

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la

Reproducción Humana Asistida

Marcadores de calidad ovocitaria

asociados a endometriosis

Autor: Paula Cruz Ruiz

Tutor: Esther Taboas Lima

Alcobendas, septiembre 2022

Índice

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	5
2. ABSTRACT AND KEY WORDS	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DE LA ENDOMETRIOSIS	7
3.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	8
3.3 ABORDAJE DE LA INFERTILIDAD ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS CON TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	9
3.4 BÚSQUEDA DE MARCADORES DE CALIDAD OVOCITARIA.	9
4. OBJETIVOS.....	11
5. MÉTODOS.....	11
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
6.1 OVOCITO	13
6.1.1 <i>Morfología ovocitaria</i>	13
6.1.2 <i>Transcriptómica</i>	13
6.2 CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y LÍQUIDO FOLICULAR	14
6.2.1 <i>Marcadores de estrés oxidativo</i>	15
6.2.2 <i>Marcadores mitocondriales</i>	19
6.2.3 <i>Marcadores de inflamación</i>	22
7. CONCLUSIONES	25
8. BIBLIOGRAFÍA.....	26

Índice de tablas

Tabla 1. Selección de artículos sobre marcadores de estrés oxidativo.....	17
Tabla 2. Selección de artículos sobre marcadores mitocondriales.....	21
Tabla 3. Selección de artículos sobre marcadores de inflamación.....	23

Índice de figuras

Figura 1. Valores de especies reactivas de oxígeno medidas mediante citometría de flujo (A y B) y Western blot de la medición de defensas antioxidantes (C)	15
Figura 2. Número de mitocondrias por célula (imagen de microscopio electrónico de transmisión) (A) y porcentaje de mitocondrias anormales (B)	19
Figura 3. Niveles de ATPasa (A) e IF1 (B)	19
Figura 4. Nivel de expresión de proteínas del complejo OXPHOS	19
Figura 5. Concentración de estradiol en plasma (A) y concentración de estradiol por folículo (B). Grupo endometriosis: E.	20
Figura 6. Concentración de enzimas esteroideogénicas medido mediante Western-blot. Grupo endometriosis: E.	20

1. Resumen y palabras clave

La endometriosis es una enfermedad inflamatoria estrógeno dependiente que afecta aproximadamente al 50% de las mujeres infértiles. De patogenia multifactorial y con gran variabilidad entre pacientes.

La enfermedad crea un ambiente comprometido que parece afectar a la calidad ovocitaria y con ello a los resultados reproductivos, por lo que la búsqueda de marcadores de calidad ovocitaria en pacientes con endometriosis es un punto álgido en la investigación sobre endometriosis, ya que pueden proporcionar un medio que mejore las técnicas de diagnóstico y el abordaje de la enfermedad. En este trabajo se realiza una revisión bibliográfica sobre el estado actual de la investigación.

Palabras clave: Endometriosis, calidad ovocitaria, biomarcadores, técnicas de reproducción asistida.

2. Abstract and key words

Endometriosis is a Strogen-dependent inflammatory disease that affects approximately 50% of infertile women. Several factors are involved in the pathogeny of the disease which leads to great variability between patients.

This disease creates an impaired environment that affects oocyte quality and reproductive rates, so that the search of oocyte quality markers in endometriosis patients presents as a hot spot in research, as they may offer a mean to improve the diagnosis tools and the disease management.

The search for oocyte quality markers in endometriosis patients presents as a hot spot in research, as they may offer a mean to improve the diagnosis tools and the disease management. In this review we aim to shed some light of the research current status.

Key words: *Endometriosis, oocyte quality, biomarkers, assisted reproductive techniques.*

3. Introducción

La endometriosis es una enfermedad inflamatoria, dependiente de estrógeno, que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial y/o estroma fuera del endometrio y miometrio. La localización de este tejido ectópico se encuentra más frecuentemente en los ovarios y en la cavidad peritoneal. La enfermedad se desarrolla predominantemente en mujeres en edad reproductiva, pero la sintomatología clínica y su tratamiento pueden durar hasta después de la menopausia (1).

Los síntomas más comunes son dolor abdominal, dismenorrea, dispareunia, defecación dolorosa e infertilidad. Esta condición afecta a entre el 10 y el 15% de las mujeres en edad reproductiva. Y al 50% de las mujeres infértiles (2).

La sociedad americana de medicina reproductiva (*ASRM* por sus siglas en inglés) clasifica esta enfermedad en 4 estadios o grados, basándose en un sistema de puntos, según su nivel de afectación y en el lugar de implantación del tejido endometriósico.

- Estadio I (1-5 puntos): Manifestación mínima, pocos implantes y superficiales.
- Estadio II (6-15 puntos): Manifestación suave, más implantes y más profundos.
- Estadio III (16-40 puntos): Manifestación moderada, bastantes implantes profundos, pequeños quistes en uno o ambos ovarios y presencia de adherencias.
- Estadio IV (>40 puntos): Manifestación severa, muchos implantes profundos, quistes de gran tamaño en uno o ambos ovarios y muchas adhesiones densas (3).

3.1 Hipótesis sobre el origen de la endometriosis

Existen varias hipótesis sobre el origen de esta patología. Sin embargo, debido a la diversidad entre pacientes y a su complejidad en el desarrollo de la enfermedad hacen que se clasifique como un síndrome.

La hipótesis más aceptada, formulada por John Sampson en 1920, establece que la enfermedad se produce por una menstruación retrógrada, haciendo que el tejido

endometrial entre en contacto con los ovarios y el peritoneo (4). Otras hipótesis hablan de cómo el tejido estromal o las glándulas de tejido endometrial se originan durante la embriogénesis, derivando de los conductos de Müller, o por metaplasia, debido a cambios hormonales, procesos inflamatorios y factores bioquímicos o inmunológicos endógenos (4).

Parece ser que existe una posible implicación genética de la endometriosis. En estudios realizados en gemelas, las monocigóticas mostraban una concordancia mayor de endometriosis que las dicigóticas, con tasas de correlación de 0,52 y 0,19, respectivamente. Estos datos parecen sugerir una gran influencia genética en el desarrollo de la endometriosis y una heredabilidad estimada del 51% (4).

La epigenética también parece tener un papel en el desarrollo de la enfermedad. En modelos murinos en los que la endometriosis se provocó de manera quirúrgica, la siguiente generación a la cual no se sometió al mismo proceso también presentó anomalías en los ovocitos y el desarrollo embrionario, además de fertilidad reducida. Sugiriendo que la exposición materna a endometriosis produciría cambios epigenéticos que prevalecía también para las siguientes generaciones (5).

3.2 Métodos de diagnóstico

Hasta hace poco tiempo el diagnóstico de la enfermedad no se confirmaba hasta que no había una confirmación visual de las lesiones por laparoscopia e histológica del tejido obtenido. Gracias al avance de las técnicas de imagen, como la resonancia magnética y las ecografías, es posible dar un diagnóstico fiable de algunos tipos de endometriosis sin someterse a una operación.

Además, al tratarse esta enfermedad de un variado entramado de síntomas, los cuales varían entre individuos, se recomienda a los profesionales médicos que ante la presencia de los síntomas más frecuentes de la enfermedad se pueda ya ofrecer un diagnóstico (1). En relación con esto, los investigadores tratan de encontrar biomarcadores que puedan ofrecer un diagnóstico a estas pacientes de manera no invasiva, mediante el estudio molecular de la fisiopatología de la enfermedad.

3.3 Abordaje de la infertilidad asociada a endometriosis con técnicas de reproducción asistida.

La endometriosis y las técnicas de reproducción asistida están muy entrelazadas, algunas de las posibles causas de esto se relacionan con la distorsión y oclusión tubárica causada por las adhesiones endometriales pélvicas que afectan a la recepción endometrial y diferentes procesos biológicos que están involucrados en determinar la calidad ovocitaria, hablaremos de estos en más profundidad en la discusión.

Además, se observa una menor tasa de ovocitos recuperados en punción y dentro de estos, una menor tasa de ovocitos maduros.

Sin embargo, los mecanismos relacionados con la infertilidad de la endometriosis son todavía desconocidos, los resultados clínicos de la fecundación *in vitro* no permiten entender las posibles causas de la fisiopatología de la enfermedad y los resultados de la investigación hasta el momento no permiten dilucidar una causa clara (2).

3.4 Búsqueda de marcadores de calidad ovocitaria.

El estudio de la fisiopatología de la endometriosis tiene entre sus objetivos, la búsqueda de marcadores que permitan diagnosticar sin necesidad de recurrir a pruebas invasivas, lo que supone un punto álgido en la investigación. Además, su alta incidencia dentro de la población de infértiles hace sospechar que este síndrome causa cambios fisiológicos en el ambiente celular que podrían interactuar con la calidad ovocitaria resultante y el éxito reproductivo en este subgrupo de pacientes.

En el escenario en el que una paciente con endometriosis se somete a un tratamiento de fecundación *in vitro*, donde tras la estimulación ovárica controlada se recuperan los ovocitos mediante ecopunción guiada, estos ovocitos pueden ser evaluados en cuanto a sus características morfológicas y madurez, para comprobar si son competentes y así tener capacidad de fecundación. Con el avance de la tecnología time-lapse y un uso más estandarizado de incubadores con esta característica se pudieron detectar alteraciones morfológicas en el desarrollo del embrión (5), mas, las diferencias aparentes entre la capacidad reproductiva de pacientes con endometriosis y pacientes con infertilidad

asociada a otras patologías no parecían encontrar explicación en el estudio de estos parámetros.

Con el desarrollo del uso de las -ómicas se comenzaron a estudiar diferentes perfiles para encontrar diferencias entre pacientes con la patología y sin ella, así como también entre diferentes manifestaciones de la enfermedad (6). El uso del ovocito como célula diana suponía que, al tener que destruir la célula para crear estos perfiles, estas técnicas fueran muy invasivas, sobre todo teniendo en cuenta que en este tipo de pacientes parece existir un menor número de ovocitos recuperados. Para solventar esto, se comenzó a usar modelos animales, pese al inconveniente de que las diferencias entre especies no siempre pueden asegurar que los resultados obtenidos vayan a aplicarse en humanos. Se empezaron a realizar también estudios en diferentes tejidos relacionados con la endometriosis como es el líquido peritoneal, el plasma sanguíneo, la orina, las células de la granulosa y el líquido folicular, los cuales ofrecen información de la enfermedad de forma poco invasiva y parece existir una correlación entre los resultados obtenidos de los estudios en estos tejidos, el diagnóstico y discriminación de la endometriosis y la calidad ovocitaria de estas pacientes. Además, el uso de métodos no invasivos puede resultar útil para evitar realizar tratamientos de fecundación *in vitro* innecesarios (5).

En el apartado 6 hablaremos más en profundidad de algunos de los resultados obtenidos en cuanto a biomarcadores de calidad ovocitaria en endometriosis en diferentes células diana.

4. Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión sobre el estado actual de la información relacionada con la endometriosis y como esta repercute, si es que lo hace, en la calidad ovocitaria. Además de hacer un estudio y comparación sobre los marcadores biológicos de calidad ovocitaria en endometriosis.

5. Métodos

Para la elaboración de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos comprendida temporalmente entre el 1 de abril y el 31 de julio de 2022.

Los motores de búsqueda utilizados fueron Google Scholar y Pubmed, se acotó la búsqueda para artículos que fueran publicados entre 2017 y 2022, teniendo así la información más actualizada sobre la materia. Además, el idioma utilizado para la búsqueda fue el inglés, ya que es el idioma en el que se publican la mayoría de los artículos científicos y las revistas de mayor impacto.

Durante una primera búsqueda generalizada, se utilizaron palabras clave utilizando lenguaje médico en términos *MeSH* (del inglés Medical Subject Headings), para conocer estos términos se utilizó el propio buscador de Pubmed. Las palabras utilizadas fueron "*assisted reproductive techniques*", "*endometriosis*", "*biomarkers*" y "*oocyte quality*".

Una vez adquirida una visión global sobre el tema, se empleó el uso de operadores booleanos o de lógica usando la estructura "*endometriosis AND oocyte quality*", "*oocyte quality AND biomarkers*" para concretar más la búsqueda.

También se realizó una búsqueda manual tras la lectura y análisis de algunos artículos, utilizando referencias de estos mismos.

A continuación, se enumeran los diferentes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<p>Artículos relacionados con la patología de la endometriosis.</p> <p>Artículos relacionados con la búsqueda de marcadores de calidad ovocitaria en pacientes con endometriosis.</p> <p>Artículos en inglés.</p>	<p>Artículos no disponibles.</p> <p>Artículos en idiomas diferentes del inglés.</p> <p>Artículos de búsqueda de marcadores de calidad en pacientes sin endometriosis.</p> <p>Artículos publicados antes del 2017.</p>

6. Resultados y discusión

Vamos a organizar los resultados obtenidos de los artículos estudiados según su célula diana de estudio. También se expondrá y comparará los biomarcadores encontrados y su relevancia.

6.1 Ovocito

6.1.1 Morfología ovocitaria

La valoración morfológica del ovocito es un marcador de calidad utilizado usualmente en reproducción asistida. Sin embargo, en el caso de la endometriosis, los cambios morfológicos existentes entre ovocitos de pacientes con endometriosis y ovocitos de pacientes con infertilidad asociada a otras causas suscitan controversia en cuanto a los resultados en la literatura.

En el metaanálisis realizado por Johnny S. Younis se realiza una revisión bibliográfica desde enero de 2011 a diciembre de 2021, en la cual se recopilan y comparan estudios morfológicos y morfocinéticos, y sus resultados en relación con la calidad ovocitaria. La mayoría de los trabajos son estudios retrospectivos por lo que la calidad de los resultados se encuentra supeditada a posibles sesgos y cofactores, si bien, además, los resultados no terminan de ser concluyentes al comparar estudios.

La literatura sugiere que la morfología ovocitaria no afecta a la calidad y no parece tratarse de un marcador fiable. Además, la mayoría de los estudios disponibles tratan la endometriosis sin tener en cuenta las posibles distinciones que existen entre las diferentes formas en las que se presenta la enfermedad (endometriomas, endometriosis ovárica...) y su multifactorialidad (7).

6.1.2 Transcriptómica

Mediante el análisis del transcriptoma completo de ovocitos de pacientes con endometriosis se reveló que existía una afectación del perfil transcriptómico en

presencia de la enfermedad, donde existían una serie de genes diferencialmente expresados. Estos genes estaban involucrados principalmente en el metabolismo de esteroides, la respuesta al estrés oxidativo y la regulación del crecimiento celular. Además, al comparar ovocitos afectados de endometriosis y ovocitos no afectados frente a los ovocitos no expuestos de las donantes, no había diferencia entre los perfiles endometriósicos, lo que parece sugerir que el impacto de la endometriosis se produce de forma global sobre la fisiología de las pacientes afectadas por la enfermedad. Estos genes regulados diferencialmente podrían servir como marcadores de calidad ovocitaria, sin embargo, se trata de una técnica invasiva, que implica la lisis del ovocito (8).

6.2 Células de la granulosa y líquido folicular

Durante la punción ovárica al recuperar el ovocito y acceder al interior del folículo, se obtiene el llamado complejo cúmulo-ovocito. El ovocito está rodeado por las células de la granulosa, las cuales se dividen en células del cúmulo y células murales. Las primeras rodean al ovocito, están conectadas mediante una red de uniones de tipo gap y señales paracrinas, las segundas forman la pared del folículo que rodea el antro. Por lo que los cambios en el ovocito podrían verse reflejados en las células de la granulosa, ofreciendo información de manera no invasiva (9).

El líquido folicular es también fácilmente obtenible en punción ovárica. Es el medio en el que se desarrolla el ovocito, por lo que puede tener un papel en la calidad ovocitaria y también ofrecer la búsqueda de marcadores de forma no invasiva (9).

Recientemente se realizó el análisis transcriptómico de las células del cúmulo, el trabajo fue realizado por el grupo de Da Luz y colaboradores, en él se vio, al igual que en el perfil transcriptómico del ovocito, que existían una serie de genes expresados diferencialmente, los cuales participaban principalmente en las interacciones de receptores citoquina-citoquina, señalización de quimioquinas, señalización del TNF, señalización de receptores tipo NOD, señalización NF-kappa B y respuesta inflamatoria. Estos procesos están relacionados con la inmunidad y son esenciales para el ovocito y su fecundación, por lo que estas alteraciones podrían usarse como marcadores de

calidad ovocitaria, ya que pueden comprometer la calidad ovocitaria y disminuir las tasas de fecundación (10).

6.2.1 Marcadores de estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno son un producto asociado al metabolismo energético celular. La concentración presente en el organismo está regulada por los antioxidantes que evitan un efecto perjudicial en la célula.

Para la reanudación de la meiosis en el ovocito es importante el balance oxidante/antioxidante en el ambiente intrafolicular para que el ovocito pueda alcanzar la madurez y ser competente.

Diversos trabajos han estudiado este balance en pacientes con endometriosis, con el objetivo de conocer si la presencia de endometriomas podría asociarse a un balance desequilibrado en el potencial redox del ambiente folicular (**Tabla 1**).

En un trabajo realizado por Lin y colaboradores se observó una cantidad significativamente mayor de especies reactivas de oxígeno y una menor cantidad de defensas antioxidantes, como la antioxidasa inducible óxido nitroso sintetasa y la superóxido dismutasa-1 (SOD-1) en las células de la granulosa de pacientes con endometriosis al compararlo con el grupo control (**Figura 1**). También se estudiaron proteínas asociadas al daño en el ADN como la β galactosidasa asociada a senescencia (SA - β gal). Esta proteína se relacionó negativamente con el número de ovocitos recuperados ($R=0.611$, $p>0.01$) y la tasa de ovocitos maduros ($R= 0.646$, $p>0.01$). Además, una mayor tasa de células de la granulosa se encontraba en fase G1 en el grupo de endometriosis.

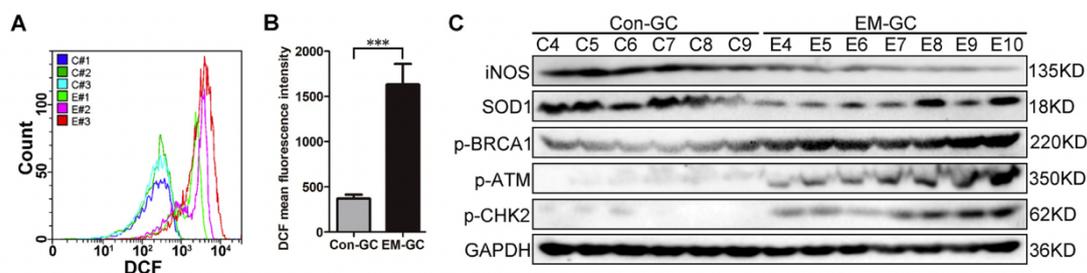


Figura 2. Valores de especies reactivas de oxígeno medidas mediante citometría de flujo ($p<0.001$) (A y B) y Western blot de la medición de defensas antioxidantes ($p<0.05$) (C). (11)

En el líquido folicular de estas pacientes se estudió la actividad protectora de la isoforma soluble del receptor de productos finales de glicosilación avanzada (sRAGE), la cual interrumpe las rutas patológicas de los productos finales de glicosilación uniéndose a ligandos oxidativos. Los resultados mostraron que se encontraba disminuida en el grupo de pacientes con endometriosis al compararlas con el grupo control. Además, se encontró una correlación positiva entre los niveles de sRAGE, el número de ovocitos recuperados ($R=0.609$, $p<0.01$) y la tasa de ovocitos maduros ($R=0.626$, $p<0.01$).

Los resultados de este estudio parecen señalar que las células de la granulosa de pacientes con endometriosis muestran un fenotipo de senescencia asociada al estrés oxidativo. Por tanto, la actividad de la SA- β gal en las células de la granulosa y los niveles de sRAGE en el líquido folicular podrían servir como biomarcadores para predecir el número de ovocitos recuperados y la tasa de ovocitos maduros (11).

Igualmente, en el estudio realizado por Da Broi y colaboradores también se observó la concentración de antioxidantes como SOD-1 en células de la granulosa y se encontraron mayores niveles en los estadios III/IV de la enfermedad que en los primeros estadios, además los niveles más altos de expresión se observaron en las pacientes que habían conseguido un embarazo. Estos resultados parecen indicar que si la concentración de antioxidantes es lo suficientemente alta como para hacer frente al ambiente rico en especies reactivas de oxígeno, el daño oxidativo sobre el ovocito podría ser prevenido, por lo que la calidad ovocitaria no se vería comprometida y la tasa de embarazo clínico mejoraría (9).

En el líquido folicular de pacientes con endometriosis también se han encontrado valores alterados de marcadores de especies reactivas de oxígeno. El equipo de Várgany y colaboradores estudió el papel de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-HdG), el cual es un marcador de daño celular por estrés oxidativo, y la capacidad antioxidante total (TAC), ambos marcadores mostraban tener una relación negativa con la tasa de embriones de buena calidad ($R=-0.302$ y $R=-0.268$, $p=0.05$, respectivamente) (12).

Otros estudios que han evaluado la concentración de estos compuestos en líquido folicular también han encontrado resultados similares. El grupo de Nasiri y colaboradores encontró niveles significativamente menores de TAC en mujeres con endometriosis al compararlas con el grupo control (0.577 ± 0.018 vs 0.692 ± 0.017 , $p=0.03$) y además evaluó los niveles de peroxidación lipídica y encontró mayores concentraciones en el grupo de pacientes con endometriosis (0.997 ± 0.03 vs 0.852 ± 0.04 , $p=0.02$) (13).

El grupo de Nashihara y colaboradores encontró niveles elevados de 8-OHdG en mujeres con endometriosis, lo que también se relacionó con menores tasas de fecundación (0.88 ± 0.38 vs 1.10 ± 0.35 , $p < 0.05$) y menor tasa de ovocitos de buena calidad (0.86 ± 0.38 vs 0.98 ± 0.35 , $p=0.15$). Este estudio también encontró una actividad de glutatión (GSH) menor, el cual es un potente antioxidante en pacientes con endometriosis (14).

Sin embargo, la investigación de Da Broi y colaboradores evaluó marcadores como la GSH, la vitamina E, SOD-1 y 8-OHdG y solo encontró diferencias significativas en este último (24.21 ± 8.56 vs 17.22 ± 5.6 , $p=0.01$) (15).

Autor y año	Tipo de estudio	Tamaño muestral (n)	Origen de la muestra	Criterio de selección	Edad	Conclusión	Limitaciones
Lin et al. (2020) (11)	Estudio prospectivo	258 mujeres	Células de la granulosa y líquido folicular	Endometriosis vs factor tubárico	31.28±3.48 vs 30.82±3.57 años	Una concentración elevada de ROS induce un fenotipo de senescencia en CG por estrés oxidativo lo cual contribuye a la infertilidad asociada a endometriosis	Muestra pequeña en secuenciación de ARN
Da Broi et al. (2018) (15)	Estudio prospectivo caso - control	83 mujeres	Plasma sanguíneo y líquido folicular	Endometriosis vs factor masculino o tubárico	≥38 años	Los niveles foliculares de marcadores de estrés oxidativo sugieren un posible daño en el ADN que puede comprometer la evolución del ovocito	Tamaño muestral pequeño debido a los criterios de exclusión
Várnagy et al. (2018) (12)	Estudio prospectivo	61 mujeres	Plasma sanguíneo y líquido folicular	Endometriosis vs factores de infertilidad	33.83 ± 5.89 vs 36.06±4.47 años	Los niveles en líquido folicular de TAC y 8-OHdG tenían un impacto negativo en el número de embriones de buena calidad	Tamaño muestral pequeño
Nasiri et al. (2017) (13)	Estudio transversal	63 mujeres	Plasma sanguíneo y líquido folicular	Laparoscopia endometriosis vs laparoscopia no endometriosis	<40 años	La concentración elevada de ROS y la baja concentración de antioxidantes en el LF parece estar relacionada con la proliferación de células ectópicas y el ambiente inflamatorio.	Tamaño de muestra pequeño
Nishihara et al. (2018) (14)	Estudio prospectivo	117 mujeres	Líquido folicular	Endometriosis vs factores de infertilidad	35.9±4.2 años	La concentración total de GSH y 8-OHdG pueden ser posibles marcadores para tasa de fecundación en técnicas de reproducción asistida	El estudio no se diseñó para evaluar la asociación individual del LF con su correspondiente ovocito y embrión

Tabla 1. Selección de artículos sobre marcadores de estrés oxidativo. Elaboración propia. Abreviaciones: ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés reactive oxygen species), CG: células de la granulosa, ARN: ácido ribonucleico, ADN: ácido desoxirribonucleico, TAC: Capacidad antioxidante total (del inglés total antioxidant capacity), 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, LF: líquido folicular, GSH: glutatión.

6.2.2 Marcadores mitocondriales

El intercambio de proteínas mitocondriales para la proliferación de las células de la granulosa es un proceso esencial en el desarrollo folicular. El ambiente folicular influenciado por el estrés oxidativo que se produce en pacientes con endometriosis puede dar lugar a una cantidad elevada de especies reactivas de oxígeno producidas por las mitocondrias durante la síntesis de ATP, lo que puede dar lugar a daño oxidativo, mutaciones y deleciones en el ADN mitocondrial. Algunos autores han evaluado la relación de estos daños con la cantidad de ADN mitocondrial y el funcionamiento de las mitocondrias y el uso de éstos como posibles biomarcadores de calidad ovocitaria (Tabla 2).

Huo y colaboradores trataron de relacionar si existían diferencias entre las anomalías mitocondriales, los niveles de expresión de ATPasa, el factor inhibidor de ATPasa 1 (IF1) y las proteínas del complejo de fosforilación oxidativa (OXPHO) de pacientes con endometriomas ováricos pequeños que no podían someterse a un tratamiento quirúrgico frente a un grupo control, y si éstas estaban relacionadas con factores relacionados con los tratamiento de fecundación *in vitro*.

Las células de la granulosa de pacientes con endometrioma mostraron menores mitocondrias por célula (**figura 2A**) y mayor número de mitocondrias anormales (**figura 2B**), menores niveles de expresión ATPasa (**figura 3A**), mayores niveles de expresión de IF1 (**figura 3B**) y una expresión desequilibrada de 3 de las 5 proteínas críticas del complejo de fosforilación oxidativa (**Figura 4**). Se obtuvieron menos ovocitos en punción (9.7 ± 5.4 vs 12.6 ± 4.4 , $p < 0.05$), y menor cantidad de ovocitos maduros (8.7 ± 5.0 vs 11.5 ± 3.9 , $p < 0.05$). También se observó una menor tasa de fecundación (7.3 ± 4.1 vs 9.8 ± 3.5 , $p > 0.05$), un menor número de embriones de buena calidad (3.1 ± 2.3 vs 5.2 ± 2.8 , $p < 0.05$) y menores tasas de implantación (42.8% vs 55.5, $p < 0.05$).

Además, los niveles de ADN mitocondrial circulante se encontraban elevados en el líquido folicular de pacientes con endometriosis, estando asociados inversamente con la expresión de ADN mitocondrial en células de la granulosa.

En cultivos celulares *in vitro*, el ADN mitocondrial circulante se libera al medio como respuesta a disfunciones mitocondriales, estos niveles parecen estar relacionados

negativamente con la cantidad de ADN mitocondrial en las células de la granulosa, por lo que el ADN mitocondrial circulante podría usarse como un marcador de baja función mitocondrial y fallo de implantación al utilizar técnicas de reproducción asistida (16).

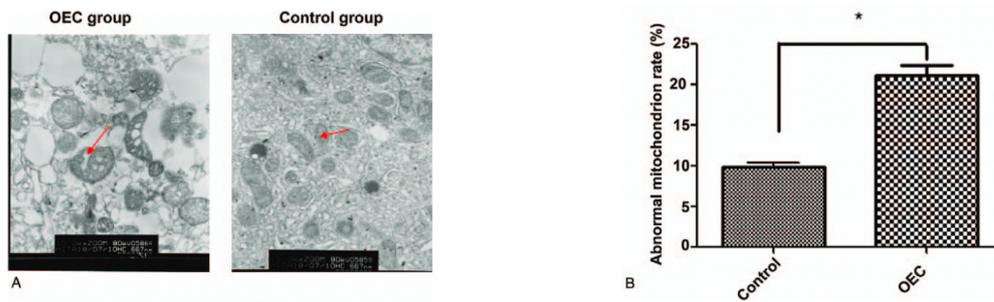


Figura 3. Número de mitocondrias por célula (imagen de microscopio electrónico de transmisión) (A) y porcentaje de mitocondrias anormales (B). (16)

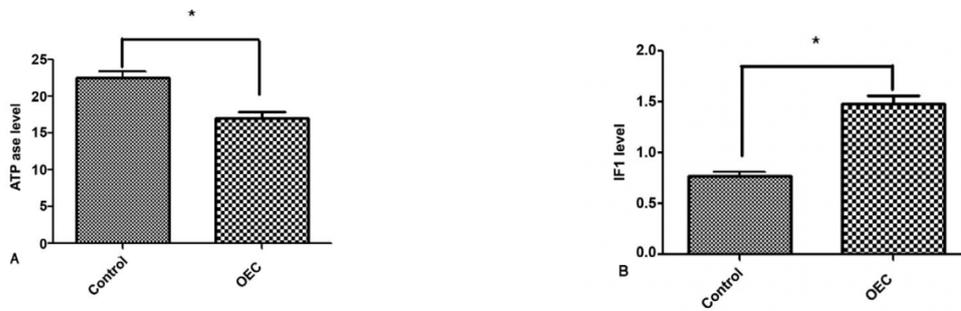


Figura 4. Niveles de ATPasa (A) e IF1 (B), $p < 0.01$. (16)

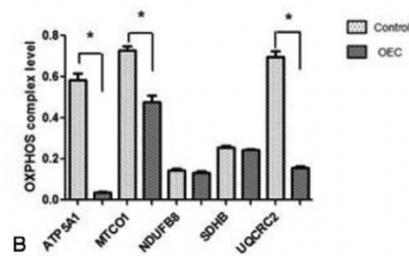


Figura 5. Nivel de expresión de proteínas del complejo OXPHOS, $p < 0,01$. (16)

Por otra parte, el grupo de Sreerangaja Urs y colaboradores estudiaron si existía relación entre las mitocondrias de la células de la granulosa y la esteroidogénesis, junto con los resultados en tratamientos de fecundación *in vitro*. Se comparó a pacientes con infertilidad asociada a endometriosis y a pacientes con infertilidad asociada a otros factores.

La biosíntesis de hormonas esteroideas ocurre en las mitocondrias, por lo que un mantenimiento de esta y un buen funcionamiento mitocondrial parecen participar en el mantenimiento de la calidad ovocitaria y la capacidad fértil.

La proteína aguda reguladora de esteroidogénesis (StAR, por sus siglas en inglés) y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD, por sus siglas en inglés) son enzimas clave en la esteroidogénesis, el nivel de éstas se comparó con los niveles de estradiol y se vio una correlación entre sus niveles.

Los resultados mostraron un nivel de estradiol significativamente menor en el líquido folicular y en el plasma sanguíneo (**figura 5**), así como también de las enzimas de esteroidogénesis (**figura 6**) al compararlo con infertilidad asociada a otros factores. Además, también se observó una menor tasa de fecundación, tasa de embarazo y tasa de éxito del tratamiento de fecundación *in vitro* (17).

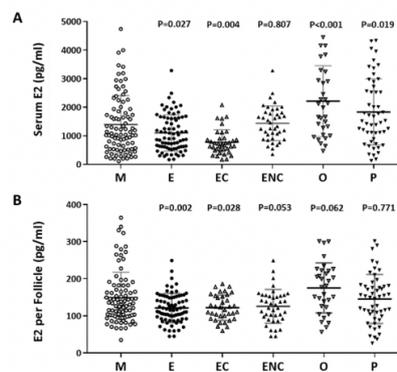


Figura 6. Concentración de estradiol en plasma (A) y concentración de estradiol por folículo (B). Grupo endometriosis: E. (17)

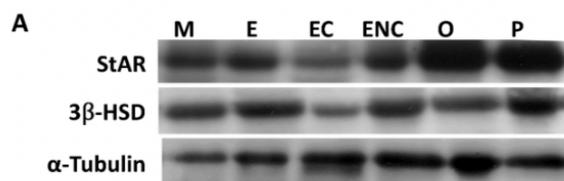


Figura 7. Concentración de enzimas esteroidogénicas medido mediante Western-blot. Grupo endometriosis: E. (17)

Autor y año	Tipo de estudio	Tamaño muestral (n)	Origen de la muestra	Criterio de selección	Edad	Conclusión	Limitaciones
Huo et al. (2020) (16)	Estudio prospectivo	60 mujeres	Células de la granulosa y líquido folicular	Endometriosis vs factor tubárico	31.1 ± 3.9 años	Las disfunciones mitocondriales en las CG podrían sugerir una disminución en la calidad ovocitaria y embrionaria de pacientes con quistes ováricos endometriósicos.	Tamaño muestral pequeño
Sreerangajara Urs et al. (2020) (17)	Estudio prospectivo	81 mujeres	Suero sanguíneo y líquido folicular	Endometriosis	36 ± 3.9 años	Los resultados mostraron una cantidad de estradiol disminuida, la cual se relacionaba con menor masa mitocondrial, menor potencial de membrana mitocondrial y disminución de StAR y 3β-HSD.	Tamaño muestral pequeño

Tabla 2. Selección de artículos sobre marcadores mitocondriales. Elaboración propia. Abreviaturas: CG: células de la granulosa, StAR: proteína aguda reguladora de esteroidogénesis, 3β-HSD: 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

6.2.3 Marcadores de inflamación

La producción de endometrio ectópico en pacientes con endometriosis parece estar asociado a una sobreproducción de citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos que provocan un ambiente proinflamatorio, los cuales pueden estar relacionados con la determinación de la calidad ovocitaria (2). En los siguientes artículos se evalúa la presencia de algunos de estos marcadores inflamatorios y su posible relación con la calidad ovocitaria (**Tabla 3**).

En pacientes con endometrioma ovárico unilateral, Yland y colaboradores observaron una cantidad más elevada de interleuquina-18 (IL-18) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 en el líquido folicular del ovario con endometrioma que en los no

expuestos, y se encontraron niveles intermedios en el ovario no afectado. Además, se recuperaron menos ovocitos de los ovarios afectados por endometrioma ($MD \pm SD = 4.6 \pm 2.3$) que al compararlos con el ovario no afectado (6.0 ± 3.8) y con el no expuesto (7.9 ± 5.6). Estos resultados parecen atribuir un efecto sistémico de la endometriosis, ya que en el ovario no afectado si bien se encuentran más ovocitos que en el afectado, siguen existiendo diferencias con el no expuesto (18).

Sin embargo, Liang y colaboradores trataron de ver si existían diferencias entre los marcadores de inflamación en el líquido folicular de mujeres con endometrioma ovárico que se habían sometido a una quistectomía y las que no. No se encontraron diferencias significativas entre el nivel de expresión de quimioquinas, factores de crecimiento y en la mayoría de las citoquinas proinflamatorias entre ambos grupos, a excepción de la interleuquina-18 (IL-18), la cual era significativamente menor en el grupo que no se había realizado la quistectomía. Ningún parámetro relacionado con los ciclos de fecundación *in vitro* se veía relacionado con IL-18. Además, las tasas de implantación y embarazo eran similares entre ambos grupos. Por lo que parece que los mecanismos inflamatorios parecen no tener influencia sobre la calidad ovocitaria o embrionaria (19). Los resultados obtenidos en estos estudios no parecen proponer la IL-18 como un marcador de calidad ovocitaria, aunque sí parece estar relacionado con algún proceso patológico de la enfermedad.

Cela y colaboradores trataron de investigar marcadores inflamatorios que ayudaran a predecir ovocitos y embriones de buena calidad en pacientes que se sometían a un tratamiento de fecundación *in vitro*. Además del perfil de citoquinas inflamatorias se incluyeron moléculas que participaban en la transición epitelial a mesenquimal, un proceso inflamatorio en el que las células epiteliales pierden su organización polarizada y adquieren la movilidad de las células mesenquimales. Este proceso está involucrado en la foliculogénesis y los mecanismos reparadores del sistema reproductivo, que en presencia de un ambiente alterado provoca su desregulación.

Las pacientes con endometriosis mostraban una cantidad significativamente mayor de moléculas proinflamatorias como IL-6, IL-8 e IL-12 y una concentración menor del marcador antiinflamatorio IL-10 comparados con el grupo control.

Se realizó una correlación de los niveles de IL-6 en plasma y IL-10 en líquido folicular y mostraron una capacidad discriminatoria excelente entre pacientes con endometriosis y pacientes control, con valores AUC de 0.9912 y 1.000, respectivamente. Además, los niveles de IL-8 y E-cadherina en plasma, así como la IL-6 en líquido folicular predijeron con significativa certeza los valores de hCG positivos, con valores de AUC de 0.7094, 0.6496 y 0.6776, respectivamente.

Estos resultados parecen sugerir que IL-8, IL-10 y E-cadherina pueden actuar como biomarcadores ayudando a predecir mejores resultados en cuanto a ovocitos maduros, embriones de buena calidad y buenos resultados en tratamiento de fecundación *in vitro* (20).

Autor y año	Tipo de estudio	Tamaño muestral (n)	Origen de la muestra	Criterio de selección	Edad	Conclusión	Limitaciones
Yland et al. (2020) (18)	Estudio prospectivo de cohorte	34 mujeres	Líquido folicular	Endometriosis vs factor masculino	37.1 ± 3.1 vs 32.0 ± 5.7 años	Los resultados sugieren que la endometriosis ovárica está relacionada con un ambiente proinflamatorio el cual parece perjudicar el desarrollo del ovocito.	Tamaño muestral pequeño
Liang et al. (2019) (19)	Estudio retrospectivo	42 mujeres	Líquido folicular	Cirugía endometrioma vs no cirugía endometrioma	≥40 años	Los endometriomas ováricos no parecen estar relacionados con un perfil de citoquinas alterado y no parecen afectar a la calidad ovocitaria y embrionaria.	Tamaño muestral pequeño. No se pudieron comparar resultados pre y post operatorios.
Cela et al. (2021) (20)	Estudio prospectivo	64 mujeres	Líquido folicular	Endometriosis vs factor masculino o tubárico	36.3 ± 3.9 vs 34.9 ± 3.5	Los resultados sugieren que marcadores relacionados con la transición celular e inflamatorios pueden ser predictivos para tasa de ovocitos maduros, embriones de buena calidad y resultados de tratamientos de FIV.	Tamaño muestral pequeño

Tabla 3. Selección de artículos sobre marcadores de inflamación. Elaboración propia. Abreviaturas: Fecundación *in vitro*.

7. Conclusiones

A pesar de que la búsqueda de marcadores de calidad ovocitaria en endometriosis se encuentra en el punto álgido de la investigación, los resultados de los marcadores, si bien prometedores, son todavía poco concluyentes. Es necesaria más investigación y una puesta en común de los resultados a buscar durante la misma, ya que la disparidad que se encuentra actualmente no ayuda a crear conclusiones relevantes, un resultado exitoso puede presentarse en la literatura como tasa de ovocitos maduros, de embriones de buena calidad, de implantación o de embarazo, complicando la relación de estos artículos a pesar de estudiar quizás un mismo marcador.

Al tratar la endometriosis como una enfermedad homogénea sin tener en cuenta las diferentes representaciones y síntomas en los que se expresa, los marcadores pueden no ser certeros de forma global para las pacientes.

Además, la búsqueda de estos biomarcadores puede beneficiar no solo categorizando los diferentes perfiles patológicos de las pacientes, sino que también podrían recibir terapias previas a someterse a un tratamiento de fecundación *in vitro*, que ayude a mejorar las probabilidades de conseguir un resultado exitoso (5). Por ejemplo, el uso de antioxidantes como la L-carnitina y la N-acetilcisteína parecen mostrar buenos resultados en modelos bovinos expuestos al líquido folicular de pacientes con endometriosis, ya que la tasa de ovocitos meióticamente normales y maduros en estadio de metafase II fue mayor que en el grupo control sin suplementación (2).

La búsqueda de tratamientos que tengan como objetivo el manejo de la enfermedad y no solo su sintomatología parece presentarse como otro hito en el estudio de la endometriosis.

8. Bibliografía

1. Becker CM, Bokor A, Heikinheimo O, Horne A, Jansen F, Kiesel L, et al. ESHRE guideline: endometriosis. *Hum Reprod Open*. 4 de marzo de 2022;2022(2):hoac009.
2. Corachán A, Pellicer N, Pellicer A, Ferrero H. Novel therapeutic targets to improve IVF outcomes in endometriosis patients: a review and future prospects. *Hum Reprod Update*. 20 de agosto de 2021;27(5):923-72.
3. Lee SY, Koo YJ, Lee DH. Classification of endometriosis. *Yeungnam Univ J Med*. 31 de enero de 2021;38(1):10-8.
4. Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, et al. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci*. 10 de noviembre de 2019;20(22):5615.
5. Simopoulou M, Rapani A, Grigoriadis S, Pantou A, Tsioulou P, Maziotis E, et al. Getting to Know Endometriosis-Related Infertility Better: A Review on How Endometriosis Affects Oocyte Quality and Embryo Development. *Biomedicines*. 9 de marzo de 2021;9(3):273.
6. Kiesel L, Sourouni M. Diagnosis of endometriosis in the 21st century. *Climacteric*. 4 de mayo de 2019;22(3):296-302.
7. Younis JS. Is Oocyte Quality Impaired in Cases With Ovarian Endometriosis? A Second Look Into the Clinical Setting. *Front Endocrinol*. 30 de junio de 2022;13:921032.
8. Ferrero H, Corachán A, Aguilar A, Quiñonero A, Carbajo-García MC, Alamá P, et al. Single-cell RNA sequencing of oocytes from ovarian endometriosis patients reveals a differential transcriptomic profile associated with lower quality. *Hum Reprod*. 8 de julio de 2019;34(7):1302-12.
9. Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*. mayo de 2018;35(5):735-51.
10. Da Luz CM, Da Broi MG, Koopman L de O, Praça JR, da Silva-Jr WA, Ferriani RA, et al. Transcriptomic analysis of cumulus cells shows altered pathways in patients with minimal and mild endometriosis. *Sci Rep*. diciembre de 2022;12(1):5775.
11. Lin X, Dai Y, Tong X, Xu W, Huang Q, Jin X, et al. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-

associated infertility. *Redox Biol.* febrero de 2020;30:101431.

12. Várnagy Á, Kőszegi T, Györgyi E, Szegedi S, Sulyok E, Prémusz V, et al. Levels of total antioxidant capacity and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of serum and follicular fluid in women undergoing in vitro fertilization: focusing on endometriosis. *Hum Fertil.* 2 de julio de 2020;23(3):200-8.

13. Nasiri N, Moini A, Salman-Yazdi R. Oxidative Stress Statues in Serum and Follicular Fluid of Women with Endometriosis. *CELL J.* 2017;18(4):6.

14. Nishihara T, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome. *Reprod Med Biol.* octubre de 2018;17(4):481-6.

15. Da Broi MG, Jordão-Jr AA, Ferriani RA, Navarro PA. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. *Mol Reprod Dev.* febrero de 2018;85(2):128-36.

16. Huo P, Zhang N, Zhang P, Wu X. The levels of follicular fluid cell-free mitochondrial DNA could serve as a biomarker for pregnancy success in patients with small ovarian endometriosis cysts. *Medicine (Baltimore).* 25 de noviembre de 2020;99(48):e23348.

17. Sreerangaraja Urs DB, Wu WH, Komrskova K, Postlerova P, Lin YF, Tzeng CR, et al. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. *Int J Mol Sci.* 19 de mayo de 2020;21(10):3592.

18. Yland J, Carvalho LFP, Beste M, Bailey A, Thomas C, Abrão MS, et al. Endometrioma, the follicular fluid inflammatory network and its association with oocyte and embryo characteristics. *Reprod Biomed Online.* marzo de 2020;40(3):399-408.

19. Liang Y, Yang X, Lan Y, Lei L, Li Y, Wang S. Effect of Endometrioma cystectomy on cytokines of follicular fluid and IVF outcomes. *J Ovarian Res.* 21 de octubre de 2019;12:98.

20. Cela V, Malacarne E, Obino MER, Marzi I, Papini F, Vergine F, et al. Exploring Epithelial–Mesenchymal Transition Signals in Endometriosis Diagnosis and In Vitro Fertilization Outcomes. *Biomedicines.* 12 de noviembre de 2021;9(11):1681.