granulosa, mentre que la d'ADR $\beta$ 2, D3, GREM1 i PTGS2 va estar disminuïda en aquest grup, en relació a les dones fèrtils, els ovòcits de les quals van donar lloc a gestació ( $\beta$ HCG>50mUI/mL el dia 12 de la transferència embrionària). En cèl.lules cervicals, també es va observar una major expressió de TR $\alpha$ 2 així com de D2 en el grup estèril sense gestació, en comparació amb el grup fèrtil els oòcits de les quals van obtenir un resultat favorable.

**Taula 16.** Estudi d'expressió gènica en cèl.lules de la granulosa i cervicals, realitzat en la població fèrtil amb resultat de  $\beta$ HCG >50 mUI/mL (en la receptora), i en la població estèril amb  $\beta$ HCG <50 mUI/mL el dia 12 de la transferència embrionària. Expressats com a ràtio relativa al control endogen ciclofilina A (PPIA)

		FÈRTILS GESTACIÓ	Mediana (Rang interquartíl.lic)	ESTÈRIL NO GESTA.	Mediana (Rang interquartíl.lic)	p
		n		n		
EDAT	Mit.±DS	12	26.8±4.5	27	34.1±3.0	<b>&lt;0.0001</b>
TABAC	(SI/NO)	11	7/4	27	8/19	0,052
CÈLS.	<b>TR<math>\alpha</math>1</b>	12	0.1405(0.0215-0.3965)	24	0.2145(0.1315-0.3640)	0.402
GRA.	<b>TR<math>\alpha</math>2</b>	12	0.2335(0.1405-0.4790)	24	0.5130(0.3290-0.7147)	<b>0.017</b>
	<b>TR<math>\beta</math></b>	12	0.0035(0.0033-0.0040)	24	0.0090(0.0020-0.0162)	0.280
	<b>ADR<math>\beta</math>2</b>	11	0.0126(0.0027-0.0263)	24	0.0013(0.0005-0.0047)	<b>0.008</b>
	<b>D1</b>	12	0.0000(0.0000-0.0000)	24	0.0000(0.0000-0.0000)	0.782
	<b>D2</b>	12	0.0010(0.0010-0.0020)	24	0.0020(0.0010-0.0052)	0.232
	<b>D3</b>	12	0.7700(0.0735-2.8530)	24	0.1140(0.0302-0.1745)	<b>0.034</b>
	<b>GREM1</b>	11	0.0014(0.0005-0.0042)	24	0.0002(0.0001-0.0004)	<b>0.003</b>
	<b>HAS2</b>	10	0.0037(0.0020-0.0074)	24	0.0027(0.0010-0.0075)	0.571
	<b>PTGS2</b>	11	0.2301(0.1975-0.5321)	24	0.1067(0.0622-0.1735)	<b>0.002</b>
CÈLS.	<b>TR<math>\alpha</math>1</b>	9	3.4080(1.0625-39.307)	25	20.809(6.048-58.8465)	0.140
CERV.	<b>TR<math>\alpha</math>2</b>	9	0.2605 (0.4580-0.6395)	25	0.6940(0.4190-1.1030)	<b>0.033</b>
	<b>TR<math>\beta</math></b>	9	0.0730(0.0090-0.2590)	25	0.1150(0.0375-0.2070)	0.216
	<b>ADR<math>\beta</math>2</b>	8	0.4204(0.1782-0.8639)	19	0.6242(0.3439-0.8706)	0.360
	<b>D1</b>	9	0.0000(0.0000-0.0000)	25	0.0000(0.0000-0.0010)	0.099
	<b>D2</b>	9	0.0210(0.0070-0.0510)	25	0.0930(0.0245-0.4520)	<b>0.015</b>
	<b>D3</b>	9	4.8200(1.0225-65.535)	24	26.123(8.2682-59.790)	0.210
	<b>GREM1</b>	8	0.0896(0.0297-0.1370)	19	0.1187(0.0562-0.1830)	0.243
	<b>HAS2</b>	8	0.0015(0.0007-0.0059)	15	0.0012(0.0004-0.0131)	0.846
	<b>PTGS2</b>	8	1.6150(0.4501-11.901)	19	0.9727(0.2017-16.223)	0.937

L'anàlisi de regressió multivariant posterior va mostrar que en CG es mantenia la diferència de *TRα2* entre grups després d'ajustar-la per edat i hàbit tabàquic (12.9%,  $p=0.023$ ). Les diferències en l'expressió de *D3* entre grups van mostrar una tendència ( $p=0.08$ ) tot i que no significativa, mentre que la resta de paràmetres entre grups, no es van mantenir significatius.

## 6.6. COMPLICACIONS

En tots els cicles de tractament realitzats va haver-hi dos casos d'hiperestimulació ovàrica lleu que no van requerir ingrés, ambdós en el grup de dones estèrils. El tractament realitzat en aquestes, amb l'objectiu de prevenir-ne la progressió, va ser la inducció de l'ovulació mitjançant un agonista de la GnRH i la congelació embrionària per tal de postposar-ne la transferència. En el mateix grup de pacients hi va haver tres gestacions ectòpiques post-transferència embrionària que van requerir salpinguectomia laparoscòpica. Una d'elles ja tenia antecedent de salpinguectomia contralateral per gestació extrauterina. En el grup de donants d'òvuls no es va documentar cap complicació. Les extraccions sanguínies, les citologies cervicals i les biòpsies endometrials de les donants van transcórrer sense incidències.

## 7. DISCUSSIÓ

---



La finalitat d'aquest estudi era valorar l'expressió dels receptors hormonals tiroïdals ( $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$  i  $TR\beta$ ) i les deiodinases ( $D1$ ,  $D2$  i  $D3$ ) com a uns dels mecanismes de la funció tiroïdal a nivell intracel·lular, en dones fèrtils i estèrils sotmeses a tractament inductor de l'ovulació per fecundació *in vitro*. Les troballes més importants en relació als objectius van ser en primer lloc, l'augment de l'expressió del receptor  $TR\alpha 2$  així com la disminució de l'expressió de la deiodinasa  $D3$  en cèl·lules de la granulosa ovàriques de la cohort de dones estèrils. En aquesta mateixa cohort, es va observar major expressió de  $TR\alpha 1$  i  $TR\alpha 2$  en cèl·lules cervicals en relació al grup fèrtil en el contexte d'una major edat i/o tabaquisme. En segon lloc es va observar una sòlida associació entre l'expressió dels receptors  $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$ ,  $TR\beta$  i la del marcador adrenèrgic de funció tiroïdal  $ADR\beta 2$  així com la de  $D3$  en cèl·lules de la granulosa, cervicals i endometrials de tota la població estudiada. En tercer lloc es va demostrar l'associació entre l'expressió dels gens implicats en la fertilitat  $GREM1$ ,  $HAS2$  i  $PTGS2$ , i la dels paràmetres de funció intracel·lular hormonal tiroïdal  $TR\alpha$ ,  $TR\beta$ ,  $ADR\beta 2$ , i  $D1$ - $D3$  en cèl·lules de la granulosa de les dues poblacions. Finalment es va observar que la població estèril sense gestació al final del tractament, expressava major quantitat de  $TR\alpha 2$  en cèl·lules de la granulosa que la població fèrtil els oòcits de les quals van donar lloc a gestació. Aquesta mateixa població estèril va expressar menor quantitat d' $ADR\beta 2$ ,  $D3$ ,  $GREM1$  i  $HAS2$  en cèl·lules de la granulosa, i major quantitat de  $TR\alpha 2$  i  $D2$  en cèl·lules cervicals que el grup fèrtil amb resultat favorable, en el contexte d'una major edat i/o tabaquisme.

El conjunt d'aquestes troballes suggereix que els paràmetres associats al metabolisme intracel·lular de les hormones tiroïdals en cèl·lules de la granulosa ovàriques i cèl·lules cervicals uterines són diferents en dones fèrtils i estèrils i que, al mateix temps, aquests s'associen a diferències en la resposta al tractament de fecundació *in vitro*.

### **Troballes generals**

Les concentracions hormonals perifèriques de FSH, LH, 17- $\beta$ -E2, TSH i T4L determinades durant la fase fol·licular del cicle menstrual van ser similars en ambdós grups, no sent així les concentracions de PRL que van ser superiors en les dones estèrils ( $p=0.008$ ). L'augment de la PRL en el grup estèril estaria en concordància amb el fet que la hiperprolactinèmia s'ha relacionat amb una disminució de la capacitat reproductiva. No obstant, tot i aquestes diferències observades, els valors resultants es troben dins del límits de la normalitat ( $11.99\pm 7.80$  ng/mL en el grup fèrtil i  $18.03\pm 7.27$  ng/mL en el grup estèril). Altres concentracions a ressaltar serien les de FSH en les dones estèrils, que es troben augmentades un 11,4% respecte les fèrtils ( $6.12\pm 1.54$  mUI/mL *versus*  $6.99\pm 1.85$  nUI/MI), tot i que també es troben dins dels marges considerats normals.

En relació a les concentracions hormonals periovulatòries en líquid fol·licular de FSH, TSH, T4L, T3L i PRL, van ser comparables en ambdós grups (fèrtil i estèril). No obstant, la LH va mostrar unes concentracions significativament inferiors en el grup de les dones estèrils ( $3.60\pm 2.15$  mUI/mL *versus*  $0.95\pm 1.18$  mUI/mL,  $p<0.0001$ ). Malgrat que la determinació hormonal en líquid fol·licular no s'ha realitzat de manera individualitzada per cada fol·licle, el fet que la concentració de LH sigui superior en el grup de dones fèrtils és concordant amb el que hi ha escrit a la literatura, on ha quedat establert que els fol·licles que contenen oòcits que donaran lloc a embrions amb una major taxa d'implantació es caracteritzen per tenir unes concentracions de LH superiors a les dels fol·licles que no donen lloc a gestació; el mateix succeeix amb els fol·licles dels quals derivaran embrions transferits *versus* oòcits/embrions descartats (Mendoza *et al*, 2002). L'activitat de LH necessària per al normal desenvolupament oocitari no està del tot establerta, però s'estima que no és gaire elevada donat que només cal que l'1% dels seus receptors estiguin ocupats per tal de permetre una correcta esteroidogènesi (Chappel and Howles, 1991).

Paradoxalment, en la literatura consultada ha quedat establert que les concentracions de FSH entre fol·licles que contenen oòcits que donaran lloc a gestació i els que no, són similars. En aquest treball, les concentracions intrafol·liculars de FSH en el grup estèril i el fèril també han estat similars ( $7.02 \pm 2.72$  mUI/mL en fèrils i  $7.71 \pm 2.91$  mUI/mL en estèrils,  $p=0.401$ ). S'ha de tenir en compte que els estudis publicats al respecte (Mendoza *et al*, 2002) provenen de dones estimulades amb FSHu, HMGu i hCGu, prèvia administració d'un anàleg agonista de la GnRH (leuprorelina) pauta diferent a la utilitzada en les cohorts de l'estudi (FSHu/rec  $\pm$  LHu/rec + anàleg antagonista GnRH).

Tot i l'exhaustiva búsqueda bibliogràfica per tal d'esbrinar quina és la concentració hormonal de FSH, LH, PRL, TSH i T4L intrafol·liculars òptimes per a la consecució de gestació, l'única conclusió a la que s'ha pogut arribar és que encara està per determinar, així com que els mecanismes cel·lulars i moleculars que relacionen les concentracions hormonals intrafol·liculars amb la qualitat oocitària, no estan tampoc establerts.

En l'estudi comparatiu entre les *determinacions hormonals plasmàtiques i les fol·liculars*, les concentracions de FSH, TSH i T4L van presentar una correlació entre ambdós compartiments, tant en dones fèrils com estèrils. No obstant, es va detectar una disminució de LH en líquid fol·licular, així com una major concentració de PRL en relació al plasma, tant en el grup de dones estèrils com en el grup fèril.

Degut a que el líquid fol·licular està constituït per productes del plasma sanguini que atravessen la barrera sang-fol·licle i per derivats del metabolisme de les cèl·lules tecals i de la granulosa, la concentració de pèptids específics i proteïnes en el líquid fol·licular es pot considerar com el reflexe d'aquesta transferència, influenciada pel metabolisme de les estructures fol·liculars. En relació al transport de proteïnes plasmàtiques, la barrera sang-fol·licle ha resultat ser permeable a proteïnes amb massa molecular  $<500$  kDa (Schweigert *et al*, 2006). Cal recordar que totes les



hormones estudiades en aquest treball tenen un pes molecular inferior a aquest tamany. Addicionalment a la massa molecular, la càrrega de les proteïnes també afectaria a aquesta transferència cap al líquid fol·licular (Hess *et al*, 1998) juntament amb els llocs d'unió hormonals de la membrana plasmàtica, la família de transportadors (MCT) i l'equilibri intra/extracel·lular de les proteïnes transportadores (Ashkar *et al*, 2010).

En relació a les concentracions de TSH plasmàtiques i fol·liculars, un treball de De Silva (De Silva *et al*, 1994) va demostrar igual que aquest, una correlació positiva entre les concentracions perifèriques i fol·liculars de dones, en aquest cas en tractament amb un protocol llarg amb agonista i inducció de l'ovulació amb hCG humana. De la mateixa manera, en aquest estudi també s'han observat unes concentracions de T4L fol·liculars concordants a les plasmàtiques. Aquesta troballa és paral·lela a la d'Ashkar, que degut a les variacions intrafol·liculars d'hormones tiroïdals de T4 i T3 lliures i totals observades al llarg d'un cicle d'estimulació ovàrica realitzat en vaques va concloure (Ashkar *et al*, 2010) que l'estatus fisiològic dels fol·licles antrals bovins afectarien a l'acumulació de T4 total en el líquid fol·licular i que l'hiperestimulació ovàrica augmentaria els nivells circulants de T4 lliures així com el contingut fol·licular de T4 total.

En l'intent d'explicar la disminució de la concentració de LH fol·licular en relació a la perifèrica s'han dut a terme anàlisis d'associacions on no s'ha pogut trobar relació ni amb la dosi de LH administrada ni amb el fàrmac utilitzat per a la inducció de l'ovulació (hCG recombinant o triptorelina). En el grup fèrtil, a més dosi de LH administrada es detecta major concentració de LH fol·licular (el mateix succeeix amb la FSH) mentre que en el grup estèril la relació és inversa. Pel que fa al fàrmac inductor de l'ovulació es podria especular que l'administració de l'agonista de la GnRH (en les fèrtils) podria estar relacionada amb l'augment de la LH fol·licular, fet que es podria atribuir a l'efecte *flare up*, no obstant, de ser així també s'hauria d'observar un augment de la FSH fol·licular, fet que no succeeix. Es desconeixen els fenòmens que justifiquen aquestes troballes, tot i que per explicar-les, amb molta

probabilitat s'hauria d'aprofundir en els múltiples mecanismes del transport intrafol·licular.

En la revisió que s'ha dut a terme per tal de justificar aquestes diferències de LH i PRL entre compartiments, no s'ha trobat cap article on es comparin les concentracions hormonals plasmàtiques i intrafol·liculars de dones sotmeses als protocols d'estimulació utilitzats en aquest estudi, tot i que s'han descrit múltiples variacions a nivell d'aquestes hormones entre valors plasmàtics i en líquid fol·licular, en funció de les dosis de utilitzades, vies d'administració (sc. vs im.), activitat de gonadotropines endògenes i diversitat de fenòmens fisiològics (Fleming *et al*, 1996). No obstant, una explicació per l'augment de la PRL seria que així com les concentracions intrafol·liculars de FSH i LH depenen majoritàriament de les concentracions circulants, les de GH i PRL a més, estan subordinades a la producció local (Revelli *et al*, 2009).

## **7.1. OBJECTIU 1: DIFERÈNCIES EN L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS TIROÏDALS $TR\alpha$ , $TR\beta$ I LES DEIODINASES $D1$ , $D2$ I $D3$ EN CÈL·LULES DE LA GRANULOSA OVÀRIQUES PERIOVULATÒRIES I CÈL·LULES CERVICALS UTERINES, ENTRE LA POBLACIÓ ESTÈRIL I FÈRTIL**

La importància de l'avaluació dels tres subtipus de receptor tiroïdal ( $TR\alpha1$ ,  $TR\alpha2$  i  $TR\beta$ ) radica en què així com  $TR\alpha1$  i  $TR\beta$  actuen com a veraders receptors capaços de regular la transcripció gènica després d'unir-se a T3 (Stavreus *et al*, 2012),  $TR\alpha2$  és un receptor 'orfe' incapaç d'activar la transcripció gènica antagonitzant per tant, l'acció de la triiodotironina (Macchia *et al*, 2001). Un estudi de Forrest *et al* (Forrest *et al*, 1996) demostra que les femelles de ratolins amb  $TR\alpha1$  i  $TR\beta$  inactivats rarament s'embarassen, i si ho fan no poden amamentar els seus cadells, fet que demostra la

importància d'aquestes dues vies en els processos reproductius femenins. Les deiodinases per altra banda, són enzims molt importants en la regulació de les hormones tiroïdals i les seves activitats en els teixits. D1 es considera la principal productora de T3 circulant (Pavelka *et al*, 1997) amb una funció a nivell d'òrgans genitals encara desconeguda, D2 també catalitza, tot i que en menor mesura, la conversió de T4 a T3, mentre que D3 està considerada com l'inactivador fisiològic de les hormones tiroïdals.

La troballa de l'expressió dels receptors  $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$  i  $TR\beta$  a nivell de cèl.lules endometrials de la cohort de dones fèrtils, i cèl.lules de la granulosa i cervicals dels grups fèrtil i estèril, implica que aquests són capaços de respondre directament a T3 i suggereix per tant, que les hormones tiroïdals intervenen en la diferenciació cel.lular funcional i morfològica necessàries per als mecanismes reproductius, a nivell dels tres tipus cel.lulars. Més enllà, l'expressió concomitant dels 3 tipus de deiodinases en cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials, fet que només succeeix en cervell, cerebel, ovari, testicles, pell, endometri i placenta (Bates *et al*, 1999) suggereix que aquests teixits disposen d'un metabolisme tiroïdal complex, preparat per a mantenir un control estricte sobre les concentracions hormonals de T3 intracel.lulars, òptims per al desenvolupament de cada teixit.

Així com l'expressió d'aquests gens en cèl.lules de la granulosa (Wakim *et al*, 1993 i 1994; Zhang *et al*, 1997; Rae *et al*, 2007; Aghajanova, 2009) i endometrials humanes (Kirkland *et al*, 1983; Allan *et al*, 2003; Wasco *et al*, 2003; Barber *et al*, 2005; Kester *et al*, 2006; Aghajanova *et al*, 2010) està descrita en aproximadament una desena d'articles, no s'ha trobat cap publicació que faci referència a la seva existència en cèl.lules cervicals uterines. Per aquest motiu, les troballes en aquest nivell es poden considerar originals i per tant, no poden ser contrastades.

### 7.1.1. Expressió de receptors tiroïdals i deiodinases en cèl.lules de la granulosa

Malgrat que no es poden establir comparacions amb els treballs prèviament relacionats degut a que la majoria d'aquests estudis no han estat realitzats en dones en tractament inductor de l'ovulació, els resultats obtinguts i els prèviament descrits permeten afirmar que, el fet que en cèl.lules de la granulosa existeixi expressió dels tres tipus de receptors horomonal tiroïdals estudiats, suggereix que les hormones T4 i T3 intervenen en la regulació de la fol.liculogènesi, l'esteroidogènesi i la síntesi de líquid fol.licular.

L'anàlisi d'expressió gènica dels *receptors horomonal tiroïdals* en cèl.lules de la granulosa de tota la població estudiada conjuntament, va evidenciar una preponderància de *TR $\alpha$ 1* sobre *TR $\beta$* . Aquesta troballa és concordant amb la publicació de Wakim *et al* (Wakim *et al*, 1993) basada en estudis immunohistoquímics en cèl.lules humanes, i amb la de Sechman *et al* (Sechman *et al*, 2009) realitzada mitjançant tècniques de RT-PCR en cèl.lules de la granulosa de gallines. En relació al receptor *TR $\alpha$ 2* també se'n va detectar la seva expressió, amb tecnologia de RT-PCR, igual que fan Zhang *et al* (Zhang *et al*, 1997) i Aghajanova (Aghajanova, 2009).

En l'estudi comparatiu dels receptors horomonal tiroïdals en cèl.lules de la granulosa realitzat entre les dues cohorts (dones fèrtils i estèrils), es van observar diferències a nivell d'expressió de *TR $\alpha$ 2*, remarcablement superior en dones estèrils, i que es van mantenir després de ser ajustades per edat i per hàbit tabàquic. Com és sabut, *TR $\alpha$ 2* és un receptor que, expressat de manera elevada actua com a lligand independent inhibidor endogen de l'acció horomonal tiroïdal (Koenig *et al*, 1989) fet que suggereix per tant una menor activitat metabòlica en les cèl.lules de la granulosa d'aquestes dones, que podria explicar part de les seves limitacions reproductives.

En relació a l'expressió de les *deiodinases* en cèl.lules de la granulosa, a diferència dels dos únics articles publicats al respecte, el de Rae *et al* (Rae *et al*, 2007) realitzat

en cèl.lules epitelials basals ovàriques, i el d'Aghajanova (Aghajanova, 2009) en cèl.lules de la granulosa de dones estimulades per fecundació *in vitro*, es va poder demostrar mitjançant tècniques de RT-PCR la presència de *D1* en cèl.lules de la granulosa ovàriques. Pel que fa a la seva quantificació, es va detectar molt escassa expressió de *D1* (42,49-46,19 Cts) probablement per aquest motiu els autors prèviament citats no n'obtenen, *D2* (34,36-40,56 Cts) va mostrar una expressió variable, i *D3* (26,56-32,64 Cts) és el tipus enzimàtic que va mostrar un patró d'expressió més remarcable. El fet de poder descriure l'existència de les 3 deiodinases en aquest tipus cel.lular corrobora la capacitat de conversió perifèrica de les hormones T4 i T3 en aquest nivell, suggerint una regulació del metabolisme de les hormones tiroïdals en l'òcit. La importància de la presència del sistema deiodinasa en cèl.lules de la granulosa també radicaria en el fet que els ovaris siguin temporalment independents de variacions en l'activitat secretora tiroïdal o en les concentracions d'hormones tiroïdals. D'aquesta manera, la generació local de T3 asseguraria un suficient aport hormonal per tal d'actuar directament sobre els receptors tiroïdals, en cas d'una eventual deficiència.

En l'avaluació de les diferències d'expressió de les deiodinases en cèl.lules de la granulosa de dones fèrtils i estèrils, es va observar que existeixen diferències en l'expressió de *D3*, francament superior en el grup fèrtil, i novament independent de l'edat de les dones i de si eren o no fumadores. Com és conegut, l'expressió de *D3* està regulada per l'activitat de TR $\alpha$ 1 que, amb un comportament oposat al de TR $\alpha$ 2, posa de manifest el grau d'activitat metabòlica hormonal tiroïdal a nivell intracel.lular. Tot i que a hores d'ara, els mediadors de l'activació del sistema deiodinasa o els factors desencadenants de la conversió de T4 i el manteniment dels nivells de T3 òptims durant el creixement fol.licular encara no estan clars, el fet que *D3* s'expressi menys en dones estèrils es podria traduir, de forma congruent amb les troballes relatives al receptor tiroïdal TR $\alpha$ 2, en la necessitat d'una major activitat tiroïdal en aquestes dones i en aquest tipus cel.lular, mediada per un mecanisme de *feedback*. La disminució de l'expressió de *D3* en les cèl.lules de la granulosa de les

dones estèrils reflectiria d'aquesta manera, la menor activitat hormonal tiroïdal intracel.lular en aquestes dones i tipus cel.lular.

La troballa de l'associació entre l'expressió de *TR $\alpha$ 2* en cèl.lules de la granulosa ovàriques periovulatòries i l'edat dels subjectes indicaria que, a major edat hi hauria una disminució de l'acció intracel.lular de les hormones tiroïdals en aquest tipus de cèl.lules, suggerint una altra possible causa de l'esterilitat associada a l'edat (addicional a la disminució de la reserva fol.licular, envelliment oocitari i menor receptivitat endometrial, entre d'altres).

### **7.1.2. Expressió de receptors tiroïdals i deiodinases en cèl.lules endometrials**

En relació a l'estudi de les cèl.lules endometrials periovulatòries de dones fèrtils també es va obtenir expressió dels 3 subtipus de *receptors* estudiats (*TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* ) i de les 3 *deiodinases* (*D1*, *D2*, *D3*). En aquest cas *TR $\alpha$ 1* i *TR $\alpha$ 2* van tenir una expressió quantitativa similar i *TR $\beta$*  es va expressar en menor mesura, igual que succeïa en cèl.lules de la granulosa. Un estudi d'Aghajanova (Aghajanova, 2010) demostra expressió d'ARNm i proteïna de *TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$*  i *D1*, *D2*, *D3* tant en epiteli glandular com estromal de l'endometri en totes les fases del cicle menstrual: *TR $\alpha$ 1* i *TR $\beta$*  amb predomini durant les fases secretora mitja i inicial respectivament, i *TR $\alpha$ 2* i les deiodinases, superiors en fase secretora tardana, essent la *D2* la predominant entre les deiodinases. De manera concordant, en aquest estudi *D2* és la que va mostrar una expressió més remarcable, per sobre de *D3*, i aquesta al mateix temps, molt per damunt de *D1*. A diferència del que succeïa en cèl.lules de la granulosa, en cèl.lules endometrials periovulatòries *D2* va mostrar major expressió que *D3*. Aquesta troballa també estaria en concordància amb una publicació de Galton *et al* (Galton *et al*, 2001) on identifica l'activitat de *D2* com la predominant en cèl.lules endometrials de rates (fins al dia 17 de la gestació que passa a ser substituïda per *D3*, amb

l'objectiu de limitar l'exposició de l'embrió a un eventual excés d'hormones tiroïdals maternes) i una altra de Lechan *et al* (Lechan *et al*, 2005) on afirma que en endometri, D2 i D3 són els principals enzims implicats en el manteniment de l'homeostasi hormonal tiroïdal, similar al que succeeix en cervell.

Segons Brosens *et al* (Brosens *et al*, 2010) la gestació depèn de l'adquisició d'un fenotip receptiu per part de l'endometri que faciliti l'apòsició, adhesió i invasió de l'embrió competent, i una activitat deiodinasa adequada sembla necessària per a assolir aquesta funcionalitat.

### **7.1.3. Expressió de receptors tiroïdals i deiodinases en cèl.lules cervicals**

Així com l'expressió dels marcadors de funció tiroïdal a nivell de cèl.lules de la granulosa i endometrials ha pogut ser contrastada amb d'altres publicacions, en cel.lularitat cervical no es té constància d'altres estudis amb què es puguin establir comparacions. En aquest tipus cel.lular es va mantenir la sobreexpressió de *TRα1* sobre *TRβ*, igual que succeïa en cèl.lules de la granulosa i endometrials. L'anàlisi d'expressió comparatiu realitzat a nivell cervical en les dues cohorts (fèrtil i estèril) va revelar novament una sobreexpressió de *TRα2* en el grup estèril, acompanyat d'un augment de *TRα1* en el mateix grup. Com descriu Lazar *et al* (Lazar *et al*, 1993) l'absència de determinades accions de T3 en el cervell adult s'atribueixen a alts nivells d'expressió de *TRα2*. Aquests alts nivells d'expressió de *TRα2* en cèl.lules cervicals de dones estèrils conferirien, igual que en el cervell, una menor activitat metabòlica tiroïdal intracel.lular. Per altra banda, la capacitat de *TRα1* per poder sobreexpressar-se en aquestes situacions li venen donades pel fet de tractar-se d'un receptor funcional (Nelson *et al*, 2008). Així doncs, aquesta sobreexpressió de *TRα1* podria ser compensatòria, amb la finalitat d'augmentar la resposta cel.lular a les hormones tiroïdals, fet que suggeriria novament una major necessitat d'activitat metabòlica tiroïdal en les dones estèrils. Cal tenir en compte, que a diferència del que s'observava en cèl.lules de la granulosa, l'expressió de *TRα1* i *TRα2* no va ser diferent

entre grups després d'ajustar-les per edat i hàbit tabàquic de les dones, fet que significa que aquestes diferències podrien estar influenciades per l'edat de les mateixes o pel fet de ser fumadores.

En relació a l'expressió de les *deiodinases* en cèl.lules cervicals, es va observar igual que en cèl.lules de la granulosa, una sobreexpressió de *D3* sobre *D2*, i d'aquesta sobre *D1* (en ambdues cohorts estudiades). L'augment d'expressió de *D3* es podria explicar per la regulació a la que està subjecte per part de *TRα1*, per un mecanisme de *feedback* positiu: és a dir, a més *TRα1* que es traduiria en una major activitat de T3, major expressió de *D3* (que és l'enzim que inactiva T4 i T3).

L'anàlisi comparatiu en relació a les deiodinases en cèl.lules cervicals no va mostrar diferències d'expressió entre grups (fèrtil i estèril).

Per totes les diferències observades en l'anàlisi d'expressió entre la cohort de dones fèrtils i estèrils sotmeses a tractament inductor de l'ovulació es pot concloure que en cèl.lules de la granulosa ovàriques periovulatòries existeixen diferències en l'expressió del receptor tiroïdal *TRα2* i la deiodinasa *D3*, i que en cèl.lules cervicals uterines hi ha diferent expressió dels receptors tiroïdals *TRα1* i *TRα2*, però aquestes diferències no es mantenen en un anàlisi de regressió múltiple, fet que suggereix que en CC les dones estèrils tindrien una disregulació en l'acció tiroïdal intracel.lular en el contexte d'una major edat i/o tabaquisme.



## **7.2. OBJECTIU 2: L'EXPRESSIÓ DELS GENS DELS RECEPTORS TIROÏDALS ( $TR\alpha1$ , $TR\alpha2$ I $TR\beta$ ) I LES DEIODINASES ( $D1$ , $D2$ I $D3$ ) S'ASSOCIEN A ALTRES PARÀMETRES RELACIONATS AMB LA FUNCIÓ TIROÏDAL INTRACEL·LULAR**

Amb l'objectiu de comprobar que el metabolisme hormonal tiroïdal a nivell de les cèl·lules de la granulosa, cervicals i endometrials segueix els mateixos mecanismes fisiològics que en la resta de teixits, es va estudiar si l'expressió dels gens dels receptors tiroïdals ( $TR\alpha1$ ,  $TR\alpha2$  i  $TR\beta$ ) i les deiodinases ( $D1$ ,  $D2$  i  $D3$ ) s'associaven a altres paràmetres relacionats amb la funció tiroïdal intracel·lular. Degut a la propietat de la T3 d'induir tant la sobreregulació de la deiodinasa 3 ( $D3$ ) com la dels  $\beta2$ -adrenoreceptors ( $ADR\beta2$ ) (Viticchi *et al*, 1992), aquests dos paràmetres van ser considerats marcadors de funció tiroïdal. Per ratificar aquesta associació també es va estudiar la relació que tenen l'expressió dels gens dels receptors tiroïdals i les deiodinases amb la concentració circulant i intrafol·licular de les hormones tiroïdals.

### **7.2.1. Expressió dels gens dels receptors tiroïdals ( $TR\alpha1$ , $TR\alpha2$ i $TR\beta$ ) i les deiodinases ( $D1$ , $D2$ i $D3$ ) en cèl·lules de la granulosa**

En cèl·lules de la granulosa de dones estèrils es va trobar, juntament a una major expressió de  $TR\alpha2$ , una menor expressió d' $ADR\beta2$  i  $D3$  en relació al grup fèrtil. L'expressió concomitant d'aquests tres paràmetres en aquesta mesura reflecteix la menor activitat metabòlica tiroïdal intracel·lular en el grup estèril. Conforme amb el que s'esperava,  $TR\alpha2$  va mostrar una associació inversa amb l'expressió d' $ADR\beta2$  i de  $D3$ . De manera concordant  $TR\beta$ , amb un mecanisme d'acció oposat al de  $TR\alpha2$ , ja que a diferència de  $TR\alpha2$  actua com a un 'verdader' receptor capaç d'activar la transcripció gènica, va mostrar una associació positiva amb  $D3$ . L'associació entre  $ADR\beta2$  i  $D3$  va ser tan significativa que es va mantenir en les dues cohorts (fèrtil i

estèril) per separat. Aquestes troballes suggereixen en primer lloc que en cèl.lules de la granulosa  $ADR\beta 2$  i  $D3$  tenen el mateix comportament, i en segon lloc que tant  $ADR\beta 2$  com  $D3$  estan regulades negativament per  $TR\alpha 2$ , i que  $D3$  està condicionada a més, per l'expressió de  $TR\beta$ .

### **7.2.2. Expressió dels gens dels receptors tiroïdals ( $TR\alpha 1$ , $TR\alpha 2$ i $TR\beta$ ) i les deiodinases ( $D1$ , $D2$ i $D3$ ) en cèl.lules endometrials**

L'estudi de la cel.lularitat endometrial va evidenciar les mateixes associacions, positives entre  $TR\alpha 1/TR\alpha 2$ ,  $ADR\beta 2$  i  $D3$ , i negativa i concordant entre  $TR\alpha 2$  i  $ADR\beta 2$ , novament representatives de la fisiologia tiroïdal a nivell intracel.lular.

A part, es van observar altres associacions positives entre  $TR\alpha 1-D2$  i  $D1-D2$ , i negativa entre  $TR\alpha 1-TR\beta$  amb un grau de repercussió desconegut sobre el metabolisme tiroïdal en cèl.lules endometrials.

### **7.2.3. Expressió dels gens dels receptors tiroïdals ( $TR\alpha 1$ , $TR\alpha 2$ i $TR\beta$ ) i les deiodinases ( $D1$ , $D2$ i $D3$ ) en cèl.lules cervicals**

En cèl.lules cervicals s'havia detectat la sobreexpressió de  $TR\alpha 2$  en el grup estèril en relació al fèrtil, influenciada per l'edat i l'hàbit tabàquic de les dones. En aquest tipus cel.lular es va observar la mateixa seqüència fisiològica metabòlica que en cèl.lules de la granulosa, en aquest cas consistent en l'associació inversa  $TR\alpha 2-ADR\beta 2$  en el grup estèril, corroborada per associacions entre el rati  $TR\alpha 1/TR\alpha 2-ADR\beta 2$ ,  $TR\alpha 1/TR\alpha 2-D3$ , i entre  $TR\beta-D3$ , positives en les dues cohorts. Entre  $ADR\beta 2$  i  $D3$  també es va observar una associació robusta, igual que succeïa en cèl.lules de la granulosa. Aquestes associacions demostren novament que en cèl.lules cervicals també es compleixen els mecanismes propis del metabolisme tiroïdal intracel.lular.

En aquestes cèl.lules es van observar altres associacions positives i significatives de rellevància indeterminada entre  $TR\alpha 2-TR\beta$ ,  $TR\alpha 2-D1$ ,  $TR\alpha 2-D2$ ,  $TR\beta-D2$  i entre  $D2-D3$ .

Malgrat que l'anàlisi d'aquestes dades no pot ser corroborada amb altres estudis previs degut a que desconeixem la presència d'aquests, la troballa de les associacions entre els paràmetres de funció tiroïdal intracel·lular en cèl·lules de la granulosa, cervicals i endometrials permet suggerir que, de forma paral·lela al que succeeix en altres cèl·lules diana de la funció tiroïdal (múscul, fetge i teixit adipós) (Lazar-Wesley *et al*, 1991; Malbon *et al*, 1982; Viguerie *et al*, 2002) en les cèl·lules genitals de les dones sotmeses a tractament inductor de l'ovulació també es compleixen els mecanismes de *feedback* positius i negatius propis del metabolisme tiroïdal intracel·lular.

#### **7.2.4. Expressió gènica dels receptors tiroïdals (*TRα1*, *TRα2* i *TRβ*) i les deiodinases (*D1*, *D2* i *D3*) en cèl·lules de la granulosa, cervicals, endometrials, i concentracions hormonals perifèriques**

L'estudi d'associacions entre l'expressió dels paràmetres de funció tiroïdal (*TRα1*, *TRα2*, *TRβ*, *D1*, *D2* i *D3*) en cèl·lules de la granulosa i la concentració hormonal perifèrica de FSH, LH, PRL, TSH i T4L va revelar que a major concentració de FSH, PRL i T4L hi ha major expressió de *TRα2*, essent aquestes associacions més significatives en dones fèrtils que estèrils. Paral·lelament, a la major concentració de PRL i T4L es va observar una menor expressió d'*ADRβ2* i *D3*. Aquesta associació torna a deixar constància de la relació inversa que existeix entre l'expressió del receptor *TRα2* amb *ADRβ2* i *D3*. Una explicació per l'associació positiva entre *TRα2* i les concentracions circulants de FSH, PRL i T4L podria ser que una menor acció hormonal tiroïdal en el contexte d'una sobreexpressió de *TRα2* perifèrica (com succeeix en cèl·lules de la granulosa i cervical de les dones estèrils, i en cèl·lules de la granulosa de les dones de major edat) podria desencadenar com a mecanisme d'adaptació, un augment de T4L, FSH i PRL circulants.

En cèl·lules endometrials una nova associació positiva entre *TRα2* i TSH, i una altra concordant i negativa entre *ADRβ2* i TSH van córrer en paral·lel a les troballes en

cèl.lules de la granulosa, posant de manifest altra vegada aquest possible mecanisme compensatori és a dir, a més hipotiroïdisme tissular major concentració perifèrica de TSH. En aquestes cèl.lules hi va tornar a haver associació gairebé significativa entre *TRα2* i PRL, fet que suggeriria un mecanisme similar al de l'hipotiroïdisme és a dir, a menor funció tiroïdal intracel.lular en endometri, major concentració perifèrica de PRL.

En *cèl.lules cervicals* es va tornar a objectivar una associació positiva entre la concentració circulant de PRL i TSH, i l'expressió de *TRα2*. Aquestes associacions (tant amb PRL com amb TSH) es van mantenir inclús, treient dos casos extrems de l'anàlisi. Les troballes en cèl.lules cervicals indiquen de nou que l'organisme intentaria compensar una menor acció tiroïdal deguda a l'augment de *TRα2*, amb una major síntesi de TSH i de PRL a nivell hipofisari.

Donat que es tracta de dades originals no s'ha pogut comparar cap d'aquests resultats amb altres estudis previs. No obstant, aquestes troballes permeten suggerir que a major expressió de *TRα2* (és a dir, a menor funció tiroïdal tissular) en cèl.lules cervicals i endometrials, hi ha una major concentració perifèrica de TSH, probablement secundària a un mecanisme de *feedback* negatiu compensatori. El mateix succeiria en cèl.lules de la granulosa en relació a T4L, tot i que per afirmar que l'augment de T4L és compensatòria, hauria d'anar acompanyada d'un augment de TSH, fet que no va succeir.

#### **7.2.5. Expressió gènica dels receptors tiroïdals (*TRα1*, *TRα2* i *TRβ*) i les deiodinases (*D1*, *D2* i *D3*) en cèl.lules de la granulosa, i concentracions hormonals intrafol·liculars**

L'anàlisi d'associacions entre l'expressió gènica dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular (*TRα1*, *TRα2*, *TRβ*, *D1*, *D2* i *D3*) en cèl.lules de la granulosa i les concentracions hormonals intrafol·liculars de FSH, LH, PRL, TSH, T4L i T3L no van

mostrar cap associació destacable. Segons aquesta troballa, l'expressió dels receptors hormonals tiroïdals i les deiodinases en cèl.lules de la granulosa no estarien influenciades per aquestes concentracions.

El mateix va succeir entre l'expressió dels paràmetres de funció hormonal tiroïdal intracel.lular en cèl.lules cervicals i endometrials i la dosi de gonadotropines administrades. No obstant, a nivell de cèl.lules de la granulosa es va trobar associació positiva entre la dosi de LH rebuda i l'expressió de *TR $\alpha$ 2* i *D2*, així com entre la dosi de FSH i l'expressió de *D2*. Aquesta troballa seria concordant amb el fet que, a major expressió de *TR $\alpha$ 2* en cèl.lules de la granulosa, cal un major aport de LH per a assolir una correcta estimulació. Degut a que l'activitat de *D2* consisteix en catalitzar la conversió de T4 a T3 (facilitant les accions de les hormones tiroïdals sobre els seus receptors), l'associació entre expressió de *D2* i dosi de FSH-LH administrades explicaria que, en dones que requereixen major dosi de FSH-LH per a una millor estimulació ovàrica (com succeeix per exemple en la baixa resposta i en l'edat avançada) hi ha un augment de l'expressió de *D2*, probablement compensatori, per tal d'afavorir la funció metabòlica tiroïdal intracel.lular en les seves cèl.lules de la granulosa.

### **7.3. OBJECTIU 3: L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS PARÀMETRES DE FUNCIO INTRACEL.LULAR HORMONAL TIROÏDAL *TR $\alpha$* , *TR $\beta$* , *D1*, *D2*, I *D3* ES RELACIONA AMB VARIACIONS EN L'EXPRESSIÓ DELS GENS ASSOCIATS A FERTILITAT *GREM1*, *HAS2* I *PTGS2* EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA OVÀRIQUES, CÈL.LULES CERVICALS UTERINES I CÈL.LULES ENDOMETRIALS**

En cèl.lules de la granulosa, l'expressió de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* s'ha associat a millor qualitat oocitària, taxa de fertilització, qualitat embrionària i taxa de gestació en

dones sotmeses a fecundació *in vitro* (Mc Kenzie *et al*, 2004; Anderson *et al*, 2009; Gebhardt *et al*, 2011; Jindal *et al*, 2012; Barberi *et al*, 2012). En cèl.lules cervicals, tant *HAS2* com *PTGS2* formen part de la resposta inflamatòria necessària per a la promoció de la fertilitat (Akgul *et al*, 2012; Joseph *et al*, 2013) igual que en cèl.lules endometrials, on *HAS2* i *PTGS2* es consideren marcadors bioquímics de receptivitat endometrial (Giudice *et al*, 1999; Palm *et al*, 2008; Raheem *et al*, 2013).

En l'estudi d'expressió dels gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa de les dues poblacions (fèrtil i estèril) es van obtenir diferències a nivell de *GREM1* i *PTGS2*, significativament superiors en el grup fèrtil. Donat que aquests marcadors suggereixen, a major expressió major viabilitat oocitària, les troballes són del tot congruents amb l'esperable. En relació a l'expressió de *HAS2* no es van observar diferències entre grups. Cal recordar, que en l'anàlisi multivariant realitzat posteriorment, no es van observar diferències entre grups després de controlar-les per les variables edat i hàbit tabàquic, fet que significa que aquests canvis es podrien atribuir a l'edat i al fet de ser o no fumadora.

L'expressió d'aquests tres gens en cèl.lules cervicals (*GREM1*, *HAS2* i *PTGS2*) va mostrar sobreexpressió de *GREM1* en el grup estèril, cosa que no va succeir després d'ajustar-la per edat i tabac. Mentre que els gens *HAS2* i *PTGS2* s'han associat a la resposta inflamatòria necessària per a afavorir els processos reproductius a nivell cervical (Akgul *et al*, 2012; Joseph *et al*, 2013), el gen *GREM1* no s'ha relacionat amb aquesta propietat, degut a que la seva funcionalitat en aquest tipus cel.lular no ha estat estudiada amb anterioritat. És per aquest motiu que es desconeix quina rellevància pot tenir aquesta troballa a nivell cervical, sobre els mecanismes reproductius.

### **7.3.1. Paràmetres d'expressió gènica de funció tiroïdal i gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa**

L'estudi d'associacions entre els paràmetres d'expressió gènica de funció tiroïdal i els gens *GREM1* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa és força revelador. En aquestes cèl.lules es va observar una associació negativa entre *GREM1* i *TRα2*, i positiva entre *GREM1*, *ADRβ2* i *D3*. Coherent amb aquestes troballes és l'associació negativa entre *PTGS2* i *TRα2*, i positiva entre *PTGS2* i *ADRβ2*, mostrant que en cèl.lules de la granulosa de dones en tractament inductor de l'ovulació existeix una relació entre els mecanismes metabòlics tiroïdals intracel.lulars i l'expressió dels gens associats a fertilitat *GREM1* i *PTGS2*. El conjunt d'aquestes troballes permetria suggerir que, el desenvolupament subòptim de la funció tiroïdal intracel.lular a nivell d'aquestes cèl.lules (com indica la sobreexpressió de *TRα2* i la menor expressió d'*ADRβ2* i *D3*) podria influir negativament en la qualitat oocitària de les dones estèrils sotmeses a inducció de l'ovulació.

### **7.3.2. Paràmetres d'expressió gènica de funció tiroïdal i gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules endometrials**

En cel.lularitat endometrial es van trobar de nou associacions fermes entre els paràmetres de funció tiroïdal intracel.lular i el gen *GREM1*: positiva amb *TRα1*, *TRβ* i *ADRβ2*, i negativa amb *TRα2*, totalment coherents amb la seqüència metabòlica tiroïdal intracel.lular, mostrant novament una relació entre la funció tiroïdal intracel.lular i l'expressió de *GREM1*. No obstant, segons el nostre coneixement, no s'ha publicat cap estudi que avaluï l'expressió de *GREM1* en relació a la fertilitat en cèl.lules endometrials. És per aquest motiu que, per tal de poder afirmar l'associació entre *GREM1* i la receptivitat endometrial, calen nous estudis. Per altra banda, es va observar una associació positiva a nivell d'endometri entre *PTGS2* i *TRα2*, discordant amb el que s'esperava degut a que és incoherent amb la seqüència mecanismes de funció tiroïdal intracel.lular – implantació endometrial.

### 7.3.3. Paràmetres d'expressió gènica de funció tiroïdal i gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules cervicals

En cèl.lules cervicals es va tornar a observar un paral·lelisme en relació a *GREM1* i l'expressió dels paràmetres de funció tiroïdal a nivell intracel·lular. L'expressió d'aquest gen (*GREM1*), es va correlacionar positivament amb la de *TR $\alpha$ 1*, *ADR $\beta$ 2* i *D3*. Si es tingués constància de que *GREM1* participa en els mecanismes reproductius a nivell cervical, aquestes associacions serien totalment extrapolables amb les troballes de les cèl.lules de la granulosa és a dir, es podria suggerir que la hipofunció tiroïdal intracel·lular a nivell cervical condiciona una disminució de les capacitats reproductives. No obstant, es desconeix el paper que té *GREM1* cervical sobre la fertilitat i per aquest motiu, només es pot afirmar que l'expressió de *GREM1* en cèl.lules cervicals es relaciona amb variacions en l'expressió gènica dels paràmetres de funció tiroïdal intracel·lular. En cèl.lules cervicals es van observar altres associacions entre *HAS2* i *TR $\alpha$ 1* (negativa), *ADR $\beta$ 2* (negativa) i *D1* (positiva), i entre *PTGS2* i *TR $\beta$*  (negativa), incongruents en la relació 'mecanismes de la funció tiroïdal' *versus* esterilitat.

No es té constància de l'existència d'estudis previs que valorin l'associació entre l'expressió d'aquests gens associats a fertilitat i la funció tiroïdal, així que no es pot establir cap comparació. No obstant, segons aquestes troballes es pot suggerir que els paràmetres d'expressió gènica de funció tiroïdal en cèl.lules de la granulosa influïrien en la promoció de la fertilitat a nivell de qualitat oocitària, mentre que a nivell cervical i endometrial no es pot afirmar el mateix, per manca de coneixement de l'acció de l'expressió *GREM1* en cèrvix i endometri sobre els mecanismes reproductius.



#### **7.3.4. Expressió gènica DE *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa, cervicals, endometrials, i concentracions hormonals perifèriques**

Pel que fa a l'anàlisi de les associacions entre la concentració hormonal perifèrica i l'expressió dels gens *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa, es va observar que *GREM1* tenia associació inversa amb la concentració perifèrica de PRL i T4L, i que *HAS2* tenia la mateixa associació, negativa, amb la de 17- $\beta$ -E2.

En cèl.lules cervicals no van existir associacions en aquest nivell, mentre que en cèl.lules endometrials es va tornar a produir una associació inversa entre *GREM1* i les concentracions plasmàtiques de PRL i TSH.

Aquestes troballes són concordants amb les associacions prèviament descrites en relació a l'expressió dels gens de funció hormonal tiroïdal intracel.lular, on en cèl.lules de la granulosa s'objectivava que a major expressió de *TR $\alpha$ 2* i menor d'*ADR $\beta$ 2*, (en aquest cas, acompanyat de menor expressió de *GREM1*), hi havia major concentració de PRL i T4L perifèriques. Al mateix temps, en cèl.lules endometrials va tornar a haver-hi associació negativa entre expressió de *GREM1* i les concentracions de PRL i TSH suggerint que a menor funció tiroïdal intracel.lular hi ha menys expressió gènica de *GREM1* i major concentració de PRL i TSH perifèriques, probablement secundàries a un mecanisme compensatori. Degut a que encara es desconeix la rellevància que té l'expressió de *GREM1* en endometri sobre la fertilitat, no es pot afirmar que les concentracions perifèriques de PRL i TSH repercuteixin en ella, però sí que es pot suggerir que una baixa expressió de *GREM1* i *HAS2* en cèl.lules de la granulosa (que significaria una pitjor qualitat oocitària) s'associen a un augment de PRL, T4L i 17- $\beta$ -E2, respectivament.

### **7.3.5. Expressió gènica de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa i concentracions hormonals intrafol·liculars**

L'estudi d'associacions entre les concentracions hormonals intrafol·liculars i l'expressió de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa no va mostrar associacions rellevants.

Tampoc va existir cap associació significativa entre l'expressió d'aquests gens i la dosi de gonadotropines rebuda, així com entre aquests i l'edat de les dones en cap tipus cel·lular estudiat (cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials).

## **7.4. OBJECTIU 4: DIFERÈNCIES EN L'EXPRESSIÓ DE *TR $\alpha$* , *TR $\beta$* I *D1-D2-D3* EN CÈL.LULES DE LA GRANULOSA DEL FOL·LICLE OVÀRIC PERIOVULATORI I CÈL.LULES CERVICALS UTERINES ENTRE LA POBLACIÓ ESTÈRIL QUE NO HAVIA OBTINGUT GESTACIÓ I EL GRUP FÈRTIL, ELS OÒCITS DE LES QUALS VAN DONAR LLOC A GESTACIÓ**

En un primer anàlisi no es va trobar cap diferència entre els paràmetres d'expressió gènica de funció intracel·lular hormonal tiroïdal (*TR $\alpha$ 1*, *TR $\alpha$ 2*, *TR $\beta$* , *D1*, *D2* i *D3*) ni en els paràmetres vinculats a major fertilitat (expressió de *GREM1*, *HAS2* i *PTGS2*) en cèl.lules de la granulosa i cervicals, entre els grups amb resultat de gestació positiu o negatiu, independentment de la cohort a la que pertanyessin.

No obstant, tot i el petit tamany mostrat sí que es va apreciar un augment significatiu en l'expressió de *TR $\alpha$ 2* en cèl.lules de la granulosa de dones estèrils amb  $\beta$ HCG < 50 mUI/mL en relació a les dones fèrtils, els oòcits de les quals van tenir un resultat de  $\beta$ HCG superior a 50 mUI/mL el 12è dia de la transferència embrionària. La diferent expressió de *TR $\alpha$ 2* entre grups va ser independent de l'edat i de l'hàbit tabàquic de

les participants. Les dones estèrils a més de presentar una major expressió de *TRα2* van presentar, tal i com correspon a la fisiologia hormonal tiroïdal intracel.lular, una menor expressió d'*ADRβ2* i de *D3*. Els gens *GREM1* i *PTGS2*, que expressats en cèl.lules de la granulosa s'associen a major qualitat oocitària, també es van mostrar infraexpressats en aquest grup en relació al de dones fèrtils amb oòcits que van donar lloc a gestació evolutiva en aquell cicle de tractament. Cal tenir en compte però, que l'edat i el fet de fumar podrien influir en aquestes darreres diferències.

En relació a l'expressió gènica en cèl.lules cervicals, en comparar la població fèrtil (amb oòcits amb resultat favorable) i la població estèril (sense gestació després de la transferència embrionària), es va observar un augment d'expressió de *TRα2* i *D2* en aquest darrer grup, atribuïble a les variacions d'edat i d'hàbit tabàquic, sense observar diferències a nivell de l'expressió gènica dels paràmetres vinculats a fertilitat.

Com és ben sabut, el receptor *TRα2* és un inhibidor endogen de la funció tiroïdal, i la seva sobreexpressió en el grup estèril amb resultat desfavorable suggereix novament una disminució dels efectes metabòlics en les cèl.lules de la granulosa i cervicals d'aquestes dones. L'augment de l'expressió de *D2* en cèl.lules cervicals del grup estèril concorda amb aquesta troballa, doncs aquest enzim catalitza la conversió de *T4* a la seva forma més activa *T3*, posant de manifest la major necessitat d'activitat tiroïdal en aquestes circumstàncies. La *D3*, deiodinasa amb expressió induïda per l'activitat de *T3*, és l'enzim inactivador fisiològic de les hormones tiroïdals produint *T3* reversa (*T3r*) i diiodotironina (*T2*), i té un comportament congruent amb l'augment de *TRα2*, doncs la seva disminució en el grup estèril amb resultat desfavorable podria ser compensatori, posant en evidència que els requeriments de funció tiroïdal en cèl.lules de la granulosa es troben augmentats en aquesta situació. Finalment, la menor expressió dels gens associats a fertilitat *GREM1* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa de dones estèrils amb resultat de  $\beta\text{HCG} < 50 \text{mUI/mL}$ , és concordant amb el fet que aquests oòcits tinguin menor qualitat i resultin en menor taxa de gestació, en

comparació amb els de cèl.lules de la granulosa de dones fèrtils amb oòcits que han derivat en embarassos. Segons el nostre coneixement, no existeixen estudis que comparin l'expressió d'aquests paràmetres de funció tiroïdal en cèl.lules de la granulosa i cervicals de dones fèrtils i estèrils en el transcurs d'una estimulació ovàrica per fecundació *in vitro*, no obstant aquestes troballes són totalment congruents amb el que hi ha publicat en relació a la contribució de la funció tiroïdal en la fertilitat, on ha quedat establert que una deficient activitat tiroïdal influiria negativament en els mecanismes reproductius (Poppe *et al*, 2007).

Conseqüentment als resultats obtinguts, es pot afirmar que els paràmetres de funció intracel.lular de les hormones tiroïdals *TRα2*, *ADRβ2* i *D3* així com *GREM1* i *PTGS2* en cèl.lules de la granulosa ovàriques i de *TRα2* i *D2* en cèl.lules cervicals uterines en una població fèrtil i una estèril, s'associen a diferències en la resposta al tractament de fecundació *in vitro*. No obstant, a excepció de *TRα2* en CG, les diferències no es mantenen en un anàlisi de regressió múltiple, fet que suggereix que les dones estèrils tindrien una disregulació en l'acció tiroïdal intracel.lular en el contexte d'una major edat i/o tabaquisme.

## 7.5. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Els grups d'estudi (fèrtils i estèrils) van ser homogenis en relació a l'*índex de massa corporal*, *determinacions hormonals plasmàtiques* (exceptuant PRL, tot i trobar-se en concentracions normals en ambdues cohorts) i *en les determinacions hormonals en líquid fol.licular* (exceptuant la LH que va ser inferior en el grup estèril). L'edat del grup de dones estèrils va ser d'uns 7 anys superior al de les fèrtils, conseqüència d'una circumstància clínica difícil de modificar. Degut a que per un costat, tant la llei com la clínica fixen el límit superior de les donants en 35 anys, i a que la mitjana d'edat de les dones sotmeses a transferència embrionària està entre els 35-39 anys (Registre FIV-CAT, 2011), l'equiparabilitat d'ambdós grups es troba compromesa,

obligant a interpretar els resultats comparatius amb cautela i a tenir en compte que aquestes diferències podrien influir en els resultats, tal i com ha reflectit l'anàlisi de regressió múltiple realitzat per cada objectiu. Per tal de donar major credibilitat a l'estudi comparatiu entre cohorts caldria realitzar nous estudis amb un major tamany mostral que inclogués donants en el límit superior de l'edat permesa, (tenint en compte la disminució de la resposta que això podria comportar) i també incloent només dones estèrils per sota de l'edat màxima permesa de les donants.

El percentatge de *fumadores* entre les dones estèrils va ser del 27% mentre que entre les fèrtils va ser del 63%. Les diferències en l'hàbit tabàquic van ser significatives, i degut a que el tabac s'ha associat a una disminució de la capacitat fèrtil (Wdowiak *et al*, 2013) aquest ha estat, contràriament a l'esperable, inferior en el grup estèril. Aquests resultats obliguen a qüestionar de nou si els resultats obtinguts poden estar influenciats per aquesta circumstància, per aquest motiu s'han realitzat anàlisis multivariants, que en la majoria de casos han mostrat que el tabaquisme no intervé en la variança però que en alguns casos en pot ser el responsable.

Les *dosis de gonadotropines* que van requerir ambdós grups durant l'estimulació va ser similar en el cas de la FSH ( $2816.64 \pm 718.43$ UI les estèrils vs  $2626.59 \pm 607.47$ UI les fèrtils) ( $p=0.312$ ), mentre que va diferir molt en relació a la LH ( $703.79 \pm 447.43$ UI estèrils vs  $40.91 \pm 191.88$ UI fèrtils) ( $p < 0.0001$ ). Com es pot apreciar l'administració de LH no segueix una distribució normal, degut a que només una donant va rebre tal fàrmac durant l'estimulació. L'explicació d'aquesta pauta de tractament és que en dones  $>35$  anys, pobres responedores o amb una severa supressió pituitària, l'estimulació amb LH en fase fol·licular mitja-tardana optimitza la fol·liculogènesi, associant-se a una major taxa d'implantació i gestació clínica, sense afectar les fases de divisió meiòtica (Hill *et al*, 2012). Degut a que en el grup de dones estèrils la mitjana d'edat va ser bastant superior a la del grup fèrtil, i a que algunes d'elles ja havien realitzat altres temptatives prèviament amb resposta al tractament inferior a la desitjable, es va considerar adequat afegir LH en la majoria d'aquests cicles durant l'estimulació.

Un altre factor a tenir en compte i que és una realitat clínica difícilment modificable, és el *tractament utilitzat com a inductor de l'ovulació* després d'haver contribuït a la maduració final de l'oòcit. En el cas de les donants se solen utilitzar els *anàlegs de la GnRH* (en el nostre cas triptorelina) per tal d'evitar la síndrome d'hiperestimulació ovàrica (SHO) a la que estan exposades la majoria d'elles, degut a que solen presentar una bona reserva ovàrica associada a unes dosis hormonals generoses per tal d'obtenir el màxim nombre d'oòcits. No obstant, en el cas de les dones estèrils el fàrmac utilitzat és l'*hCG recombinant*, que simularà el pic de LH unint-se als seus receptors degut a la similitud entre les seves cadenes. Aquest fàrmac té el desavantatge que no protegeix del SHO, però en contraposició no té els efectes deleteris sobre l'endometri que tenen els anàlegs agonistes de la GnRH que 'obliguen', un cop administrats, a congelar els embrions per tal de transferir-los en un altre cicle amb una nova estimulació endometrial.

En l'anàlisi dels *resultats del tractament d'estimulació ovàrica* tal i com era d'esperar, pel que respecta al nombre de fol·licles >14 mm el darrer control ecogràfic, el nombre total d'oòcits aspirats, el nombre d'oòcits en metafase II i el nombre d'embrions obtinguts hi ha hagut diferències entre les dues cohorts ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.002$ ,  $p < 0.0001$  i  $p = 0.001$ , respectivament). Aquestes troballes expliquen la diferent taxa global de gestació amb nascut viu aconseguida en un cicle de FIV-ICSI (27%) i en un cicle d'ovodonació (45%), segons les dades del registre FIV-CAT 2011.

En l'avaluació dels *resultats gestacionals* també s'han observat diferències estadísticament significatives entre ambdues cohorts en relació a les concentracions de  $\beta$ HCG >50mUI/mL el dia 12 de la transferència embrionària (67±50% fèrtils vs 38±41% estèrils,  $p = 0.001$ ) i gestació evolutiva a les 7 setmanes (57±51% fèrtils vs 19±38% estèrils,  $p = 0.003$ ) ambdós favorables als oòcits procedents del grup fèrtil, mentre que la taxa de gestació ectòpica ha estat superior en el grup estèril (0% fèrtils vs 13±32% estèrils,  $p = 0.044$ ). Aquest darrer resultat mereix especial atenció per ser el que es troba més lluny dels valors esperables. Durant el procés de les tècniques de reproducció assistida, l'estimulació ovàrica en el mateix cicle s'ha proposat com un

factor que augmenta el risc de gestació tubàrica, al mateix temps que la disminució del fluxe sanguini telediastòlic en els vasos sanguinis sub/endometrials (Wang *et al*, 2010) sense relació amb el gruix ni la morfologia endometrial. Segons Shapiro (Shapiro *et al*, 2012) la taxa de gestació extrauterina post-transferència és de 4% en transferències en fresc, i del 0,3% en criotransferències (cicles autòlegs) en un total de 2150 transferències analitzades. Aquesta xifra també està allunyada del 0,8% de gestacions tubàriques documentades en el registre FIV-CAT 2011. Cal tenir en compte que en els darrers 6 anys, en tots els cicles de FIV-TE realitzats a la Unitat de Reproducció del HUGDJT només s'han documentat 3 casos de gestació ectòpica, i tots 3 han participat a l'estudi.

Un altre valor inferior a l'esperable correspon al de la *taxa de gestació evolutiva* a les 7 setmanes (19% en aquest estudi vs 27% en el registre FIV-CAT de 2011). S'ha de tenir present que en aquest treball s'han exclòs dones amb factor tubàric bilateral i parelles amb diagnòstic de factor masculí aïllat, que són les que tenen millor pronòstic en aquest tipus de tractament, i que gairebé la totalitat de les dones estèrils participants estaven diagnosticades d'esterilitat d'origen desconegut i havien fet  $\geq 3$  cicles d'inseminació o bé  $\geq 1$  cicle de fecundació *in vitro* previs, sense resultat de gestació.

Un factor a tenir present és que en aquest estudi no s'ha tingut en compte la *qualitat espermàtica* de les parelles, els gamets dels quals han estat utilitzats per fecundar els oòcits obtinguts en l'estudi. Al mateix temps s'ha de recalcar que en el cas de les receptores dels oòcits, s'han estudiat gestacions esdevingudes en dones a qui no s'ha estudiat cap factor, ni a nivell hormonal ni a nivell genètic degut a que, per qüestions òbvies, només s'han pogut tenir presents els gens estudiats provinents de les cèl.lules de la granulosa dels oòcits de les seves donants.

## 7.6. FORTALESES DE L'ESTUDI

Com a punts forts de l'estudi podem mencionar l'homogeneïtat d'ambdues cohorts en relació a *l'índex de massa corporal*, *determinacions plasmàtiques* de FSH, LH, E2, TSH i T4L i *determinacions fol·liculars* de FSH, PRL, TSH, T4L i T3L. Per altra banda, la troballa de diferències en l'expressió gènica dels paràmetres de funció tiroïdal intracel·lular tant en cèl·lules de la granulosa com en cel·lularitat cervical d'ambdues cohorts, ratifiquen que no es tracta d'una troballa aïllada. El fet d'haver identificat associacions entre l'expressió gènica dels receptors hormonals, les deiodinases i altres paràmetres de funció hormonal tiroïdal (ADR $\beta$ 2 i concentracions hormonals) en tots els tipus cel·lulars estudiats, també donen consistència al treball. Finalment, els resultats gestacionals obtinguts en ambdós grups són coherents amb els mecanismes fisiològics reproductius i els resultats esperables, fet que certifica que els tractaments aplicats en cada cohort han estat els adequats.





## **8. CONCLUSIONS**

---



8.1. En les cèl.lules de la granulosa ovàriques periovulatòries de dones estèrils sotmeses a fecundació *in vitro* s'identifica una sobreexpressió de *TRα2* i una disminució de *D3*, en relació a les mateixes cèl.lules de dones fèrtils. Al mateix temps, en cèl.lules cervicals uterines del grup estèril també s'observa un augment d'expressió de *TRα2* en comparació amb el grup fèril, en el contexte d'una major edat i/o tabaquisme.

8.2. En cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials de dones sotmeses a tractament inductor de l'ovulació per punció fol.licular existeix una associació ferma entre l'expressió dels receptors *TRα1*, *TRα2*, *TRβ* i la del marcador adrenèrgic de funció tiroïdal *ADRβ2*, així com la de *D3*.

8.3. En cèl.lules de la granulosa ovàriques de dues cohorts de pacients fèrtils i estèrils sotmeses a fecundació *in vitro*, els gens implicats en la fertilitat *GREM1* i *PTGS2* s'associen a l'expressió dels paràmetres de funció intracel.lular hormonal tiroïdal *TRα*, *ADRβ2*, i *D3*.

8.4. Al llarg d'un cicle de fecundació *in vitro*, la població estèril sense gestació al final del tractament expressa major quantitat de *TRα2* en cèl.lules de la granulosa del fol.licle ovàric periovulatori que la població fèril els oòcits de les quals han donat lloc a gestació. Aquesta mateixa població, expressa menys *ADRβ2*, *D3*, *GREM1* i *PTGS2* en CG, i més *TRα2* i *D2* en CC, que els seus homòlegs fèrtils amb resultat favorable, en el contexte d'una major edat i/o tabaquisme.

En base als resultats obtinguts en aquesta tesi es pot concloure que els paràmetres associats a la funció intracel.lular de les hormones tiroïdals en cèl.lules de la granulosa ovàriques i cèl.lules cervicals uterines en fase periovulatòria, són diferents en dones fèrtils i estèrils i que, al mateix temps, també s'associen a diferències en la resposta al tractament de fecundació *in vitro*.

COROLLARI:

En tractar-se del primer estudi que troba un possible i important rol de les hormones tiroïdals a nivell intracel.lular i perifèric, en dones fèrtils i estèrils en tractament inductor de l'ovulació, per tal de poder fer una translació d'aquestes troballes a la pràctica clínica seria necessària la realització d'estudis experimentals addicionals que puguin posar de manifest l'efectivitat del tractament amb hormona tiroïdal sobre els paràmetres de funció tiroïdal intracel.lular, en cèl.lules de la granulosa, cervicals i endometrials.

## 9. BIBLIOGRAFIA

---



Abalovich, M., Mitelberg, L., Allami, C., Gutierrez, S., Alcaraz, G., Otero, P., & Levalle, O. (2007). Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 23(5), 279-83.

Abe, T., Kakyo, M., Sakagami, H., Tokui, T., Nishio, T., Tanemoto, M., Nomura, H., Hebert, S.C., Matsuno, S., Kondo, H., & Yawo, H. (1998). Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *The Journal of biological chemistry*, 273(35), 22395-401.

Abe, T., Unno, M., Onogawa, T., & Tokui, T. (2001). Molecular identification of organic anion transporter oatp/LST family. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 46(5), 612-20.

Achache, H., Tsafrir, A., Prus, D., Reich, R., & Revel, A. (2010). Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 94(4), 1271-78.

Adriaenssens, T., Wathlet, S., Segers, I., Verheyen, G., De Vos, A., Van der Elst, J., Coucke, W., Devroey, P., & Smits, J. (2010). Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Human Reproduction*, 25(5), 1259-1270.

Adriaenssens, T., Segers, I., Wathlet, S., & Smits, J. (2011). The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28, 31–40.

Aghajanova, L., Lindeberg, M., Carlsson, I.B., Stravreus-Evers, A., Zhang, P., Scott, J.E., Hovatta, O., & Skjöldebrand-Sparre, L. (2009). Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reproductive biomedicine online*, 18(3), 337-47.



- Aghajanova, L., Staverus-Evers, A., Lindeberg, M., Landgren, B.M., Skjöldebrand-Sparre, L., Hovatta, O. (2011). Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human endometrial physiology. *Fertility and sterility*, *95*(1), 230-7.
- Akgul, Y., Holt, R., Mummert, M., Word, A., & Mahendroo, M. (2012). Dynamic Changes in Cervical Glycosaminoglycan Composition during Normal Pregnancy and Preterm Birth. *Endocrinology*, *153*(7), 3493–3503.
- Amma, L.L., Campos-Barros, A., Wang, Z., Vennström, B., & Forrest, D. (2001). Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors beta and alpha1 in regulation of type 1 deiodinase expression. *Molecular endocrinology*, *15*(3), 467-75.
- Anahory, T., Dechaud, H., Bennes, R., Marin, P., Lamb, N.J., & Laoudj, D. (2002). Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles. *Electrophoresis*, *23*, 1197–1202.
- Andersen, C.Y. (1993). Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *77*(5), 1227-34.
- Arain, M., Campbell, M.J., Cooper, C.L., Lancaster, G.A. (2010). What is a pilot or feasibility study? A review of current practice and editorial policy. *BMC medical research methodology*, *16*(10), 67.
- Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*, *81*(3), 1269-304.
- Arnaud-Lopez, L., Usala, G., Ceresini, G., Mitchell, B.D., Pilia, M.G., Piras, M.G., Sestu, N., Maschio, A., Busonero, F., Albai, G., Dei, M., Lai, S., Mulas, A., Crisponi, L., Tanaka, T., Bandinelli, S., Guralnik, J.M., Nagaraja, R., Sanna, S., & Naitza, S. (2008). Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *American journal of human genetics*, *82*(6), 1270-80.

Ashkar, F.A., Bartlewski, P. M., Singh, J., Malhi. P.S., Yates, K.M., Singh, T., & King, A. (2010). Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows. *Experimental biology and medicine*, 235(2), 215-21.

Assidi, M., Dufort, I., Ali, A., Hamel, M., Algriany, O., Dielemann, S., & Sirard, M.A. (2008). Identification of Potential Markers of Oocyte Competence Expressed in Bovine Cumulus Cells Matured with Follicle-Stimulating Hormone and/or Phosphatidylcholine. *Reproductive biomedicine online* Myristate Acetate In Vitro. *Biology of Reproduction*, 79, 209-222.

Bajo, J.M., & Coroleu B. (2009). *Fundamentos de Reproducción*. Madrid: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.).

Barber, K.J., Franklin, J.A., McCabe, C.J., Khanim, F.L., Bulmer, J.N., Whitley, G.S.J., & Kilby, M.D.J. (2005). The in vitro effects of triiodothyronine on epidermal growth factor-induced trophoblast function. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90, 1655-1661.

Barberi, M., Ermini, B., Morelli, M.B., Ermini, M., Cecconi, S., Canipari, R., Cecconi, S., & Canipari, R. (2012). Follicular fluid hormonal profile and cumulus cell gene expression in controlled ovarian hyperstimulation with recombinant FSH: effects of recombinant LH administration. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29, 1381-1391.

Bates, J.M., St Germain, D.L., & Galton, V.A. (1999). Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*, 140(2), 844-51.

Berbel, P., Mestre, J.L., Santamaría, A., Palazón, I., Franco, A., Graells, M., González-Torga, A., & de Escobar, G.M. (2009). Delayed neurobehavioral development in children born to pregnant women with mild hypothyroxinemia during the first month of gestation: the importance of early iodine supplementation. *Thyroid*, 19(5), 511-9.

- Braw-Tal, R. (1994). Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *Journal of molecular endocrinology*, *13*(3), 253-64.
- Brayshaw, N.D., & Brayshaw, D.D. (1986). Thyroid hypofunction in premenstrual syndrome. *The New England journal of medicine*, *315*(23), 1486-7.
- Brent, G.A., Ross, D.S., & Mulder, J.E. (2010). *Thyroid hormone action*. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.
- Brosens, J.J., Hodgetts, A., Feroze-Zaidi, F., Sherwin, J.R.A., Fusi, L., Salker, M.S., Higham, J., Rose, G.L., Kajihara, T., Young, S.L., Lessey, B.A., Henriot, P., Langford, P.R., & Fazleabas, A.T. (2010). Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, *16*(4), 273–285.
- Burrow, G.N., Fisher, D.A., & Larsen, P.R. (1994). Maternal and fetal thyroid function. *The New England journal of medicine*, *331*(16), 1072-8.
- Cai, W.Y., Lukes, Y.G., Burch, H.B., Djuh, Y.Y., Carr, F., Wartofsky, L., Rhooms, P., D'Avis, J., Baker, J.R. Jr, & Burman, K.D. (1992). Analysis of human TSH receptor gene and RNA transcripts in patients with thyroid disorders. *Autoimmunity*, *13*(1), 43-50.
- Calder, M.D., Caveney, A.N., Westhusin, M.E., & Watson, A.J. (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biology of reproduction*, *65*(1), 135-40.
- Catalano, R.D., Critchley, H.O., Heikinheimo, O., Baird, D.T., Hapangama, D., Sherwin, J.R., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K., & Sharkey, A.M. (2007). Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium. *Molecular human reproduction*, *13*(9), 641-54.

Cecconi, S., Rucci, N., Acaldaferri, M.L., Masciulli, M.P., Rossi, G., Moretti, C., D'Armiento, M., & Ulisse, S. (1999). Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. *Endocrinology*, *140*(4), 1783-1788.

Cerrillo, M., Pacheco, A., Rodríguez, S., Gómez, R., Delgado, F., Pellicer, A., & García-Velasco, J.A. (2011). Effect on GnRH Agonist and hCG treatment on VEGF, angiopoietin-2, and VE-cadherin: trying to explain the link to ovarian hyperstimulation síndrome. *Fertility and Sterility*, *30*, 95-8.

Chappel, S.C., & Howles, C. (1991). Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. *Human reproduction*, *6*(9), 1206-12.

Chen, L.M., Wang, R.S., Lee, Y.F., Liu, N.C., Chang, Y.J., Wu, C.C., Xie, S., Hung, Y.C., & Chang, C. (2008). Subfertility with defective folliculogenesis in female mice lacking testicular orphan nuclear receptor 4. *Molecular endocrinology*, *22*(4), 858-67.

Chin, K.V., Seifer, D.B., Feng, B., Lin, Y., & Shih, W.Ch. (2002). DNA microarray analysis of the expression profiles of luteinized granulosa cells as a function of ovarian reserve. *Fertility and Sterility*, *77*(6).

Choi, Y.S., Ku, S.Y., Jee, B.C., Suh, C.S., Choi, Y.M., Kim, J.G., Moon, S.Y., & Kim, S.H. (2006). Comparison of follicular fluid IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A concentrations and their ratios between GnRH agonist and GnRH antagonist protocols for controlled ovarian stimulation in IVF-embryo transfer patients. *Human Reproduction*, *21*(8), 2015-21.

Chou, H.T., Shi, Y.R., Chang, C.T., & Tsai, F.J. (2002). The polymorphisms of codon 727 and 52 of thyroid-stimulating hormone receptor gene are not associated with mitral valve prolapse syndrome in Taiwan Chinese. *Japanese heart journal*, *43*(6), 655-66.

- Cillo, F., Brevini, T.A., Antonini, S., Paffoni, A., Ragni, G., & Gandolfi, F. (2007). Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction*, *134*(5), 645-50.
- Costa, N.N., Cordeiro, M.S., Silva, T.V.G., Sastre, D., Santana, P.P.B., Sá, A., Sampaio, R.V., Santos, S.S.D., Adona, P.R., Miranda, M.S., & Ohashi, O.M. (2013). Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, *80*(4), 295-301.
- Cuddihy, R.M., Dutton, C.M., & Bahn, R.S. (1995). A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females. *Thyroid*, *5*(2), 89-95.
- Dattatreya Murty, B., Schweder, C.A., & Reichehert, L.E. (1994). Identification in human ovarian follicular fluid of proteins that share an epitope region unique to the extracellular domain of the follicle-stimulating hormone receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *79*(5), 1303-9.
- Davies, T.F., Yin, X., & Latif, R. (2010). The genetics of the thyroid stimulating hormone receptor: history and relevance. Review. *Thyroid*, *20*(7), 727-36.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., & Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of neuroscience*, *20*(12), 4563-72.
- Dayan, C.M., & Panicker, V. (2009). Novel insights into thyroid hormones from the study of common genetic variation. *Nature reviews. Endocrinology*, *5*(4), 211-8.
- De Groot, L.J., Jameson, J.L. (2001) (eds). *Endocrinology*. 4th Ed. United States of America: Saunders Company.
- De los Santos, M.J., García-Láez, V., Beltrán-Torregrosa, D., Horcajadas, J.A., Martínez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Pellicer, A., & Labarta, E. (2012). Hormonal and

molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles. *Human Reproduction*, 27(6), 1596-1605.

De los Santos, M.J., García-Láez, V., Beltrán, D., Labarta, E., Zuzuarregui, J.L., Alamá, P., Gámiz, P., Crespo, J., Bosch, E., & Pellicer, A. (2013). The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: is it hypoandrogenic? *Human Reproduction*, 28(1), 224-229.

De Silva, M. (1994). Detection and measurement of thyroid stimulating hormone in human follicular fluid. *The Journal of reproductive medicine*, 39(9), 679-80.,

Dellovade, T.L., Chan, J., Vennstrom, B., Forrest, D., & Pfaff, D.W. (2000). The two thyroid hormone receptor genes have opposite effects on estrogen-stimulated sex behaviors. *Nature neuroscience*, 3(5), 472-5.

Denver, R.J., Ouellet, L., Furling, D., Kobayashi, A., Fujii-Kuriyama, Y., & Puymirat, J. (1999). Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. Evidence for a role in neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 23128-34.

Detti, L., Uhlmann, R.A., Fletcher, M.N., Michael, B.S., Diamond, P., & Saed, G.M. (2013). Endometrial signaling pathways during ovarian stimulation for assisted reproduction technology. *Fertility and Sterility*, 100(3), 0015-0282.

Di Zerega, G.S., Hodgen, G.D. (1981). Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocrine reviews*, 2(1), 27-49.

Duprez, L., Parma, J., Van Sande, J., Rodien, P., Dumont, J.E., Vassart, G., & Abramowicz, M. (1998). TSH receptor mutations and thyroid disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 9(4), 133-40.

Dutton, C.M., Joba, W., Spitzweg, C., Heufelder, A.E., & Bahn, R.S. (1997). Thyrotropin receptor expression in adrenal, kidney, and thymus. *Thyroid*, 7(6), 879-84.

- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., & Tews, G. (2003). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human reproduction*, *9*(3), 251-62.
- Evans, R.W., Farwell, A.P., Braverman, L.E. (1983). Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinology*, *113*(4), 1459-63.
- Fahiminiya, S., & Gérard, N. (2010). Le liquid folliculaire chez les mammifères. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, *38*(6), 402-4.
- Firmin, C., Antoine, J.M., Millot, F., Alvarez, S., Debray, M., Tibi, C., Cornet, D., Salat-Baroux, J., & Laruelle, P. (1991). Comparison of plasma and follicular fluid hormone profiles following stimulation with HMG, with or without LHRH agonists, for in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, *6*(5), 653-658.
- Fleming, R., Chung, C.C., Yates, R.W.S., & Coutts, J.R.T. (1996). Purified urinary follicle stimulating hormone induces different hormone profiles compared with menotrophins, dependent upon the route of administration and endogenous luteinizing hormone activity. *Human Reproduction*, *11*(9), 1854-58.
- Forrest, D., Sjöberg, M., & Vennström, B. (1990). Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes. *The EMBO journal*, *9*(5), 1519-28.
- Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R.J., Everds, N., Stewart, C.L., Wehner, J.M., & Curran, T. (1996). Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *The EMBO journal*, *15*(12), 3006-15.
- Friesema, E.C., Docter, R., Moerings, E.P., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Krenning, E.P., Hennemann, G., & Visser, T.J. (1999). Identification of thyroid hormone transporters. *Biochemical and biophysical research communications*, *254*(2), 497-501.

Friesema, E.C., Docter, R., Moerings, E.P., Verrey, F., Krenning, E.P., Hennemann, G., & Visser, T.J. (2001). Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology*, *142*(10), 4339-48.

Fritz, M.A., & Speroff, L. (1982). The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertility and sterility*, *38*(5), 509-29.

Galton, V.A., Martinez, E., Hernandez, A., St. Germain, E.A., Bates, J.M., & St. Germain, D.L. (1999). Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *The Journal of clinical investigation*, *103*, 979-987.

Galton, V.A., Martinez, E., Hernandez, A., St Germain, E.A., Bates, J.M., & St Germain, D.L. (2001). The Type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*, *142*(5), 2123-8.

Galton, V.A., McCarthy, P.T., & St Germain, D.L. (2001). The ontogeny of iodothyronine deiodinase systems in liver and intestine of the rat. *Endocrinology*, *128*(4), 1717-22.

García, J.A., & Requena, A. (2007) *El óvulo: implicación en reproducción humana. Cuadernos de Medicina Reproductiva*. Vol 13, num 3. Madrid: Adalia.

Gatta, V., Tatone, C., Ciriminna, R., Vento, M., Franchi, S., d'Aurora, M., Sperduti, S., Cela, V., Borzì, P., Palermo, R., Stuppia, L., & Artini, P.G. (2013). Gene expression profiles of cumulus cells obtained from women treated with recombinant human luteinizing hormone, recombinant human follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin versus recombinant human follicle-stimulating hormone alone. *Fertility and Sterility*, *99*(7), 0015-0282.

Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., & Russell, D.L. (2011). Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility*, *96*(1), 47-52.



- Gerhard, I., Becker, T., Eggert-Kruse, W., Klinga, K., & Runnebaum, B. (1991). Thyroid and ovarian function in infertile women. *Human reproduction*, *6*(3), 338-45.
- Gilchrist, R.B., Lane, M., & Thompson, J.G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction*, *14*(159), 77.
- Giudice, L.C. (1999). Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Human Reproduction*, *14*(2), 3-16.
- Goglia, F., Moreno, M., & Lanni, A. (1999). Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS letters*, *452*(3), 115-20.
- Grøndahl, M.L., Borup, R., Bae, Y.L., Myrhøj, V., Meinertz, H., & Sørensen, S. (2009). Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal. *Fertility and Sterility*, *91*(5), 1820-30.
- Grøndahl, M.L., Nielsen, M., Dal Canto, M.B., Fadini, R., Rasmussen, I.A., Westergaard, L.G., Kristensen, S.G., & Andersen, C.Y. (2011). Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, *22*, 389–398.
- Grumbach, Mm., & Ducharme, Jr. (1960). The effects of androgens on fetal sexual development: androgen-induced female pseudohermaphroditism. *Fertility and sterility*, *11*(157), 80.
- Gui, L.M., & Joyce, I.M. (2005). RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biology of reproduction*, *72*(1), 195-9.
- Guo, T.W., Zhang, F.C., Gao, J.J., Bian, L., Gao, X.C., Ma, J., Yang, M., Ji, Q., Duan, S.W., Zheng, Z.J., Li, R.L., Feng, G.Y., St. Clair, D., & He, L. (2005). Polymorphisms in the TSHR gene on chromosome 14q31 are not associated with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. *Neuroscience letters*, *1-8*;382(1-2), 179-84.

Guyton Arthur C. (1993) Tratado de Fisiología Médica. 8ª ed. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill.

Hagenbuch, B. (2007). Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 21(2), 209-221.

Hansen, P.S., van der Deure, W.M., Peeters, R.P., Iachine, I., Fenger, M., Sørensen, T.I., Kyvik, K.O., Visser, T.J., & Hegedüs, L. (2007). The impact of a TSH receptor gene polymorphism on thyroid-related phenotypes in a healthy Danish twin population. *Clinical endocrinology*, 66(6), 827-32.

Hapon, M.B., Gamarra-Luques, C., & Jahn, G.A. (2010). Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reproductive biology and endocrinology*, 11(8), 14.

Hastings, M.L., Milcarek, C., Martincic, K., Peterson, M.L., & Munroe, S.H. (1997). Expression of the thyroid hormone receptor gene, *erbA*α, in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels. *Nucleic acids research*, 25(21), 4296-300.

Hennemann, G., Krenning, E.P., Polhuys, M., Mol, J.A., Bernard, B.F., Visser, T.J., & Docter, R. (1986). Carrier-mediated transport of thyroid hormone into rat hepatocytes is rate-limiting in total cellular uptake and metabolism. *Endocrinology*, 119(4), 1870-2.

Hess, K.A., Chen, L., & Larsen, W. (1998). The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice. *Biology of reproduction*, 58(3), 705-11.

Hill, M.J., Levens, E.D., Levy, G., Ryan, M.E., Csokmay, J.M., DeCherney, A.H., & Whitcomb, B.W. (2012). The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 97(5), 1108-14.

Hodin, R.A., Lazar, M.A., & Chin, W.W. (1990). Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *The Journal of clinical investigation*, *85*(1), 101-5.

Hodin, R.A., Lazar, M.A., Wintman, B.I., Darling, D.S., Koenig, R.J., Larsen, P.R., Moore, D.D., & Chin, W.W. (1989). Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, *244*(4900), 76-9.

Holsberger, D.R., & Cooke, P.S. (2005). Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and tissue research*, *322*, 133–140.

Hornstein, M.D., Gibbons, W.E., Barbieri, R.L., & Barss, B.A. (2010) Optimizing natural fertility in couples planning pregnancy. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.

Huang, S.A., Dorfman, D.M., Genest, D.R., Salvatore, D., & Larsen, P.R. (2003). Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *88*(3), 1384-8.

Huang, S.A. (2005), Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid*, *15*(8), 875-81.

Jannini, E.A., Crescenzi, A., Rucci, N., Screponi, E., Carosa, E., de Matteis, A., Macchia, E., d'Amati, G., & D'Armiento, M. (2000). Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *85*(9), 3453-7.

Jindal, S., Greenseid, K., Berger, D., Santoro, N., & Pal, L. (2012). Impaired Gremlin 1 (GREM1) expression in cumulus cells in young women with diminished ovarian reserve (DOR). *Journal of assisted reproduction and genetics*, *29*, 159–162.

Joseph, T., Zalenskaya, I.A., Sawyer, L.C., Chandra, N., & Doncel, G.F. (2013). Seminal Plasma Induces Prostaglandin-Endoperoxide Synthase (PTGS) 2 Expression in

Immortalized Human Vaginal Cells: Involvement of Semen Prostaglandin E2 in PTGS2 Upregulation<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 88(1), 1–10.

Kalro, B.N. (2003). Impaired fertility caused by endocrine dysfunction in women. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 32(3), 573-92.

Kester, M.H., Kuiper, G.G., Versteeg, R., & Visser, T.J. (2006). Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology*, 147(12), 5845-54.

Kilby, M.D., Verhaeg, J., Gittoes, N., Somerset, D.A., Clark, P.M.S., & Franklin, J.A. (1998). Circulating thyroid hormone concentrations and placental thyroid hormone receptor expression in normal human pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction (IUGR). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83(8), 2964-71.

Kirkland, J.L., Mukku, V., Hardy, M., & Young, R. (1983). Evidence for triiodothyronine receptors in human endometrium and myometrium. *American journal of obstetrics and gynecology*, 146(4), 380-3.

Kirkland, J.L., Mukku, V.R., Hardy, M., & Stancel, G.M. (1984). Hormonal control of uterine growth: alterations in luminal epithelial deoxyribonucleic acid synthesis after intraluminal application of estrogen. *Endocrinology*, 114(3), 969-73.

Klein, I. (2001). Clinical, metabolic, and organ-specific indices of thyroid function. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 30(2), 415-27.

Kleinau, G., & Krause, G. (2009). Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocrine reviews*, 30(2), 133-51.

Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W., Moore, D.D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature*, 337(6208), 659-61.

- Körle, J. (1999). Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and cellular endocrinology*, 151(1-2), 103-19.
- Krassas, G.E. (2000). Thyroid disease and female reproduction. *Fertility and sterility*, 74(6) 1063-70.
- Krassas, G.E., Poppe, K., & Glinoeer D (2010). Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine reviews*, 31(5), 702-55.
- Kullak-Ublick, G.A., Ismail, M.G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P.J., & Hagenbuch, B. (2000). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*, 120(2), 525-33.
- Kumar, R.S., Ijiri, S., Kight, K., Swanson, P., Dittman, A., Alok, D., Zohar, Y., & Trant, J.M. (2000). Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. *Molecular and cellular endocrinology*, 167(1-2), 1-9.
- Larsen, P.R. (1981). Regulation of thyrotropin secretion by 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine. *Progress in clinical and biological research*, 74, 81-93.
- Lazar, M.A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews*, 14(2), 184-93.
- Lazar-Wesley, E., Hadcock, J.R., Malbon, C.C., Kunos, G., & Ishac, E.J. (1991). Tissue-specific regulation of alpha 1B, beta 1, and beta 2-adrenergic receptor mRNAs by thyroid state in the rat. *Endocrinology*, 129(2), 1116-8.
- Lechan, R.M., & Fekete, C. (2005). Role of thyroid hormone deiodination in the hypothalamus. *Thyroid*, 8, 883-97.

Lee, A., Christenson, L.K., Stouffer, R.L., Burry, K.A., & Patton, P.E. (1997). Vascular endothelial growth factor levels in serum and follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, *68*(2), 305-11.

Lefevre, B., Kraiem, Z., Epstein, Y., Lunenfeld, B., Gougeon, A., Thebault, A., Bomsel-Ehlreich, O., Frydman, R., Papiernik, E., Saltarelli, D., Brailly, S., & Milgrom, E. (1981). Inhibin-like activity and steroid content in human follicular fluid during the periovulatory period. *International journal of fertility*, *26*(4), 295-6.

Lema, S.C., Dickey, J.T., Schultz, I.R., & Swanson, P. (2009). Thyroid hormone regulation of mRNAs encoding thyrotropin beta-subunit, glycoprotein alpha-subunit, and thyroid hormone receptors alpha and beta in brain, pituitary gland, liver, and gonads of an adult teleost, *Pimephales promelas*. *The Journal of endocrinology*, *202*(1), 43-54.

Leonard, J.L., & Rosenberg, I.N. (1978). Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil. *Endocrinology*, *103*(6), 2137-44.

Leonard, R. (1996). The endocrine environment. *European journal of cancer care*, *5*(3), 1.

Lévy, D.P., Navarro, J.M., Schattman, G.L., Davis, O.K., & Rosenwaks, Z. (2000). The role of LH in ovarian stimulation. Exogenous LH: let's design the future. *Human Reproduction*, *15*(11), 2258-65.

Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., & Dey, S.K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, *91*(2), 197-208.

Loder, N. (1999). Genetic variations can point the way to disease genes. *Nature*, *401*, 734.

Lösel, R., & Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(1), 46-56.

Lussiana, C., Guani, B., Mari, C., Restagno, G., Massobrio, M., & Revelli, A. (2008). Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene. Clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene. *Obstetrical & gynecological survey*, 63(12), 785-95.

Macchia, P.E., Takeuchi, Y., Kawai, T., Cua, K., Gauthier, K., Chassande, O., Seo, H., Hayashi, Y., Samarut, J., Murata, Y., Weiss, R.E., & Refetoff, S. (2001). Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 349-54.

Malbon, C.C., & Greenberg, M.L. (1982). 3,3',5-triiodothyronine administration in vivo modulates the hormone-sensitive adenylate cyclase system of rat hepatocytes. *The Journal of clinical investigation*, 69(2), 414-26.

Maran, R.R.M. (2003). Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Archives of Andrology*, 49, 375-388.

Maruo, T., Hayashi, M., Matsuo, H., Yamamoto, T., Okada, H., & Mochizuki, M. (1987). The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 121(4), 1233-41.

Maruo, T., Hiramatsu, S., Otani, T., Hayashi, M., & Mochizuki, M. (1992). Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. *Acta endocrinologica*, 127(2), 152-60.

Matorras, R., & Hernández, J. (eds). (2007). *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la*

*Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción.*  
Madrid: Adalia.

Matorras, R., & Romeu, A. (eds). (2007). *Baja Respuesta en Fecundación in Vitro.*  
Madrid: Ed. Médica.

Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., & Eppig, J.J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296(5576), 2178-80.

McKenzie, L.M., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M. (2004). Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 19(12), 2869–2874.

Meinhold, H., Gramm, H.J., Meissner, W., Zimmermann, J., Schwander, J., Dennhardt, R., & Voigt, K. (1991). Elevated serum diiodotyrosine (DIT) in severe infections and sepsis: DIT, a possible new marker of leukocyte activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 72(4), 945-53.

Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E., & Tesarik (2002). Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Journal of Human Reproduction*, 17(4), 1017-1022.

Meng, C.X., Andersson, K.L., Bentin-Ley, U., Gemzell-Danielsson, K., & Lalitkumar, L. (2009), Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model. *Fertility and Sterility*, 91(1), 256-264.

Moncayo, H.E., & Moncayo, R. (1997). Thyroid function and infertility. *Human reproduction*, 12(12), 2854-6.

Moncayo, H.E., Penz-Koza, A., Marth, C., Gastl, G., Herold, M., & Moncayo, R. (1998). Vascular endothelial growth factor in serum and in the follicular fluid in patients



- undergoing hormonal stimulation for in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, *13*(12), 3310-3314.
- Morel, G., Ricard-Blum, S., & Ardail, D. (1996). Kinetics of internalization and subcellular binding sites for T3 in mouse liver. *Biology of the cell*, *86*(2-3), 167-74.
- Mukku, V.R., Kirkland, J.L., Hardy, M., & Stancel, G.M. (1983). Evidence for thyroid hormone receptors in uterine nuclei. *Metabolism*, *32*(2), 142-5.
- Muller, A.F., Verhoeff, A., Mantel, M.J., De Jong, F.H., & Berghout, A. (2000). Decrease of free thyroxine levels after controlled ovarian hyperstimulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *85*(2), 545-8.
- Mutinati, M., Desantis, S., Rizzo, A., Zizza, S., Ventriglia, G., Pantaleo, M., & Sciorsci, R.L. (2010). Localization of thyrotropin receptor and thyroglobulin in the bovine corpus luteum. *Animal reproduction science*, *118*(1), 1-6.
- Mutvei, A., Kuzela, S., & Nelson, B.D. (1989). Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *European journal of biochemistry*, *180*(1), 235-40.
- Nelson, E.R., & Habibi, H.R. (2009). Thyroid receptor subtypes: structure and function in fish. *General and comparative endocrinology*, *161*(1), 90-6.
- Nelson, E.R., Allan, E.R., Pang, F.Y., & Habibi, H.R. (2010). Thyroid hormone and reproduction: regulation of estrogen receptors in goldfish gonads. *Molecular reproduction and development*, *77*(9), 784-94.
- Nelson, E.R., Allan, E.R., Pang, F.Y., & Habibi, H.R. (2011). Auto-regulation of thyroid hormone receptors in the goldfish ovary and testis. *General and comparative endocrinology*, *172*(1), 50-5.
- O'Leary, S., Jasper, M.J., Warnes, G.M., Armstrong, D.T., & Robertson, S.A. (2004). Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction*, *128*(2), 237-47.

- Öner, J., & Öner H (2007) Immunodetection of thyroid hormone receptor ( $\alpha 1/\alpha 2$ ) in the rat uterus and oviduct. *Acta histochemica et cytochemica*, 40(3), 77-81.
- Oppenheimer, J.H. (1985). Thyroid hormone action at the nuclear level. *Annals of internal medicine*, 102(3), 374-84.
- Ortega, F.J., Moreno, J.M., Ribas, V., Esteve, E., Rodriguez, J.I., Ruiz, B., Peral, B., Ricart, W., Zorzano, A., & Fernández-Real, J.M. (2009). Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor- $\alpha 1$  gene expression than omental fat. *Obesity*, 17(12), 2134-2141.
- Ortega, F.J., Moreno, J.M., Pardo, G., Sabater, M., Hummel, M., Ferrer, A., Rodríguez, J.I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., & Fernández-Real, J.M. (2010). MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. *PLoS One*, 5(2):e9022.
- Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N., & Aurich, C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*, 70(5), 843-51.
- Papiernik, E., Spira, A., Bomsel-Helmrich, O., & Lebel, S. (1979). Ovarian overripeness and intrauterine growth retardation. *Lancet*, 2(8150), 1025-6.
- Pavelka, S., Kopecký, P., Bendlová, B., Stolba, P., Vítková, I., Vobruba, V., Plavka, R., Houstek, J., & Kopecký, J. (1997). Tissue metabolism and plasma levels of thyroid hormones in critically ill very premature infants. *Pediatric research*, 42(6), 812-8.
- Peeters, R.P., van Toor, H., Klootwijk, W., de Rijke, Y.B., Kuiper, G.J.M., Uitterlinden, A.G., & Visser, T.J. (2003). Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(6), 2880-8.

Peeters, R.P., van den Beld, A.W., Attalki, H., van Toor, H., de Rijke, Y.B., Kuiper, G.J.M., Lambertw, S.W.J., Joop, A.M., Janssen, J.L., Uitterlinden, A.G., & Visser, T. (2005). A new polymorphism in the type II deionidase gene is associated with circulating thyroid hormone parameters. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 289, E75-E81.

Peeters, R.P., van den Beld, A.W., van Toor, H., Uitterlinden, A.G., Jansen, J., Lamberts, S.W.J., & Visser, T.J. (2005). A polymorphism in type I deiodinase is associated with circulating free Insulin-Like Growth Factor I levels and body compositions in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), 256-263.

Peeters, R.P., van der Deure, W.M., & Visser, T.J. (2006). Genetic variation in thyroid hormone pathway genes; polymorphisms in the TSH receptor and the iodothyronine deiodinases. Review. *Eur The Journal of endocrinology*, 155(5), 655-62.

Pitt-Rivers, R., & Trotter, Wr. (1953). The site of accumulation of iodide in the thyroid of rats treated with thiouracil. *Lancet*, 265(6792), 918-9.

Poppe, K., Velkeniers, B., & Glinoyer, D. (2007). Thyroid disease and female reproduction. *Clinical endocrinology*, 66(3), 309-21.

Rae, M.T., Gubbay, O., Kostogiannou, A., Price, D., Critchley, H., & Hillier, S.G. (2007). Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(1), 322-7.

Raheem, K.A., Marei, W.F., Mifsud, K., Khalid, M., Wathes, D.C., & Fouladi-Nashta, A.A. (2013). Regulation of the hyaluronan system in ovine endometrium by ovarian steroids. *Reproduction Research*, ISSN 1470-1626.

Rajatapiti, P., Kester, M.H.A., de Krijger, R.R., Rottier, R., Visser, T.J., & Tibboel, D. (2005). Expression of glucocorticoid, retinoid, and thyroid hormone receptors during

human lung development. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(7), 4309–4314.

Rao, G.S., Seidler, F.J., & Slotkin, T.A. (1995). Modulation of hepatic adrenergic receptor ontogeny by thyroid hormone. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, 87(1), 27-42.

Refetoff, S., Weiss, R.E., Grasberger, H., Cooper, D.S., & Hoppin, A.G. Resistance to thyrotropin and thyrotropin-releasing hormone. (2010) In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.

Refetoff, S., Dumitrescu, A.M., Cooper, D.S., Ross, D.S., Hoppin, A.G. (2010) Reduced sensitivity to thyroid hormone. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.

Reh, A., Grifo, J., & Danoff, A. (2010). What is a normal thyroid-stimulating hormone (TSH) level? Effects of stricter TSH thresholds on pregnancy outcomes after in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 94(7), 2920-2.

Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology*, 7, 40.

Reyne, Y., Nougès, J., Cambon, B., Viguerie-Bascands, N., & Casteilla, L. (1996). Expression of c-erbA alpha, c-erbA beta and Rev-erbA alpha mRNA during the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*, 116(1), 59-65.

Rizzo, A., Minoia, G., Trisolini, C., Mutinati, M., Spedicato, M., Manca, R., & Sciorsci, R.L. (2009). Renin and ovarian vascularization in cows with follicular cysts after epidural administration of a GnRH analogue. *Animal reproduction science*, 116(3-4), 226-32.

- Ross, D.S., Cooper, D.S., & Mulder, J.E. (2010) Subclinical hypothyroidism. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.
- Ross, D.S., Lockwood, C.J., Cooper, D.S., & Mulder, J.E. (2010). Overview of thyroid disease in pregnancy. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.
- Sakurai, A., Nakai, A., & DeGroot, L.J. (1990). Structural analysis of human thyroid hormone receptor beta gene. *Molecular and cellular endocrinology*, 71(2), 83-91.
- Salustri, A., Camaioni, A., & D'Alessandris, C. (1996). Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. *Zygote*, 4(4), 313-5.
- Salvatore, D., Tu, H., Harney, J.W., & Larsen, P.R. (1996). Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *The Journal of clinical investigation*, 98(4), 962-8.
- Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., & Vennström, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 324(6098), 635-40.
- Satoh, T., Yamada, M., Iwasaki, T., & Mori, M. (1996). Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *The Journal of biological chemistry*, 271(44), 27919-26.
- Schoolcraft, W., Huynh, D., Sinton, E., Hamilton, F., Schlenker, T., & Meldrum, D.R. (1991). Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate. *Fertility and Sterility*, 55(3), 563-66.
- Schweigert, F.J., Gericke, B., Wolfram, W., Kaisers, U., & Dudenhausen, J.W. (2006). Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Human Reproduction*, 21(11), 2960–2968.

- Sechman, A., Pawlowska, K., & Rzasa, J. (2008). Influence of triiodothyronine (T3) on secretion of steroids and thyroid hormone receptor expression in chicken ovarian follicles. *Domestic animal endocrinology*, *37*(2), 61-73.
- Sha, G., Wu, D., Zhang, Z., Chen, X., Lei, M., Sun, H., Lin, S., & Lang, J. (2007). Differentially expressed genes in human endometrial endothelial cells derived from eutopic endometrium of patients with endometriosis compared with those from patients without endometriosis. *Human Reproduction*, *22*(12), 3159–3169.
- Shahrara, S., Sylvén, C., & Drvota, V. (2000). Subtype specific downregulation of thyroid hormone receptor mRNA by beta-adrenoreceptor blockade in the myocardium. *Biological & pharmaceutical bulletin*, *23*(11), 1303-6.
- Shapiro, B.S., Daneshmand, S.T., De Leon, L., Garner, F.C., Aguirre, M., & Hudson, C. (2012). Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertility and sterility*, *98*(6), 1490-4.
- Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., & Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular human reproduction*, *13*(7), 491–501.
- Sharkey, D.J., Tremellen, K.P., Jasper, M.J., Gemzell-Danielsson, K., & Robertson, S.A. (2012). Seminal Fluid Induces Leukocyte Recruitment and Cytokine and Chemokine mRNA Expression in the Human Cervix after Coitus. *Journal of immunology*, *188*, 2445-2454.
- Simón, C., & Pellicer, A. (eds). (2007). *Stem Cells in Human Reproduction*. UK: Informa Healthcare.
- Slebodzinski, A.B. (2005). Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid. The enigma of the thyroid ovary interaction. *Domestic animal endocrinology*, *29*(1), 97-103.

Sorensen, H.G., van der Deure, W.M., Hansen, P.S., Peeters, R.P., Breteler, M.M.B., Kyvik, K.O., Sorensen, T.I.A., Hegedüs, L., & Visser, T.J. (2008). Identification and consequences of polymorphisms in the thyroid hormone receptor alpha and beta genes. *Thyroid*, *18*(19), 1087-94.

Speroff, L., & Fritz, M.A. (eds). (2006) *Endocrinología Ginecológica Clínica y Esterilidad*. 2ª Ed. Madrid: Lippincott Williams and Wilkins.

Spicer, L.J., Alonso, J., & Chamberlain, C.S. (2001). Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *Journal of dairy science*, *84*(5), 1069-76.

St. Germain, D.L., & Galton, V.A. (1997). The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid*, *7*(4), 655-68.

Ston, B.A., Serafini, P.C., Batzofin, J.H., Quinn, P., Kerin, J.F., & Marrs, R.P. (1988). Interrelationships between plasma hormone levels and the content of total protein, gonadotropins and steroid hormones in antral fluids of women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, *50*(1), 102-9.

Stravreus, E.A. (2012). Paracrine interactions of thyroid hormones and thyroid stimulation hormone in the female reproductive tract have an impact on female fertility. *Frontiers in Endocrinology*. Mini Review Article. Doi: 10.3389/fendo.2012.00050.

Suarez, E.A., d'Alva, C.B., Campbell, A., Miller-Horn, J., Dever, M., Faerber, E., Medonca, B.B., Latronico, A.C., & De Luca, F. (2007). Absence of mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene in severe primary hypothyroidism associated with gonadal hyperstimulation. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, *20*(8), 923-31.

Sun, S.C., Hsu, P.J., Wu, F.J., Li, S.H., Lu, C.H., & Luo, C.W. (2010). Thyrostimulin, but not thyroid-stimulating hormone (TSH), acts as a paracrine regulator to activate the

TSH receptor in mammalian ovary. *The Journal of biological chemistry*, 5;285(6), 3758-65.

Surks, M.I., Ortiz, E., Daniels, G.H., Sawin, C.T., Col, N.F., Cobin, R.H., Franklin, J.A., Hersjman, J.M., Burman, K.D., Denke, M.A., Gorman, C., Cooper, R.S., & Weissman, N.J. (2004). Subclinical Thyroid Disease. Scientific Review and Guidelines for Diagnosis and Management. *JAMA*, 291(2), 228-238.

Talbi, S., Hamilton, A.E., Vo, K.C., Tulac, S., Overgaard, M.T., Dosiou, C., Le Shay, N., Nezhat, C.N., Kempson, R., Lessey, B.A., Nayak, N.R., & Giudice, L.C. (2006). Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*, 147(3), 1097-121.

Teissier, M.P., Chable, H., Paulhac, S., & Aubard, Y. (1999). Recombinant human follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin induction: effects in mature follicle endocrinology. *Human Reproduction*, 14(9), 2236-41.

Thabane, L., Ma, J., Chu, R., Chengm J., Ismailam, A., Rios, L.P., Robson, R., Thabane, M., Giangregorio, L., & Goldsmith, C.H. (2010). A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC medical research methodology*, 10, 1.

Thomas, R., & Reid, R.L. (1987). Thyroid disease and reproductive dysfunction: a review. *Obstetrics and gynecology*, 70(5), 789-98.

Thonneau, P., & Spira, A. (1981). Prevalence of infertility: international data and problems of measurement. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 38(1), 43-52.

Tonacchera, M., & Pinchera, A. (2000). Thyrotropin receptor polymorphisms and thyroid diseases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(8), 2637-9.

Tonacchera, M., Ferrarini, E., Dimida, A., Agretti, P., De Marco, G., Pinchera, A., Sanders, J., Evans, M., Richards, T., Furmaniak, J., & Smith, B.R. (2006). Effects of a



thyroid-stimulating human monoclonal autoantibody (M22) on functional activity of LH and FSH receptors. *Thyroid*, 16(11), 1085-9.

Tonetta, S.A., Stone, B.A., Marrs, R.P., & di Zerega, G.S. (1990). Concentrations of follicle regulatory protein, steroids and gonadotrophins in antral fluids from women stimulated with metrodin and hCG. *Journal of reproduction and fertility*, 88, 389-97.

Tulandi, T., Lockwood, C.J., Barss, V.A., & Al Fozan, H.M. (2010). Management of couples with recurrent pregnancy loss. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.

Van der Deure, W., Peeters, R.P., & Visser, T.J. (2007). Genetic variation in thyroid hormone transporters. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 21(2), 339-50.

Van der Deure, W., Peeters, R.P. & Visser, T.J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *Journal of Molecular Endocrinology*, 44, 1-11.

Van Voorhis, B.J., Neff, T.W., Syrop, C.H., & Chapler, F.K. (1994). Primary hypothyroidism associated with multicystic ovaries and ovarian torsion in an adult. *Obstetrics and gynecology*, 83(5), 885-7.

Viguerie, N., Millet, L., Avizou, S., Vidal, H., Larrouy, D., & Langin, D. (2002). Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(2), 630-4.

Visser, W.E., Friesema, E.C., Jurgen, J., & Visser, T.J. (2007). Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19(2), 50-56.

Viticchi, C., Basso, A., Zaia, A., & Piantanelli, L. (1992). Thyroid hormone-induced up-regulation of beta1- and beta2-adrenergic receptors during aging. *Archives of gerontology and geriatrics*, 15(1), 367-74.

- Wakim, A.N., Polizzotto, S.L., Buffo, M.J., Marrero, M.A., & Burholt, D.R. (1993). Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertility and sterility*, *59*(6), 1187-90.
- Wakim, A.N., Paljug, W.R., Jasnosz, K.M., Alhakim, N., Brown, A.B., & Burholt, D.R. (1994). Thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cells. *Fertility and sterility*, *62*(3), 531-4.
- Wakim, A.N., Polizzotto, S.L., & Burholt, D.R. (1994). Alfa-1 and beta-1 thyroid hormone receptors on human granulosa cells. *Recent progress in hormone research*, *49*, 377-81.
- Walker, J.D., Crawford, F.A. Jr, Mukherjee, R., & Spinale, F.G. (1995). The direct effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) on myocyte contractile processes. Insights into mechanisms of action. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, *110*(5), 1369-79.
- Wang, T.T., Wu, Y.T., Dong, M.Y., Sheng, J.Z., Leung, P.C., & Huang, H.F. (2010). G546A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertility and sterility*, *94*, 2490-2.
- Wasco, E.C., Martinez, E., Grant, K.S., St. Germain E.A., St. Germain, D.L., Galton, V.A. (2003). Determinants of iodothyronine deiodinase activities in rodent uterus. *Endocrinology*, *144*(10), 4253-4261.
- Wdowiak, A., Lewicka, M., Plewka, K., & Bakalczuk, G. (2013). Nicotinism and quality of embryos obtained in in-vitro fertilization programmes. *Annals of agricultural and environmental medicine*, *20* (1), 82-5.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., & Evans, R.M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, *324*(6098), 641-6.

- Weiss, R.E., Murata, Y., Cua, K., Hayashi, Y., Seo, H., & Refetoff, S. (1998). Thyroid hormone action on liver, heart, and energy expenditure in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology*, *139*(12), 4945-52.
- Welt, C.K., Barbieri, R.L., Crowley, W.F., & Martin, K.A. (2010). Pathogenesis and causes of spontaneous premature ovarian failure. In: Up To Date. Rose, B.D. (Ed), Up To Date, Waltham, M.A.
- Wilansky, D.L., & Greisman, B. (1989). Early hypothyroidism in patients with menorrhagia. *American journal of obstetrics and gynecology*, *160*(3), 673-7.
- Williams, G.R. (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Molecular and cellular biology*, *20*(22), 8329-42.
- Winikoff, D., & Malinek, M. (1975). The predictive value of thyroid "test profile" in habitual abortion. *British journal of obstetrics and gynaecology*, *82*(9), 760-6.
- Wu, S., & Wolgemuth, D.J. (1995). The distinct and developmentally regulated patterns of expression of members of the mouse Cdc25 gene family suggest differential functions during gametogenesis. *Developmental biology*, *170*(1), 195-206.
- Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews*, *81*(3), 1097-142.
- Yoshimura, M., Hershman, J.M., Pang, X.P., Berg, L., & Pekary, A.E. (1993). Activation of the thyrotropin (TSH) receptor by human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone in Chinese hamster ovary cells expressing functional human TSH receptors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *77*(4), 1009-13.
- Zhang, S.S., Carrillo, A.J., & Darling, D.S. (1997), Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Molecular human reproduction*, *3*(7), 555-62.

Zhang, J., & Lazar, M.A. (2000). The mechanism of action of thyroid hormones. *Annual review of physiology*, 62, 439-66.



## 10. ANNEXES

---



## **10.1. EQUIPAMENT DEL LABORATORI**

---





**Taula 17.** Equipament del laboratori emprat pel desenvolupament d'aquest treball

<b>Equip</b>	<b>Marca</b>	<b>Model</b>	<b>País</b>
<b>Dispensador automàtic</b>	LabChip	Agilent2100 Bioanalyzer	Anglaterra
<b>Centrifuga</b>	Hettich Zentrifugen	Hettich Universal 32R	Alemanya
<b>Congelador -20°C</b>	Bosch	GSE36421	Espanya
<b>Bioanalyzer®</b>	Drummord	Pipet-Ais	EUA
<b>Espectrofotòmetre</b>	HITACHI	U-1800	Japó
<b>Espectrofotòmetre</b>	GeneQuant	GeneQuant Pro	Anglaterra
<b>Fàbrica de Gel</b>	BAR-LINE	BF-85-AS	Espanya
<b>Joc micropipetes</b>	GILSON	PipetMan	França
<b>Microcentrifuga</b>	Eppendorf Centrifuge	5415R	Anglaterra
<b>Microcentrifuga</b>	Jouan	A14	Espanya
<b>Micropipeta</b>	Nichiryo	Nichipet 7000 40-200µL	Xina
<b>Microscopi</b>	Zeiss	Axiovert 40 CFL	EUA
<b>Nevera</b>	Bosch	Cooler	Espanya
<b>Ordinador portàtil</b>	DELL	Lattitude C810	Xina
<b>Real-Time PCR</b>	Applied Biosystems	ABI Prism 7000	Anglaterra
<b>Termobloc</b>	SELECTA	Tenbloc (Eppendorf®)	Espanya

**Taula 17.** Equipament del laboratori emprat pel desenvolupament d'aquest treball

<b>Termociclador</b>	Bio-Rad MyCycler	Thermal Cycler	Anglaterra
<b>Ultracongelador</b> <b>-80°C</b>	Sanyo	MDF-U71V	Japó
<b>Ultrafragmentador</b>	IKA	Ultraturrax Werke	Anglaterra
<b>Vortex</b>	Scientific Industrial	Genie-2	EUA

**Taula 18.** Reactius i kits comercials utilitzats per la elaboració dels bancs de mostres, l'anàlisi i la caracterització molecular

<b>Kit/Reactius</b>	<b>Definició</b>	<b>Referència</b>	<b>Casa</b>	<b>Pais</b>
<b>RNeasy® Lipid Tissue</b>	Kit d'extracció de RNA	74804	QIAgen	EUA
<b>Kit High- Capacity® cDNA Archive</b>	Kit de retrotranscripció RNAcDNA	4322171	Applied Biosystems	Anglaterra
<b>TaqMan® PCR Master Mix</b>	Per l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant <i>primers</i> & <i>sondes</i> TaqMan®	4304437	Applied Biosystems	Anglaterra
<b>Power SYBR® Green PCR Master Mix</b>	Per l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant primers segons la tecnologia Sybr® Green	436857	Applied Biosystems	Anglaterra

## **10.2. CONSENTIMENTS INFORMATS**

---



## **FULL D' INFORMACIÓ I CONSENTIMENT INFORMAT A LES DONANTS D'ÒVULS**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

### **INFORMACIÓ GENERAL**

En condicions ideals, per tal de fer un diagnòstic acurat del factor d'esterilitat, i prèviament a la realització de tècniques de reproducció assistida (FIV/ICSI), és convenient fer un conjunt de proves diagnòstiques que ens proporcionin el màxim d'informació amb les mínimes molèsties per a les pacients. L'estudi detallat ens ajuda a determinar el pronòstic i el tipus de tractament adequat per tal de millorar els resultats gestacionals.

Darrerament, s'ha observat que el funcionament inadequat de la glàndula tiroide a nivell dels teixits genitals podria interferir en la capacitat reproductora. Li proposem participar voluntàriament en un estudi per tal d'investigar si el funcionament tiroïdal a nivell genital pot tenir implicacions el terreny reproductiu. Mitjançant aquest estudi vostè ens ajudarà a determinar quina és l'estratègia de tractament més eficaç per a les dones que presenten esterilitat .

Si vostè accedeix a participar en l'estudi, se li realitzaran les mateixes proves que li faríem segons protocol de donació d'òvuls, a excepció d'una biòpsia d'endometri i una citologia cervical que es faran durant la punció fol·licular. La biòpsia d'endometri consisteix en l'aspiració d'una mínima quantitat de teixit endometrial (capa interna de la matriu, que es desprèn espontàniament durant la menstruació) mitjançant una cànula, d'uns 2'5 mm de diàmetre, que via vaginal s'introdueix a l'interior de la cavitat uterina. Es tracta d'un procediment d'uns segons de durada. Les complicacions derivades del procediment, tot i ser molt infreqüents, podrien ser la lesió de la paret uterina, infecció o sagnat vaginal escàs que sol remetre en unes hores. La citologia cervical consisteix en recollir unes cèl·lules del coll de la matriu amb una espàtula (igual que es fa en les revisions ginecològiques anuals). Al mateix

temps, si vostè ens dóna el seu consentiment, també guardarem cèl·lules ovàriques obtingudes durant la punció fol·licular per ser analitzades posteriorment.

La mostra de cel·lularitat endometrial, cervical i fol·licular obtingudes al Centre Girexx seran congelades en el congelador del centre a -20°C.

De forma periòdica, algun col·laborador de l'estudi, traslladarà sota les condicions necessàries, les mostres congelades del Laboratori al congelador del servei d'Endocrinologia (Laboratori de Recerca), on quedaran emmagatzemades a -80°C fins el seu anàlisi.

Una part de les analítiques de sang que les donants i les pacients estèrils es facin al Centre d'Anàlisi Girona, seran emmagatzemades en dos tubs de 5 ml: un de sèrum i un d'hematologia, que seran centrifugats en el mateix laboratori, i posteriorment congelats. De forma quinzennal seran traslladats al laboratori de l'IDIBGi per ser mantingudes a -80°C fins el seu processament.

Al final del període d'inclusió, aquestes mostres congelades seran analitzades en el Laboratori de Recerca de l'IDIBGi per tal de determinar l'expressió de receptors i enzims tiroïdals.

Les mostres analitzades romandran congelades a -80°C en el congelador del servei d'Endocrinologia per un període de 5 anys, i posteriorment, destruïdes.

Si vostè decideix no participar en l'estudi, seguirà sent atesa en el nostre servei amb la mateixa qualitat assistencial que si hagués aprovat la seva participació.

El tractament, la comunicació i la cessió de dades de caràcter personal dels participants en l'estudi s'ajusta al que disposa la Llei Orgànica 15/1999, de 13 de desembre de protecció de dades de caràcter personal. D'acord amb el que estableix la legislació esmentada, vostè pot exercir els drets d'accés, modificació, oposició i cancel·lació de dades, i per a això s'haurà de dirigir al seu metge de l'estudi.

Les dades recollides per a l'estudi estaran identificades mitjançant un codi i només el metge de l'estudi i els col·laboradors podran relacionar aquestes dades amb vostè i amb la seva història clínica. Per tant, la seva identitat no serà revelada a cap persona excepte

requeriment legal. A més, aquestes dades en cap cas contindran informació que la pugui identificar directament, com a nom i cognoms, adreça, etc.

L'accés a la seva informació personal quedarà restringit al metge de l'estudi/col.laboradors, autoritats sanitàries, al Comitè Ètic d'Investigació Clínica quan ho necessitin per comprovar dades i procediments de l'estudi, però sempre mantenint la confidencialitat d'acord amb la legislació vigent.

Vostè té dret a demanar els resultats futurs d'aquest estudi. Si us plau, no dubti en fer-nos qualsevol pregunta.

Telèfon de contacte: 972-940-235 (Secretaria Ginecologia)

La participació en aquest estudi implica que no rebrà cap compensació econòmica.

**Moltes gràcies per la seva col.laboració.**



**CONSENTIMENT INFORMAT**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

Jo, (nom i cognoms).....

He rebut informació suficient sobre l'estudi. He pogut preguntar sobre l'estudi. S'han respost les meves preguntes de manera satisfactòria. He parlat amb: (nom de l'investigador).....Comprenc que la meva participació en l'estudi és voluntària. Comprend que em puc retirar de l'estudi:

1. En el moment que ho desitgi
2. Sense haver de donar cap tipus d'explicació
3. Sense que suposi cap diferència en la meva assistència mèdica

Així, dono la meva conformitat per participar en aquest estudi.

\_\_\_\_\_

Signatura participant

Data:

\_\_\_\_\_

Signatura investigador

Data:

## **FULL D' INFORMACIÓ I CONSENTIMENT INFORMAT A LES DONES TRIBUTÀRIES DE FECUNDACIÓ IN VITRO.**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

En condicions ideals, per tal de fer un diagnòstic acurat del factor d'esterilitat, i prèviament a la realització de tècniques de reproducció assistida (FIV/ICSI), és convenient fer un conjunt de proves diagnòstiques que ens proporcionin el màxim d'informació amb les mínimes molèsties per a les pacients. L'estudi detallat ens ajuda a determinar el pronòstic i el tipus de tractament adequat per tal de millorar els resultats gestacionals.

Darrerament, s'ha observat que el funcionament inadequat de la glàndula tiroide a nivell dels teixits genitals podria interferir en la capacitat reproductora. Li proposem participar voluntàriament en un estudi per tal d'investigar si el funcionament tiroïdal a nivell genital pot tenir implicacions el terreny reproductiu. Mitjançant aquest estudi vostè ens ajudarà a determinar quina és l'estratègia de tractament més eficaç per les dones que presenten esterilitat . De la mateixa manera, mitjançant aquesta bateria de proves experimentals, podria donar-se la possibilitat que detectéssim en vostè una alteració en el funcionalisme tiroïdal que pogués estar relacionada amb la disminució de la capacitat reproductora.

Si vostè accedeix a participar en l'estudi, se li realitzaran les mateixes proves invasives que li faríem segons protocol de fecundació in vitro, a excepció d'una citologia cervical que es farà durant la punció fol·licular. La citologia cervical consisteix en recollir unes cèl·lules del coll de la matriu amb una espàtula (igual que es fa en les revisions ginecològiques anuals). Al mateix temps, si vostè ens dóna el seu consentiment, guardarem cèl·lules ovàriques obtingudes durant la punció fol·licular per ser analitzades posteriorment.

La mostra de cel·lularitat cervical obtinguda durant la punció fol·licular, serà immediatament dipositada en un pot amb sèrum fisiològic i congelada en el congelador del Laboratori de la Clínica Girona o bé del Centre de Reproducció Girexx a -20°C. De forma

periòdica, aquestes mostres congelades, seran degudament traslladades al congelador del servei d'Endocrinologia (Laboratori de Recerca) a -80°C.

Una part de les analítiques de sang que les pacients es facin al Centre d'Anàlisi Girona o bé al Laboratori de l'Hospital Trueta (en funció del laboratori assignat), seran emmagatzemades en dos tubs de 5 ml: un de sèrum i un d'hematologia, que seran centrifugats en el mateix laboratori, i posteriorment congelats. De forma quinzennal seran traslladats al laboratori de l'IDIBGi per ser mantingudes a -80°C fins el seu processament.

Al final del període d'inclusió, aquestes mostres congelades seran analitzades en el Laboratori de Recerca de l'IDIBGi per tal de determinar l'expressió d'ARNm i concentració de proteïna de receptors i enzims determinats. Les mostres analitzades romandran congelades a -80°C en el congelador del servei d'Endocrinologia per un període de 5 anys, i posteriorment, destruïdes.

Si vostè decideix no participar en l'estudi, seguirà sent atesa en el nostre servei amb la mateixa qualitat assistencial que si hagués aprovat la seva participació.

El tractament, la comunicació i la cessió de dades de caràcter personal dels participants en l'estudi s'ajusta al que disposa la Llei Orgànica 15/1999, de 13 de desembre de protecció de dades de caràcter personal. D'acord amb el que estableix la legislació esmentada, vostè pot exercir els drets d'accés, modificació, oposició i cancel·lació de dades, i per a això s'haurà de dirigir al seu metge de l'estudi.

Les dades recollides per a l'estudi estaran identificades mitjançant un codi i només el metge de l'estudi i els col.laboradors podran relacionar aquestes dades amb vostè i amb la seva història clínica. Per tant, la seva identitat no serà revelada a cap persona excepte requeriment legal. A més, aquestes dades en cap cas contindran informació que la pugui identificar directament, com a nom i cognoms, adreça, etc.

L'accés a la seva informació personal quedarà restringit al metge de l'estudi/col.laboradors, autoritats sanitàries, al Comitè Ètic d'Investigació Clínica quan ho necessitin per comprovar dades i procediments de l'estudi, però sempre mantenint la confidencialitat d'acord amb la legislació vigent.

Vostè té dret a demanar els resultats futurs d'aquest estudi. Si us plau, no dubti en fer-nos qualsevol pregunta.

Telèfon de contacte: 972-940-235 (Secretaria Ginecologia).

La participació en aquest estudi implica que no rebrà cap compensació econòmica.

**Moltes gràcies per la seva col.laboració.**

**CONSENTIMENT INFORMAT**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIÓ TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

Jo, (nom i cognoms)..... He rebut informació suficient sobre l'estudi. He pogut preguntar sobre l'estudi. S'han respost les meves preguntes de manera satisfactòria. He parlat amb: (nom de l'investigador)..... Comprenc que la meva participació en l'estudi és voluntària. Comprenc que em puc retirar de l'estudi:

1. En el moment que ho desitgi
2. Sense haver de donar cap tipus d'explicació
3. Sense que suposi cap diferència en la meva assistència mèdica

Així, dono la meva conformitat per participar en aquest estudi.

\_\_\_\_\_  
Signatura participant

Data:

\_\_\_\_\_  
Signatura investigador

Data:

## **FULL D' INFORMACIÓ I CONSENTIMENT INFORMAT PER L'EXTRACCIÓ DE MOSTRES DE DNA**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

S'ha observat que el funcionament inadequat de la glàndula tiroide a nivell dels teixits genitals podria interferir en la capacitat reproductora.

S'està realitzant un estudi en el qual es pretén estudiar els factors genètics que estan implicats en el funcionament tiroïdal a nivell genital i que poden tenir implicacions en el terreny reproductiu. Mitjançant aquest estudi vostè ens ajudarà a determinar quins són els gens implicats i l'estratègia de tractament més eficaç per a les dones que presenten esterilitat.

Per això, és necessari el seu DNA. El DNA es troba en el nucli de les cèl·lules de la sang.

Una mínima part de la sang extreta durant l'anàlisi de rutina, després del seu processament serà codificada i emmagatzemada al congelador de -80 ° C ubicat en el Laboratori de Recerca per al seu posterior anàlisi. Les mostres seran rebutjades una vegada siguin utilitzades amb la finalitat que especifica aquest document.

L'anàlisi de la mostra permetrà estudiar 1) quins gens influeixen en el desenvolupament de l'esterilitat i 2) quins gens influeixen en l'eficàcia / resistència a tractaments específics.

En qualsevol moment de l'estudi, podrà demanar si ho desitja, retirar la mostra dirigint-se a l'investigador.

Els resultats de l'estudi no produiran un benefici a curt termini, sinó que es podran aplicar només en un futur.

### Participació voluntària

Vostè és completament lliure d'elegir participar o no en l'estudi. La seva decisió no influirà en la seva atenció mèdica.

### Confidencialitat

Per protegir la seva confidencialitat, les seves dades mèdiques, la seva mostra i els resultats obtinguts seran identificats amb una etiqueta en la qual només apareixerà un nombre codificat (Llei de Protecció de dades de Caràcter Personal 15/1999): La confidencialitat i maneig de les mostres seran responsabilitat de l'investigador/a de l'estudi. Totes les dades es mantindran estrictament confidencials i exclusivament el seu metge coneixerà la seva identitat.

### Procediments de l'estudi

Un cop hagi atorgat el seu consentiment i el metge hagi verificat que compleix els criteris per participar en aquest estudi, se li extraurà una mostra de 5 ml de sang per extracció de DNA (addicional a l'analítica rutinària). La donació de sang gairebé no té riscos; el més freqüent és l'aparició de petits hematomes a la zona de punció que desapareixen transcorreguts 1-2 dies.

### Preguntes / Informació

Si desitja fer alguna pregunta o aclarir algun tema relacionat amb l'estudi, o si necessita ajuda per qualsevol problema de salut relacionat amb aquest estudi, si us plau, no dubti en posarse en contacte amb la Dra. Eva López Navarro, del Servei de Ginecologia de l'Hospital Dr. Josep Trueta al telèfon 972-940-235 (Secretaria Ginecologia )

Agraïm la seva col.laboració.

**CONSENTIMENT INFORMAT**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

Jo, (nom i cognoms)..... He rebut informació suficient sobre l'estudi. He pogut preguntar sobre l'estudi. S'han respost les meves preguntes de manera satisfactòria. He parlat amb: (nom de l'investigador).....Comprenc que la meva participació en l'estudi és voluntària Comprend que em puc retirar de l'estudi:

1. En el moment que ho desitgi
2. Sense haver de donar cap tipus d'explicació
3. Sense que suposi cap diferència en la meva assistència mèdica

Així, dono la meva conformitat per participar en aquest estudi.

\_\_\_\_\_

Signatura participant

Data:

\_\_\_\_\_

Signatura investigador

Data:

## **FULL D' INFORMACIÓ I CONSENTIMENT INFORMAT PER L'EXTRACCIÓ DE MOSTRES DE SANG**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

El Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, està recollint mostres de sang de pacients que, com vostè, seran sotmeses a una punció follicular amb la finalitat d'un tractament de reproducció assistida.

Per això, addicionalment a l'anàlisi de rutina que vostè precisa per al seu estudi, s'extraurà una mostra de 5 ml de sang que serà processada per a l'obtenció de sèrum.

Aquestes mostres de sang seran codificades i guardades per al seu posterior anàlisi al Laboratori de Recerca de l'Hospital Dr. Josep Trueta. Les mostres analitzades romandran congelades a -80°C en el congelador del servei d'Endocrinologia durant un període de 5 anys, i posteriorment, destruïdes.

Per protegir la seva confidencialitat, les seves dades mèdiques, la seva mostra i els resultats obtinguts estaran identificats amb una etiqueta en la qual només apareixerà un nombre codificat (Llei de Protecció de Dades de Caràcter Personal 15/1999). La confidencialitat i manipulació de les mostres són responsabilitat de l'investigador de la Unitat de Ginecologia de l'Hospital Dr Josep Trueta.

Si vostè decideix no atorgar el seu consentiment per a aquesta extracció de sang, la seva decisió no afectarà la resta de l'estudi ni al tractament que ha de rebre.

D'acord amb la legislació present, vostè té dret a demanar els resultats futurs d'aquests estudis. Així mateix, vostè pot retirar el seu consentiment per a la participació en aquest estudi en qualsevol moment i es procedirà a la destrucció de la mostra, no afectant a les dades recollides fins al moment.



Si vostè desitja formular alguna pregunta, no dubti en posar-se en contacte amb la Dra. Eva López Navarro al telèfon 972-940-235 (Secretaria Ginecologia) que respondrà els seus dubtes.

### **CONSENTIMENT INFORMAT**

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

Jo, (nom i cognoms)..... He rebut informació suficient sobre l'estudi. He pogut preguntar sobre l'estudi. S'han respost les meves preguntes de manera satisfactòria. He parlat amb: (nom de l'investigador).....Comprenc que la meva participació en l'estudi és voluntària Comprend que em puc retirar de l'estudi:

1. En el moment que ho desitgi
2. Sense haver de donar cap tipus d'explicació
3. Sense que suposi cap diferència en la meva assistència mèdica

Així, dono la meva conformitat per participar en aquest estudi.

\_\_\_\_\_  
Signatura participant

Data:

\_\_\_\_\_  
Signatura investigador

Data:

## QÜESTIONARI PACIENTS-CONTROLS

Títol de l'estudi: **VALORACIÓ DE LA REGULACIÓ DE LA FUNCIO TIROÏDAL, A NIVELL DELS RECEPTORS HORMONALS I DE LES DEIODINASES, EN DONES SOTMESES A CICLES DE FIV.**

Promotor: Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta

SI DECIDEIX PARTICIPAR EN L'ESTUDI, AGRAIREM QUE RESPONGUI A LES SEGÜENTS PREGUNTES:

NOM I COGNOMS:

DATA NAIXEMENT:

PES:

ALÇADA:

NÚMERO DE FILLS PREVIS:

NÚMERO D'AVORTAMENTS PREVIS ESPONTANIS:

NÚMERO D'AVORTAMENTS VOLUNTARIS:

PATEIX ALGUNA MALALTIA? QUINA/ES?

ÉS VOSTÈ DONANT D'ÒVULS?

CONEIX LA CAUSA DE LA SEVA ESTERILITAT? QUINA ÉS?

REALITZA ALGUN TRACTAMENT FARMACOLÒGIC? EN CAS AFIRMATIU, INDIQUI ELS FÀRMACS QUE PRÈN HABITUALMENT:

DATA D'AVUI:

EDAT QUE TINDRÀ EL DIA QUE SE LI REALITZI LA PUNCIÓ FOL.LICULAR:

DATA PREVISTA DE LA PUNCIÓ FOL.LICULAR:



## **10.3. QUADERN DE RECOLLIDA DE DADES**

---



Número pacient: VFT- \_\_\_\_

Cas  / Control

Ha signat el consentiment informat: Si  No

Data signatura consentiment informat: ...../...../.....

### **PRIMERA VISITA**

**Data visita:** ...../...../.....

Data Naixement: ...../...../.....

Pes: .....Kg

Talla: .....cm

IMC: ..... <30

Data prevista de punció fol·licular: ...../...../.....

Edat el dia de la punció: ..... anys (>20 i <40)

### **Diagnòstic principal:**

1. Factor ovulatori
2. Tubàric
3. Endometriosis
4. EOD
5. Donant òvuls
6. Altres (especificar):

### **Antecedents personals**

1. Sense interès
2. Endocrinològics
3. Quirúrgics ginecològics
4. Infecciosos
5. Altres (especificar):

**Tractament mèdic:**

1. Agonista dopaminèrgic (cabergolina, quinagolida, bromocriptina...)
2. Fàrmacs antitiroïdals (propiltiouracil, metamizol...)
3. Betabloquejants
4. Iodurs a altes dosis
5. Corticoïds
6. Insulina
7. Liti
8. Amiodarona
9. Perclorat
10. Tiocianat
11. Cap dels anteriors
12. Altres:

Fills previs:.....

Avortament espontanis:.....

Avortaments voluntaris:.....

**Data Analítica hormonal basal:** ...../...../.....

FSH: \_\_\_\_\_ mUI/mL

LH: \_\_\_\_\_ mUI/mL

E2: \_\_\_\_\_ pg/mL

TSH: \_\_\_\_\_  $\mu$ UI/mL

T4L: \_\_\_\_\_ ng/dL

PRL: \_\_\_\_\_ ng/mL

**SEROTECA**

Ha signat el consentiment informat per extracció de mostra per seroteca?

Si  No

Data signatura consentiment informat: ...../...../.....

Data extracció:

Codi:

**ESTUDI GENÈTIC**

Ha signat el consentiment informat per extracció de mostra de DNA per estudi genètic?

Si  No

Data signatura consentiment informat: ...../...../.....

Data extracció:

Codi:



**SEGONA VISITA**

Data visita : ...../...../.....

La pacient compleix tots els criteris per participar en l'estudi?

Si             No\*

\*Raó:

---

---

**ECOGRAFIA (DARRER CONTROL FOL.LICULAR):**    Data: \_\_/\_\_/\_\_

Nºfol.licles >14 mm en el darrer control fol.licular:

Gruix endometrial:

Nº ovòcits obtinguts: .....

Nº ovòcits MII: .....

Dosi total FSH: .....UI

Dosi total LH: .....UI

Inducció ovulació amb:

- Agonista GnRH
- hCG Recombinant

**PUNCIÓ FOL·LICULAR:**

Data: \_\_/\_\_/\_\_

SI NO\*

\*Motiu:

1. Petició pròpia
2. Baixa resposta
3. Risc SHO
4. Altres

**CÈL·LULES GRANULOSA****Concentració DIO1:**SI NO

Quantificació:

**Concentració DIO2:**SI NO

Quantificació:

**Concentració DIO3:**SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\alpha$ 1:**SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\alpha$ 2:**SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\beta$ :**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm ADR $\beta$ 2:**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm GREM1:**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm HAS2:**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm PTGS2:**

SI

NO

Quantificació:

**CÈL.LULES CERVICALS**

**Concentració DIO1:**

SI

NO

Quantificació:

**Concentració DIO2:**

SI

NO

Quantificació:

**Concentració DIO3:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\alpha$ 1:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\alpha$ 2:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\beta$ :**

SI NO

Quantificació:

**ARNm ADR $\beta$ 2:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm GREM1:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm HAS2:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm PTGS2:**

SI NO

Quantificació:

**NOMÉS APLICA GRUP DE DONANTS**

Data Biòpsia d'endometri: ...../...../.....

**CÈL.LULES ENDOMETRIALS**

**Concentració DIO1:**

SI NO

Quantificació:

**Concentració DIO2:**

SI NO

Quantificació:

**Concentració DIO3:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\alpha$ 1:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\alpha$ 2:**

SI NO

Quantificació:

**ARNm TR $\beta$ :**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm ADR $\beta$ 2:**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm GREM1:**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm HAS2:**

SI

NO

Quantificació:

**ARNm PTGS2:**

SI

NO

Quantificació:

**NOMÉS APLICA GRUP ESTÈRIL**

Transferència realitzada:

Data ...../...../.....

SI NO\*

\*Motiu:

1. Petició pròpia
2. No obtenció embrions
3. Risc SHO
4. Endometri discordant
5. Altres

Nº embrions obtinguts:.....

Nombre de transferències realitzades en un sol cicle d'estimulació:.....(fins esgotar embrions ó aconseguir gestació)

$\beta$ hCG  $\geq$  50 mUI/mL el dia 12:

SI NO

$\beta$ hCG  $>$  0.1 i  $<$ 50 mUI/mL el dia 12:

SI NO

Gestació evolutiva a 7 setmanes amenorrea:

SI NO

## **10.4. COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA**







Avinguda de França s/n  
17007 Girona  
Telèfon 972 940 200  
www.gencat.net/ics/trueta

**Marta Riera Juncà, Secretaria del Comitè Ètic d' Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, amb domicili a Av. de França s/n 17007 Girona**

**CERTIFICA:**

Que el Comitè Ètic d' Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, segons consta en l'acta de la reunió celebrada el dia 18/07/11, ha avaluat el estudi següent:

**“Tesis Doctoral. Valoració de la regulació perifèrica de la funció tiroïdal, a nivell dels receptors hormonals i de les deidodinases, sobre els mecanismes reproductius” de la Dra. Eva Lopez..**

Que el document s'ajusta a les normes ètiques essencials i per tant, ha decidit la seva aprovació

I, perquè consti, expedixo aquest certificat.

Girona, 27 d'octubre de 2011





