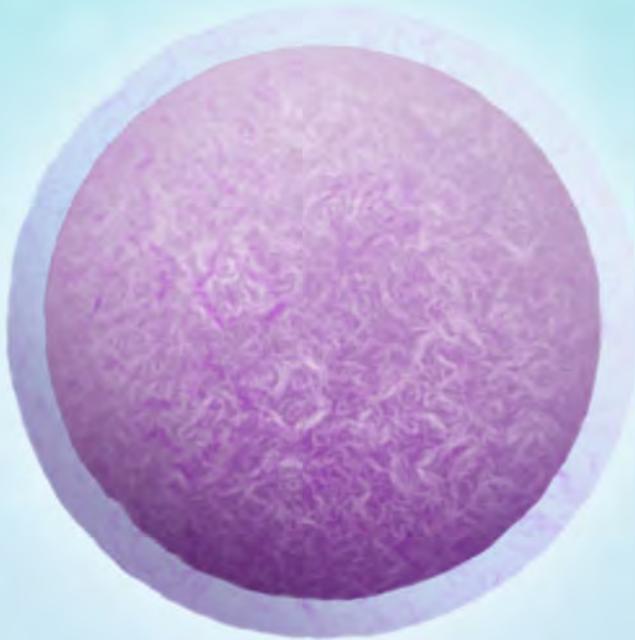


TESIS DOCTORAL

**ALTERACIONES EN LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DE PEPTIDASAS
EN LÍQUIDO FOLICULAR
HUMANO**



CAROLINA ROMÉU PÉRIZ

LEIOA, 2014

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología

Medikuntza eta Ondotologia Fakultatea
Fisiologia Saila

TESIS DOCTORAL

**ALTERACIONES EN LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DE PEPTIDASAS
EN LÍQUIDO FOLICULAR
HUMANO**

Memoria presentada por
Carolina Roméu Périz

Dirigida por el
Dr. Luis Casis Sáenz
Dr. Jon Irazusta Astiazarán

LEIOA, 2014



Ilustraciones, portada y maquetación
Marco Antonio Izquierdo Carretero

© Carolina Roméu Périz, 2014 y

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

- *Euskal Herriko Unibertsitateko Argitalpen Zerbitzua (UPV/EHU)*

- EHU Press (UPV/EHU)

ISBN: 978-84-9082-049-0

Número de Asiento Registral: 10 / 2014 / 389

Prohibida la reproducción total o parcial
de esta obra sin el consentimiento del titular de la propiedad intelectual.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera mostrar mi más profunda gratitud al director de la presente Tesis Doctoral, el Dr. Luis Casis. Sin cuya energía y perseverancia este sueño nunca se hubiera cumplido. De igual modo, a mi codirector, el Dr. Jon Irazusta, por su ayuda en el proceso de elaboración.

Mil gracias también a Julio Morales, por ser tan genuino y positivo, por no olvidarte nunca de mí, y porque sin ti esta Tesis no existiría.

A la Dra. Itxaro Pérez, mi compañera de laboratorio en Leioa y mi amiga. Eres una persona tremendamente generosa, uno de los mejores “regalos” que me llevo de la UPV. Agradecer también a todos los compañeros del departamento, porque en mis estancias me habéis tratado genial. Jamás me olvidaré del pintxo-poteo, de las playas de Sopelana, de las fiestas de Recalde, de lo cafés... Me llevo conmigo una experiencia maravillosa.

A Antonio Urries, director de la Unidad de Reproducción Asistida Quirón Zaragoza, por enseñarme el mundo de la embriología clínica y por su contribución a este trabajo. A Montserrat Lierta (mi otro yo, mi melliza), una de las mejores compañeras que puedo tener, gracias por todo Montse. A todos mis compañeros de la Unidad de Reproducción Asistida y en especial a: Ana Chueca, Carlos de Bonrostro, María del Castillo, Rosa Ferrer, Isabel Giménez, Ángel Laborda, Cristina Lafoz, Cristina Lechuga y Olga Murcia. Esta Tesis también es vuestra.

Al Dr. Raúl Beltrán, ¿qué hubiera hecho yo sin ti?, gracias por tu infinita paciencia, tu asertividad, tu humildad y tu saber hacer. Vamos, que no tengo hojas suficientes para poder expresar todo mi agradecimiento, así que lo resumiré: ¡Eres fetén!

A dos personas claves en mi amor hacia la Biología, mi profesor Benito y la Dra. Fanny Vidal.

A mis amigas: Almudena, Ana, Cristina, Elian, Eva, Gema, María, Núria, Pilar, Priscila, Rosa y Teresa. Por ser tan diferentes y únicas cada una de vosotras.

A Mercedes y Fernando por su enorme cariño.

A mi tía Marcela, por aprender a nadar y a conducir a los 60 años, por no tenerle miedo a nada, por tu coraje, por ser más recta que un suizo y por ser todo un ejemplo para mí. A mi hermano Javi. A mi padre Javier (ese hombre pegado a un libro) por tu apoyo y por transmitirte tu inmensa devoción hacia el conocimiento. A mi madre Matilde, por tu inmensurable e incondicional amor.

Y por supuesto a Saúl.

Mi mejor compañero de viaje.

Por tu paciencia y tu energía, por tu comprensión, por tu ayuda, por tus sonrisas y tus abrazos, por confiar y creer siempre en mí. Gracias por quererme tanto Saúl.

**Y como no sabía que era imposible...
lo hizo.**

- Albert Einstein -

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE: Enzima convertidora de angiotensina.

AMH: Hormona antimülleriana

Ang: Angiotensina

APA: Aminopeptidasa A

APB: Aminopeptidasa B

APN: Aminopeptidasa neutra

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

Asp-AP: Aspartil aminopeptidasa

BSA: Seroalbúmina bovina

COC: Complejo oocito-cúmulo

Cys-AP: Cistil-aminopeptidasa

DGP: Diagnóstico genético preimplantacional

DPPIV: Dipeptidil-peptidasa IV

DTT: DL-ditiotreitrol

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético

END: Endometriosis a nivel ovárico

EOP: Péptidos opioides endógenos

ES: Error estándar

ESCA: Esterilidad sin causa aparente

FERT: Grupo Fértil

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH(r): Hormona estimulante del folículo (recombinante)

FT: Factor tubárico

G.C.: Grupo Control

G.I.: Grupo Infértil

GnRH: Hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas

GnSAF: Péptido inhibidor del pico de gonadotropinas

hCG: Gonadotropina coriónica humana.

ICSI: Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides

LF: Líquido folicular

LH(r): Hormona luteinizante (recombinante)

LHRH: Hormona liberadora de hormona luteinizante

LI: Inhibidor de la luteinización

NEP: Endopeptidasa neutra

OMI: Inhibidor de la maduración del ovocito

PEP: Prolil endopeptidasa

PGI: Piroglutamil-peptidasa I

PSA: Aminopeptidasa sensible a la puromicina

RA: Renina angiotensina

RAS: Sistema renina angiotensina

SEF: Sociedad Española de Fertilidad

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

TRA: Técnicas de reproducción asistida

TRH: Hormona liberadora de tirotrópina

UP: Unidades de actividad peptidásica

VG: Vesícula germinal

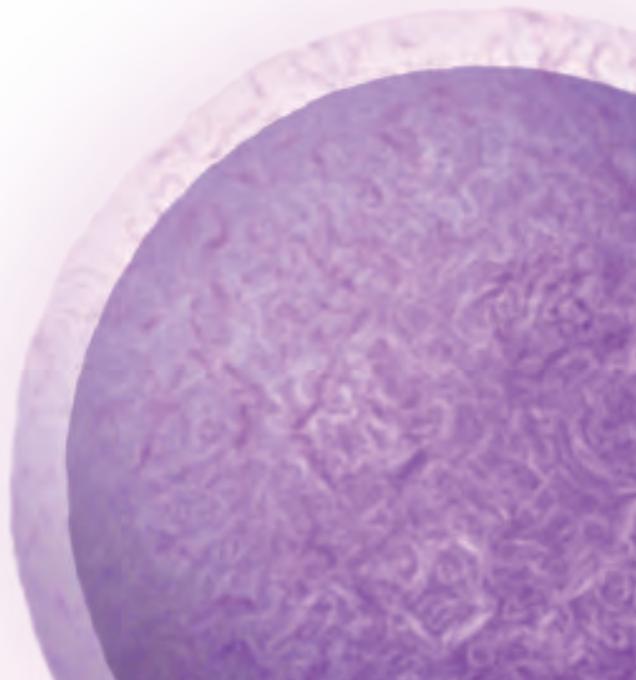
ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO	3
1.1. Anatomía fisiológica	3
1.2. Gametogénesis femenina	4
1.2.1. La ovogénesis y sus fases	4
1.2.2. La foliculogénesis y sus fases	7
1.3. Ovulación	10
1.4. Atresia	11
2. ESTERILIDAD E INFERTILIDAD	12
2.1. Problemas de fertilidad	12
2.1.1. Síndrome de ovario poliquístico (SOP)	13
2.1.2. Endometriosis	14
2.1.3. Factor tubárico (FT)	15
2.1.4. Esterilidad sin causa aparente (ESCA)	15
2.2. Estudio de la pareja estéril	16
2.3. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	16
2.3.1. Factores pronósticos del éxito del tratamiento	17
2.3.2. Complicaciones más comunes	19
3. LAS PEPTIDASAS	20
3.1. Clasificación y nomenclatura de las peptidasas	20
3.2. Funciones de las peptidasas	22
3.2.1. Las peptidasas como enzimas interconvertidoras de biopéptidos	22
3.2.2. Catabolismo proteico y acciones intracrinas de las peptidasas	23
3.2.3. Otras acciones de las peptidasas	24
3.3. Las peptidasas en la fisiología y en la patología	24
3.4. Papel de las peptidasas en la fertilidad	25
3.4.1. Regulación del ciclo sexual: modelo de liberación gonadotrópica	25
3.4.2. Sistemas de comunicación celular y fertilidad	27
3.5. PEPTIDASAS ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO	31
3.5.1. Aminopeptidasa neutra (APN)	33
3.5.2. Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)	34
3.5.3. Aminopeptidasa B (APB)	35
3.5.4. Dipeptidil peptidasa IV (DPPiV)	36
3.5.5. Aminopeptidasa A (APA)	37
3.5.6. Cistil aminopeptidasa (Cys-AP)	38
3.5.7. Prolil endopeptidasa (PEP)	39
3.5.8. Aspartil aminopeptidasa (Asp-AP)	40
3.5.9. Piroglutamil-peptidasa I (PGI)	40

II. OBJETIVOS	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. MATERIAL	49
2. METODOLOGÍA	51
2.1. Tipo de estudio y criterios de inclusión	51
2.1.1. Grupos de estudio	51
2.2. Metodología del tratamiento de FIV	53
2.3. Material biológico utilizado	55
2.3.1. Muestras de plasma sanguíneo	55
2.3.2. Muestras de líquido folicular	56
2.4. Análisis de la actividad peptidásica en líquido folicular	57
2.4.1. Determinación de la actividad	57
2.4.2. Ensayo enzimático	58
2.5. Tratamiento estadístico	60
IV. RESULTADOS	61
1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS CLÍNICOS	63
1.1. Variables epidemiológicas y de estimulación	64
1.2. Variables de laboratorio	66
1.3. Tasa de embarazo por transferencia	68
2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS PEPTIDASAS	70
2.1. Grupo Control	71
2.1.1. Actividad enzimática en el líquido folicular	71
2.1.2. Actividad enzimática en LF según la edad: comparaciones	72
2.1.3. Actividad enzimática en LF según la edad: correlaciones	77
2.1.4. Actividad enzimática de PSA en LF según la edad y el resultado de FIV	78
2.2. Grupo Fértil: correlación clínica	79
2.2.1. Actividad enzimática en LF y nivel de estradiol en sangre: correlaciones	80
2.2.2. Actividad enzimática en LF y número de ovocitos por punción: correlaciones	81
2.2.3. Actividad enzimática en LF y tasa de madurez ovocitaria: correlaciones	82
2.2.4. Actividad enzimática en LF y tasa de fecundación: correlaciones	83
2.2.5. Actividad enzimática en LF y resultado de FIV: comparaciones	84
2.3. Grupo Infértil	86
2.3.1. Actividad enzimática en el líquido folicular	86
2.3.2. Actividad enzimática en LF según la patología: comparaciones	87
2.3.3. Actividad enzimática de PSA en LF según tipo de infertilidad y resultado de FIV...	91

V. DISCUSIÓN	93
1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LOS TRATAMIENTOS DE FIV	95
1.1. Variables epidemiológicas y de estimulación	95
1.2. Variables de laboratorio	98
1.3. Tasa de embarazo por transferencia	100
2. REGULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y FERTILIDAD	102
2.1. Actividad enzimática de las peptidasas en el LF humano	103
2.2. Actividad de las peptidasas en función de la edad de la mujer	108
2.3. Correlación clínica de la actividad de las peptidasas en el Grupo Fértil	111
2.4. Actividad de las peptidasas en función del tipo de infertilidad	113
VI. CONCLUSIONES	119
VII. BIBLIOGRAFÍA	123
VIII. ANEXOS	167
1. ANEXO: Formulario de consentimiento informado para pacientes	169
2. ANEXO: Actividad enzimática de las nueve peptidasas analizadas	171
3. ANEXO	173
Comunicaciones indexadas	173
Participaciones en congresos	174

I. INTRODUCCIÓN



1. SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO

1.1. Anatomía fisiológica

El aparato genital femenino se encuentra constituido por una serie de estructuras perfectamente interrelacionadas para facilitar la función reproductiva (*Figura 1.A*).

Los genitales externos incluyen el clítoris, los labios mayores y los labios menores y las glándulas secretoras accesorias. Entre el clítoris y la vagina, se abre al exterior la uretra.

La vagina en humanos tiene una longitud aproximada de 10 cm, y su función es actuar como receptáculo del pene durante la cópula. En el nacimiento está cerrada parcialmente mediante una membrana de tejido anular denominada himen. El extremo de la vagina que conecta con el útero es el *cérvix* o cuello uterino. El canal cervical está tapizado por glándulas mucosas cuyas secreciones constituyen una barrera entre la vagina y el útero.

El útero o matriz es un órgano muscular complejo en el que se implantan los ovocitos fecundados para desarrollarse durante el embarazo. Estructuralmente se puede dividir en fondo, cuerpo y canal cervical. Está formado por tres capas: una cápsula externa de tejido conjuntivo cubierta de serosa, una capa delgada de tejido muscular liso denominada miometrio y la capa más interna, compuesta por epitelio y tejido conjuntivo, muy vascularizado y con gran cantidad de glándulas llamada endometrio. El espesor y la naturaleza del endometrio varían durante el ciclo menstrual. Las células de la capa epitelial proliferan y se desprenden alternativamente dando lugar al sangrado menstrual. El útero está suspendido mediante una serie de ligamentos y siguiendo el trayecto de éstos se encuentran las venas, arterias, vasos linfáticos y nervios ováricos.

Las trompas de Falopio o uterinas conectan el útero con los ovarios, dotadas de gran movilidad, su principal función es el transporte de gametos y embriones. Las trompas están formadas por un segmento estrecho cercano a la pared del útero, denominado istmo, otro segmento adyacente, de mayor diámetro que el primero, llamado ampolla y las fimbrias, proyecciones digitiformes del extremo de la trompa que se mantienen cerca del ovario mediante tejido conjuntivo. Las fimbrias aseguran que el óvulo liberado por el ovario se introduzca en la trompa en lugar de flotar hacia la cavidad abdominal.

Los ovarios o gónadas femeninas son dos formaciones ovoideas, del tamaño de una almendra, situadas a cada lado de la pelvis, inmediatamente por debajo de las trompas (*Figura 1.B*). Si realizáramos un córtex observaríamos una región central denominada médula, donde se encuentran las terminaciones nerviosas y los vasos sanguíneos y linfáticos, y una región periférica llamada estroma que es donde se alojan los folículos ováricos. Estas gónadas son las encargadas de producir estrógeno y progesterona, hormonas que tienen a su cargo el desarrollo de las características sexuales secundarias y la regulación del embarazo. Asimismo, los ovarios se encargan de producir y conservar los ovocitos (Silverthorn y Johnson, 2008; Moore *et al.*, 2011).

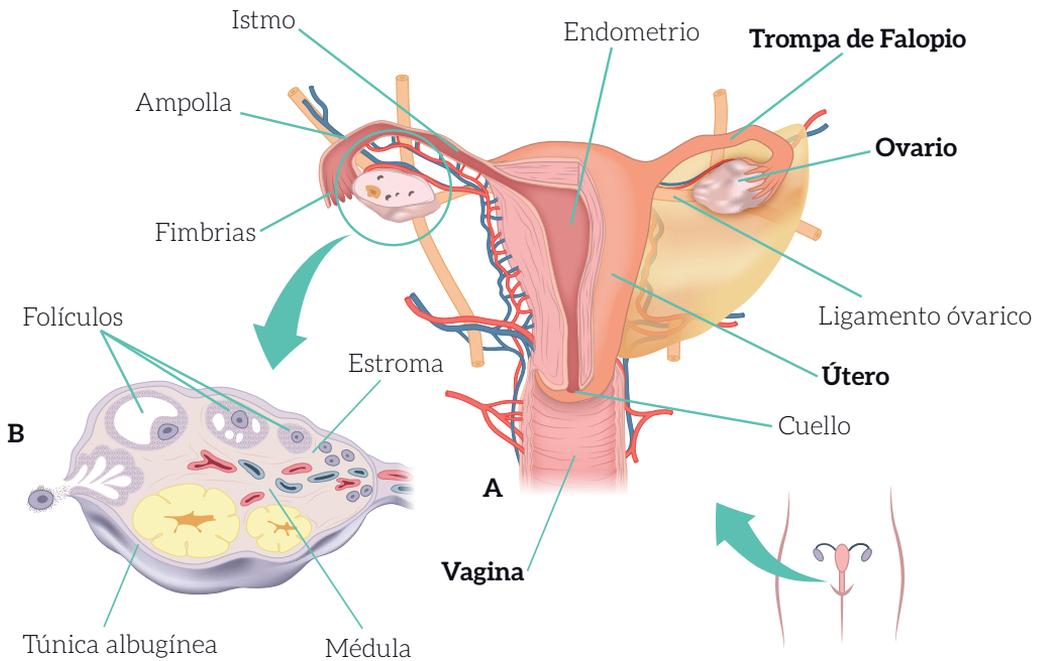


Figura 1. Anatomía del aparato reproductor femenino. (A) Estructura macroscópica, en ella se observan sus diferentes partes: vagina, útero, trompas de Falopio y ovarios. **(B) Ovario**, gónada en la que se forman y desarrollan los folículos (adaptado de Silverthorn y Johnson, 2008).

1.2. Gametogénesis femenina

1.2.1. La oogénesis y sus fases

El término oogénesis u ovogénesis se refiere a toda la secuencia de fenómenos por los cuales las células germinativas primitivas denominadas oogonias se transforman en oocitos maduros. Este proceso de maduración, que se divide en dos fases, tiene lugar en el ovario. La oogénesis se inicia antes del nacimiento y termina una vez se alcanza la madurez sexual, durante la pubertad (*Fig. 2*).

Fase Mitótica

La división celular mitótica la realizan las oogonias durante el periodo embrionario, a partir de la quinta semana de gestación. El inicio de la fase mitótica no es sincrónico en todas las oogonias ya que depende del sector del ovario donde estas se encuentren. Las divisiones persisten hasta el sexto mes de embarazo, momento en el que los ovarios llegan a contener alrededor de 6 millones de ovogonias (Speroff y Fritz, 2006). En humanos, las oogonias realizan al menos seis divisiones mitóticas antes de comenzar la fase meiótica.

Fase Meiótica

Aquellas oogonias que se diferencian y comienzan a realizar un ciclo meiótico son denominadas oocitos primarios (Guyton y Hall, 2011). Durante el periodo fetal, más concretamente hacia la onceava semana de gestación, los oocitos primarios comienzan de manera asincrónica la primera división meiótica. Sin embargo, sobre la vigésima semana de gestación se produce el denominado primer bloqueo meiótico, la profase I no finaliza y el oocito primario permanece suspendido en la etapa de dictioteno, en un estadio especial, el de vesícula germinal (VG) (Arteaga y García, 2013).

En una recién nacida no existen oogonias, todos sus oocitos primarios se encuentran bloqueados en VG, estadio en el que permanecerán hasta que la mujer llegue a una edad madura para la reproducción. A partir de la adolescencia y en cada ciclo reproductivo, unas cuantas vesículas germinales comienzan el proceso de crecimiento oocitario necesario para que el ovocito alcance la competencia meiótica y pueda así reanudar la meiosis I. Durante el crecimiento oocitario se observa un aumento del tamaño del oocito primario debido a la activa síntesis de macromoléculas que se lleva a cabo.

En condiciones fisiológicas, una vez finalizado el crecimiento y alcanzada la competencia meiótica, el aumento de la hormona luteinizante (LH) en sangre hará que el oocito madure tanto a nivel citoplasmático como nuclear.

Durante la maduración citoplasmática el ovocito sufre una serie de cambios que lo *preparan* para la fecundación. Se produce una activa síntesis de proteínas responsables de la descondensación de la cabeza del espermatozoide, se redistribuyen componentes del citoesqueleto y orgánulos tales como las mitocondrias o los gránulos corticales, los microvillis que recubren la membrana plasmática se hacen más largos y estructurados, etc. (Cherr *et al.* 1990; Picton *et al.* 1998; Baruffi *et al.* 2004; Rodríguez y Farin 2004).

La maduración nuclear supone para el oocito primario la reanudación y fin de la meiosis I, la citocinesis es completa y asimétrica, formándose lo que se denomina el primer corpúsculo polar. En este momento el ovocito pasa a denominarse oocito secundario el cual recibe casi la totalidad del citoplasma (Polanski *et al.*, 1998; Baruffi *et al.*, 2004).

Tras un pico de LH en sangre se produce la ovulación, momento en el que el núcleo del oocito secundario inicia la segunda división meiótica pero sólo progresa hasta metafase II, en la que se detiene, enfrentándose a un nuevo parón evolutivo, el llamado segundo bloqueo meiótico. Si se produce la fecundación, es decir, si un espermatozoide penetra al oocito este concluye la segunda división meiótica y de nuevo una célula, el oocito fecundado, conserva la mayor parte del citoplasma. La otra célula, el segundo corpúsculo polar, pequeño y afuncional, degenerará pronto. En cuanto el segundo cuerpo polar es expulsado al espacio perivitelino la maduración del oocito se completa (Sadler, 2009).

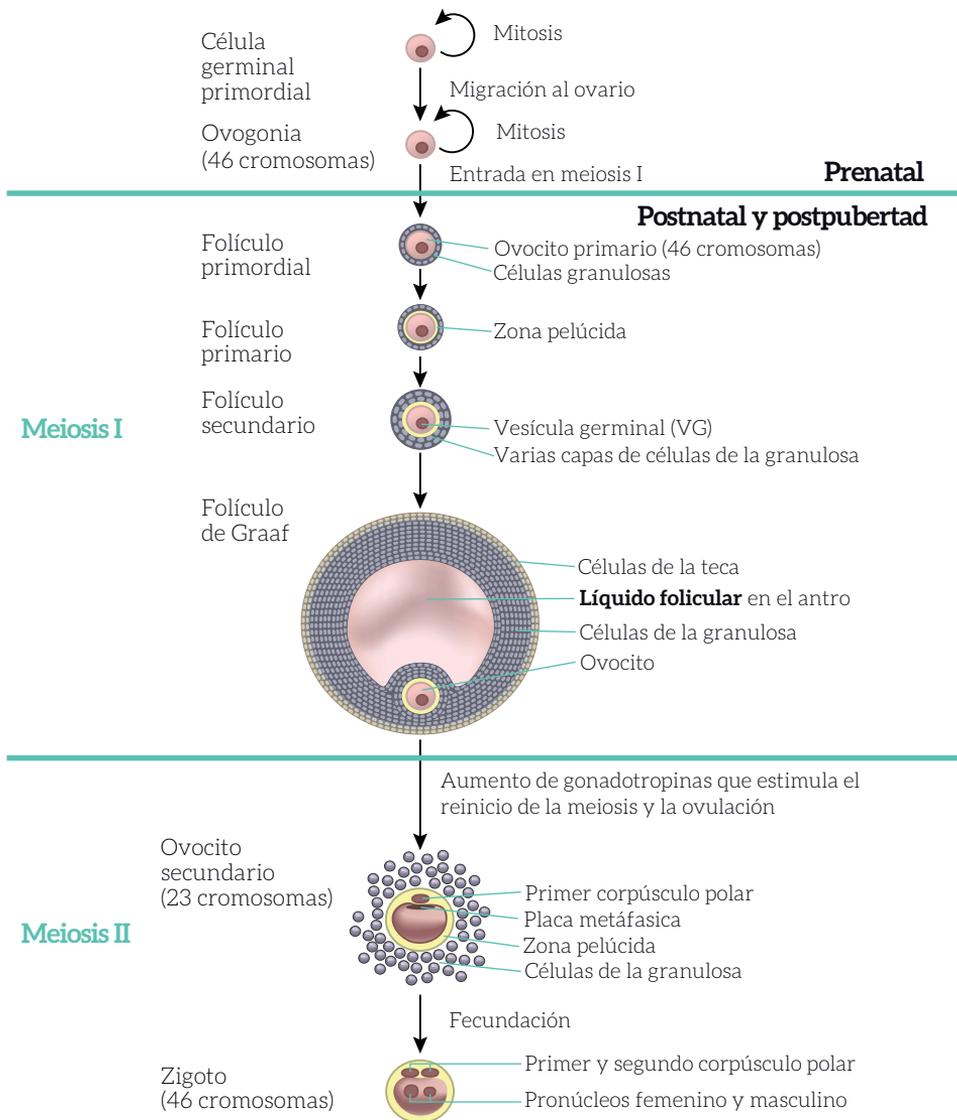


Figura 2. Maduración ovocitaria y folicular en el ovario. Desde la etapa prenatal en la que se produce un periodo de proliferación celular mediante mitosis sucesivas, pasando por una larga etapa meiótica postnatal hasta obtener un ovocito haploide tras la ovulación. La meiosis finalizará cuando se produzca la fecundación del ovocito por el espermatozoide (adaptado de Moore, 2011).

1.2.2. La foliculogénesis y sus fases

Tal y como se ha podido observar en la *Figura 1*, la maduración de los ovocitos ocurre dentro del cortex ovárico, en los folículos, que constituyen la unidad fundamental de desarrollo del ovario de los mamíferos.

La maduración del folículo es un proceso continuo, que termina con la ovulación o con la degeneración (atresia) del propio folículo. Este proceso se caracteriza por el crecimiento del ovocito, la proliferación de las células de la granulosa y de la teca, la formación de la cavidad antral y, finalmente, por una diferenciación esteroideogénica. A continuación se resumen las diferentes etapas del desarrollo folicular (*Fig. 2*). Todas estas fases aparecen simultáneamente en los ovarios durante la vida de la mujer.

Maduración prenatal

La foliculogénesis comienza hacia la vigésima semana de gestación, cuando el oocito primario se encuentra bloqueado en estadio de dictioteno. La VG aparece envuelta por una única capa de células perivasculares mesenquimatosas, en contacto estrecho con el ovocito, denominadas células de la granulosa, a esta primera unidad folicular se le denomina **folículo primordial** (Ammini *et al.*, 1994). Se cree que las células de la granulosa que rodean al oocito primario secretan una sustancia que se llama inhibidor de la maduración del oocito (OMI) que conserva detenido el proceso meiótico del mismo (Channing *et al.*, 1980; Tsafriri *et al.*, 1982; Tsafriri y Pomerantz, 1986; Rabinovici y Jaffe, 1990; Scott y Hodgen, 1990).

En una niña recién nacida todos sus oocitos primarios se encuentran detenidos en estadio de VG formando folículos primordiales. Todos aquellos que no lleguen a dicha unidad folicular degenerarán.

Maduración postnatal

Se desconoce la naturaleza del factor desencadenante que transforma a un pequeño grupo de folículos primordiales en **folículos primarios** con crecimiento activo (Moor *et al.*, 1990), de hecho, no parece que sea una única vía de señalización la responsable de este proceso (Bonilla-Musoles y Pellicer, 2008; Oktem y Urman, 2010). Durante el quinto y sexto mes de gestación, algunos de esos folículos primordiales inician su maduración, transformándose las células granulosa alargadas precursoras en una capa única de células cuboidales maduras. Estas células presentan una gran actividad mitótica, y como consecuencia el folículo incrementará sus capas celulares granulosa formando un epitelio estratificado y aumentando así su tamaño. Entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes, se originan espacios hacia donde se secretan mucopolisacáridos que formaran la zona pelúcida, cubierta extracelular glicoproteica que rodea los ovocitos.

La adquisición de la zona pelúcida es una característica del folículo primario. La capa de células de la granulosa más cercana a la zona pelúcida se denomina *corona radiata*. Estas células, emiten prolongaciones citoplasmáticas a través de la zona pelúcida, que mantienen estrecho contacto con la membrana del ovocito, mediante uniones tipo *gap*, y hacen llegar al ovocito sustancias como el OMI que mantiene el bloqueo de la primera meiosis en profase.

En la etapa de folículo primario las células de la granulosa no ejercen efecto inhibitorio sobre el crecimiento del ovocito, aunque sí sobre la meiosis (Thibault *et al.*, 1987). En los primeros días del ciclo menstrual femenino, y gracias a la acción que la hormona estimulante del folículo (FSH) ejerce sobre las células foliculares, alrededor de 20-25 folículos primarios inician su desarrollo aumentando el número de capas de células de granulosa que los envuelven, pasándose a denominar **folículos secundarios**, en crecimiento o reclutados. La mayoría de estos folículos reclutados sobrevivirá hasta el estadio de **folículo preantral**, en el que se aprecian unas cavidades llenas de líquido, denominadas cuerpos de Call Exner, que serán los precursores del líquido folicular (LF) (Bonilla-Musoles y Pellicer, 2008). Las pequeñas cavidades se van acumulando y acaban por confluir, formándose entonces el antro folicular que caracteriza al folículo antral. En este estadio resulta esencial la clara diferenciación entre las dos capas de tejido conjuntivo envolvente: la teca externa (fibrosa e inervada) y la teca interna (con una gran cantidad de vasos sanguíneos que servirán de apoyo nutricional para el desarrollo ovocitario y folicular).

De todos los folículos antrales, uno empieza a despuntar, a ser un poco más grande, comienza entonces el fenómeno de dominancia que será intraovárico y endocrino. Mientras que por un lado el folículo dominante secreta una sustancia que impide el desarrollo del resto de folículos, convirtiéndolos en folículos subordinados. Por otro lado, todos los folículos fabrican estrógenos e inhibina, hormonas que actúan sobre el sistema hipotálamo-hipofisario inhibiendo la síntesis de FSH. El folículo dominante será el único que soporte la disminución de FSH ya que posee más receptores para esta hormona gonadotrópica que el resto de folículos (Moore y Persaud, 1999). Como consecuencia, los folículos subordinados acabarán convirtiéndose en atrésicos y degenerarán, mientras que el folículo dominante evolucionará alcanzando el máximo nivel de desarrollo, el de **folículo pre-ovulatorio maduro** o **folículo de Graaf** (Fig. 3).

Al acercarse el momento de la ovulación aparecerán cambios importantes en el interior del folículo que afectarán fundamentalmente al *cumulus oophorus*. Bajo el influjo de la hormona LH, el citoplasma de estas células se hincha y el ácido hialurónico del cemento intercelular se despolimeriza. Este proceso continuará hasta que el óvulo, rodeado de varias células de la granulosa, se libere y nade libremente al interior del LF o solo se encuentre tenuemente unido a la pared folicular (Russell y Robker, 2007; Oktem y Urman, 2010) (Fig. 4).

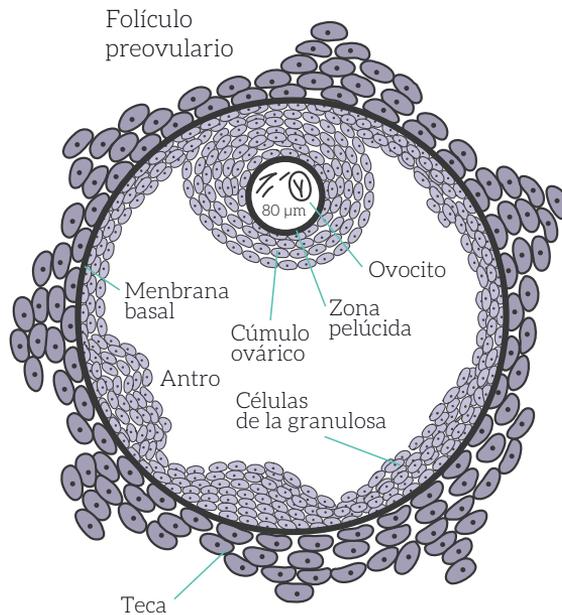


Figura 3. Estructura del folículo de Graaf. La membrana basal separa las células de la teca de las células foliculares. En el interior del folículo se encuentran las células de la granulosa y el ovocito, rodeado por las células del *cumulus oophorus* y conectado al resto del folículo mediante el ápex. El antro forma una amplia cavidad folicular donde se aloja el líquido folicular, fluido que será objeto de estudio de la presente tesis doctoral (Speroff y Fritz, 2006).

Señalar que el líquido folicular contiene hormonas sexuales, proteínas plasmáticas, mucopolisacáridos, electrolitos y toda una serie de factores reguladores que interaccionarán controlando la maduración del folículo y por tanto del propio ovocito (Cabello, 2013). Algunas de estas sustancias proceden de los vasos localizados por fuera de la lámina basal, otras son productos de secreción de las propias células foliculares (especialmente de las células de la granulosa), pero todas ellas tendrán efecto tanto en el ovocito como en las células somáticas circundantes. Resumiendo, el LF representa un complejo compartimento funcional donde se integran distintas señales endocrinas, inmunológicas y mitogénicas que hacen que cada folículo ovárico sea único. Las células foliculares producen una gran variedad de sustancias y factores que pueden ser valorados en el líquido antral, estableciendo distintos parámetros de calidad folicular (Eppig, 2001; González *et al.*, 2011). Además, aunque la función ovárica está controlada principalmente por el eje hipotálamo-hipofisario, no hay duda de que cada folículo presenta un microambiente específico que determinará si dicho folículo entra en atresia o bien es ovulado, transformándose posteriormente en cuerpo lúteo (Angelucci *et al.*, 2006; Harata *et al.*, 2006; Schweigert *et al.*, 2006).

Desde principios de los años 70 y dentro del campo de la reproducción asistida, se están llevando a cabo un gran número de estudios en los que se pretende establecer la relación existente entre: composición del LF - calidad folicular - calidad ovocitaria - calidad embrionaria - resultados reproductivos (Shalgi *et al.*, 1973; Edwards, 1974; Lindner *et al.*, 1988; Molina, 1990; Gonzales *et al.*, 1992;

Moschos *et al.*, 2002; Smitz *et al.*, 2007; Estes *et al.*, 2009; Salerno *et al.*, 2011). No en vano, el trabajo de investigación que hemos desarrollado trata de aportar claridad a este punto. En concreto, estudia y analiza la actividad de las enzimas encargadas de la degradación de diversos péptidos bioactivos en el líquido folicular humano. Más adelante, en el apartado correspondiente a peptidasas, presentaremos sus características así como su posible papel reproductivo.

1.3. Ovulación

Durante la vida reproductiva se producen oleadas de crecimiento de folículos, la gran mayoría de estos se detienen e involucionan en estadios precoces de la maduración. En cada ciclo menstrual sólo uno de ellos, excepcionalmente dos o más, llegan a la fase de folículo pre-ovulatorio maduro. La ovulación ocurre aproximadamente a la mitad del ciclo (14 días en un ciclo “promedio” de 28 días) y por influencia de FSH y LH, concretamente, de 12 a 24 h tras el nivel circulante máximo de LH en sangre (Balasch *et al.*, 1995).

Cuando la hormona LH llega a las células foliculares se incrementa el metabolismo de esteroides, como consecuencia, las células comienzan a sintetizar diferentes tipos de enzimas proteolíticas (plasmina y colagenasa) que degradan la matriz extracelular que une las células foliculares. Degradación que tiene lugar principalmente en el ápex. Cuando aumenta la LH, aumenta el AMP cíclico (AMPc) en el folículo, frenando el efecto del OMI y del inhibidor de la luteinización (LI), dos inhibidores presentes en el líquido folicular, que sirven para prevenir la maduración prematura del oocito y la luteinización (Fig. 4.A). Por otro lado, la LH, FSH, progesterona y prostaglandinas estimulan la actividad de enzimas proteolíticas que digieren el colágeno de la pared folicular hasta constituir el estigma ovárico (punto de ruptura del folículo) (Botella Llusia, 1995). Las prostaglandinas, además, facilitan la contracción de fibras musculares lisas, detectadas en el ovario, contribuyendo a la expulsión del líquido folicular junto con el complejo oocito-cúmulo (COC) (Miyazaki *et al.*, 1991) (Fig. 4.B).

La ovulación es una solución de continuidad, que se acompaña de rotura de tejido y vasos, y por tanto de hemorragia que se suele acumular en la oquedad dejada por el óvulo. Inmediatamente después de la rotura folicular, la teca y las paredes se colapsan alrededor de la cavidad folicular, ahora repleta de sangre. Las paredes foliculares se cargan de un pigmento amarillo y sufren una serie de cambios por influencia de la LH; transformándose en una estructura glandular denominada cuerpo amarillo o cuerpo lúteo que principalmente secreta progesterona, pero que también produce cierta cantidad de estrógeno. Estas hormonas, en particular la progesterona, causan secreción de glándulas endometriales y suelen preparar el endometrio para la posible implantación del blastocisto (Moore y Persaud, 1999).

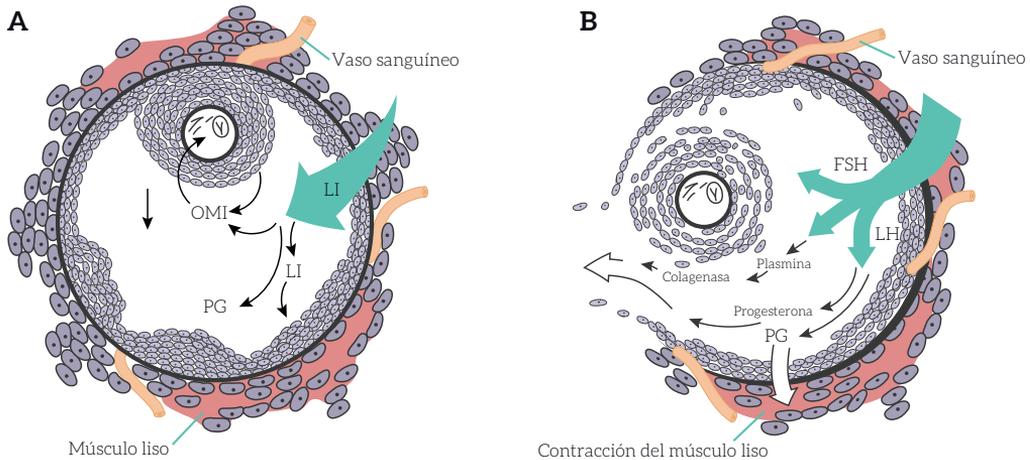


Figura 4. Mecanismos que intervienen en la ovulación. (A) Inhibición de la ovulación, mediada por OMI y LI. **(B) Expulsión del complejo oocito-cúmulo (COC) del folículo**, gracias a la acción de prostaglandinas y enzimas proteolíticos en respuesta al pico de LH (adaptado de Speroff y Fritz, 2006).

1.4. Atresia

A lo largo de la vida de una mujer existe una gran pérdida de óvulos. Durante el periodo embrionario – fetal se detecta el máximo número de oocitos, alcanzando los 10 millones pero sólo un 20% de estos llega a la etapa de dictioteno (en estadio de VG), por lo que en la profase I es donde ocurre el mayor fenómeno de atresia. En el momento del nacimiento, únicamente un 10% de las vesículas germinales habrá sido capaz de alcanzar el nivel de desarrollo de folículo primordial (Motta y Makabe, 1986).

Durante la infancia el proceso de pérdida continúa, hay cohortes de oocitos que comienzan el crecimiento y maduración “antes de hora”, es decir, antes de llegar a la pubertad, por lo que acabarán degenerando. Hacia la adolescencia no quedan más de 40 000 unidades, de ellas sólo 400 se convierten en oocitos secundarios y se expulsan en la ovulación (Scott y Hodgen, 1990). La señalización que dirige estos procesos debe estar finamente regulada, ya que una tasa de muerte celular demasiado alta, seguida de atresia folicular podría tener consecuencias muy negativas en la fertilidad de la mujer (Krysko *et al.*, 2008). Con el paso del tiempo, el número de folículos primordiales se irá reduciendo hasta que al llegar la menopausia, solo queden unos cientos (Richardson *et al.*, 1987).

2. ESTERILIDAD E INFERTILIDAD

2.1. Problemas de fertilidad

Definimos esterilidad como la incapacidad de una pareja para la concepción natural en el plazo de un año. Por otro lado, entendemos por infertilidad la incapacidad de conseguir un recién nacido vivo, siendo éste el caso de las parejas que consiguen embarazo pero que posteriormente abortan. En países desarrollados los problemas de esterilidad afectan aproximadamente a un 10-15% de las parejas en edad reproductiva (Remohí *et al.*, 2012). Estas cifras aumentan año tras año, y se constata el hecho de que cada vez son más las mujeres que optan por retrasar la maternidad, incrementando la frecuencia de problemas reproductivos (Minaretzis *et al.*, 1998; Balasch, 2008; Bonilla-Musoles, 2010). En España aproximadamente un 27,1% de las causas de esterilidad son de origen femenino, un 29,1% de procedencia masculina, un 25,2% de causa mixta, un 15,6% de origen desconocido, un 0,6% de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles y un 2,4% de mujeres sin pareja masculina (Registro_SEF, 2013). Sin olvidarnos de que, en cierta medida, la prevalencia de cada porcentaje varía con la edad.

Las causas de esterilidad femenina derivan de diferentes problemas:

- Anatómicos: Anomalías que afectan a genitales externos y/o internos.
- Hormonales: A nivel hipotálamo-hipofisario u ovárico, afectando a la secreción de sus respectivas hormonas.
- Genéticos: Alteraciones cromosómicas o génicas.
- Inmunológicos
- Psíquicos
- Idiopáticos
- Otros: Obesidad y adelgazamiento extremo, alteraciones de la tiroides y glándulas suprarrenales, enfermedades sistémicas graves, abuso de drogas y ciertos medicamentos, etc.

Más concretamente, en esta Memoria se han tenido en cuenta cuatro tipos de infertilidades que serán detalladas a continuación.

2.1.1. Síndrome de ovario poliquístico (SOP)

El síndrome de ovarios poliquísticos es la endocrinopatía con mayor prevalencia en mujeres jóvenes, afecta al 4-8% de la población femenina en edad fértil y su patogenia es de origen multifactorial (Azziz *et al.*, 2004; Castillón *et al.*, 2009; Fabregues y Manau, 2012). Lo padecen aquellas mujeres con foliculogénesis alterada en las que el crecimiento de nuevos folículos es estimulado continuamente, pero no hasta el punto en que se alcance la maduración completa, con lo que el desarrollo folicular se puede prolongar varios meses en forma de “quistes foliculares”. Aproximadamente, un 20% de las mujeres afectas de SOP presentan problemas de fertilidad (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2007; Corbett y Morin-Papunen, 2013).

El estudio de este síndrome comenzó en 1932 cuando Stein y Leventhal publicaron la primera descripción de este fenómeno complejo, caracterizado por mujeres que presentaban amenorrea, hirsutismo, obesidad y apariencia poliquística de ovarios. Posteriormente fueron variando las definiciones lo que en ocasiones ha generado confusión. Según el grupo de consenso ESHRE-ASRM¹, para el diagnóstico del SOP se precisa el cumplimiento de dos de los tres criterios siguientes: ovarios poliquísticos por ecografía, hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico y oligoovulación o anovulación (manifestadas por oligomenorrea o amenorrea) (Fauser *et al.*, 2004).

Los signos y síntomas de este síndrome están relacionados con una amplia gama de alteraciones hormonales y metabólicas como son el desequilibrio hormonal (consecuencia del exceso de la liberación de LH), la resistencia a la insulina, el hiperandrogenismo, la obesidad, el denominado Síndrome metabólico o enfermedades cardiovasculares (Legro *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2005; Requena *et al.*, 2009; Fabregues y Manau, 2012; Fontes *et al.*, 2012).

Son muchos los sistemas y moléculas ováricos relacionados con la elevación de la LH en el SOP (angiotensina II, serotonina, neurotensina, somatostatina, dopamina, noradrenalina, factor liberador de corticotropina, melatonina, oxitocina, sustancia P, factores de crecimiento y otros), pero la inhibina B, el péptido inhibidor del pico de gonadotropinas (GnSAF) y la hormona antimülleriana (AMH) han sido los más estudiados. Es más, en los últimos años algunos estudios experimentales han sugerido que un ambiente hiperandrogénico intrauterino podría ser la base sobre la que se desarrollarían muchos de los signos y síntomas del síndrome en la vida adulta. La hipótesis se basa en el hecho de que la exposición a un exceso de andrógenos produciría un fenómeno epigenético que provocaría un exceso de proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante β y, entre ellas, destacaría la AMH que podría ser responsable del exceso de folículos primarios y preantrales pequeños (Homburg, 2009). Algunos autores afirman que la obesidad no sólo es consecuencia

¹ ESHRE-ASRM: European Society of Human Reproduction and Embryology – American Society for Reproductive Medicine

de la alteración metabólica del SOP, sino que colabora de forma importante en su origen y mantenimiento (Garruti *et al.*, 2009). Seguramente, la leptina ha sido la adipocina más estudiada y ha estado elevada en el SOP tanto por una mayor producción en el tejido graso como por una alteración en algunas enzimas de la granulosa relacionadas con su metabolismo (Azziz *et al.*, 2011; Fontes *et al.*, 2012).

Varios autores han relacionado la hipersecreción de LH del SOP con una baja tasa de fecundación así como de gestación evolutiva (Stanger y Yovich, 1985), aunque actualmente existe una gran discrepancia con respecto a dichos hallazgos (Hohmann *et al.*, 2005).

2.1.2. Endometriosis

La endometriosis es una enfermedad que se caracteriza por la aparición y crecimiento de tejido endometrial en localizaciones ectópicas (fuera del útero), Se cree que afecta al 5-10% de las mujeres en edad fértil y que la padecen entre el 25 y el 40% de las mujeres con problemas reproductivos (Cramer y Missmer, 2002; Sánchez *et al.*, 2009; Harb *et al.*, 2013).

Lo más llamativo de esta patología es la falta de correlación entre la intensidad de los síntomas y la gravedad de las lesiones. La clínica se caracteriza fundamentalmente por la presencia de dolor pélvico y/ o ovulatorio e infertilidad (Sánchez *et al.*, 2009; de Graaff *et al.*, 2013).

Parece unánime la opinión sobre una disminución de la reserva ovárica en las pacientes con endometriosis ya que el número de ovocitos recuperados, tras un ciclo de reproducción asistida, suele ser más bajo cuando se compara con otras afecciones (Minguez *et al.*, 1997). La foliculogénesis se ve dificultada y la obtención de ovocitos con alteraciones supondría la generación de embriones con menor capacidad de implantación. Existen grupos que han demostrado una disminución de la tasa de implantación y de embarazo en las pacientes con endometriosis, debida a la calidad de los embriones transferidos. Pero los datos publicados son contradictorios, puesto que hay trabajos que apuntan resultados similares en cuanto a tasas de embarazo comparando endometriosis con controles (factor masculino, factor tubárico o infertilidad de origen desconocido) (Martínez-Salazar *et al.*, 2007; Harb *et al.*, 2013). Por otro lado, los endometriomas por sí solos no afectan a la receptividad endometrial; pacientes afectas de endometriosis que reciben ovocitos donados presentan tasas de implantación y embarazo similares a las de receptoras sin endometriomas (Alborzi *et al.*, 2006; Sallam *et al.*, 2006).

Destacaremos que en el estudio que hemos llevado a cabo sólo se han incluido pacientes con endometriosis a nivel ovárico (END).

2.1.3. Factor tubárico (FT)

Actualmente el factor tubárico representa una de las principales causas de esterilidad femenina ya que afecta al 35-40% de las pacientes que consultan por problemas de fertilidad (Strandell y Lindhard, 2002; Bruna *et al.*, 2008; Ferro *et al.*, 2009). Una mujer presenta patología tubárica cuando, tras someterse a las pruebas de integridad anatómica, manifiesta nula o escasa permeabilidad en una o ambas trompas de Falopio.

Las trompas pueden experimentar diversos cambios patológicos, la mayoría secundarios a infecciones bacterianas, cuyo origen puede estar en el mismo tracto genital o en estructuras vecinas como el apéndice, divertículos intestinales o por infecciones sistémicas como la tuberculosis.

La enfermedad inflamatoria pélvica aguda y crónica (de etiología infecciosa) se presenta como la primera y más importante causa de alteración del factor tubárico. En segundo término, las lesiones producidas por endometriosis. En tercer lugar, las alteraciones generadas por cicatrices (adherencias) de cirugías previas en la pelvis femenina, incluidas el tratamiento de la gestación ectópica y la cirugía tubárica. Causas más infrecuentes son las compresiones mecánicas extrínsecas generalmente producidas por miomas, y aún más infrecuentes son las malformaciones congénitas tubáricas.

La existencia de una obstrucción tubárica distal puede provocar la acumulación de líquido en su interior y la posterior dilatación de las trompas, lo que conocemos con el nombre de hidrosálpinx (Paolini *et al.*, 1963). Es uno de los trastornos tubáricos más graves y frecuentes ya que representa cerca del 30% de los casos (Strandell *et al.*, 1994). En los tratamientos de fecundación *in vitro*, gran número de estudios confirman que la presencia de hidrosálpinx se asocia a una reducción a la mitad de las tasas de embarazo, a un descenso en las tasas de implantación, así como a un aumento en el porcentaje de abortos precoces y de embarazos ectópicos (Andersen *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1996; González *et al.*, 2007b; Sharara, 2009; Li *et al.*, 2010; Chanelles *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2012). No obstante, el FT es uno de los problemas de fertilidad con mejor pronóstico reproductivo (Matalliotakis *et al.*, 2007; Okohue *et al.*, 2013).

2.1.4. Esterilidad sin causa aparente (ESCA)

Cerca del 16% de las causas de esterilidad son de origen desconocido (Registro_SEF, 2013), es decir, tras el pertinente estudio de fertilidad ninguno de los dos miembros de la pareja presenta problemas reproductivos. Sin embargo, durante el tratamiento de reproducción asistida se pueden ir revelando causas de esterilidad no diagnosticadas en un primer momento, como por ejemplo: baja respuesta a la estimulación, fallo de fecundación, mala calidad embrionaria, etc. (Ruiz *et al.*, 2003; Siristatidis y Bhattacharya, 2007; Kamath y Bhattacharya, 2012).

Las parejas con ESCA presentan una elevada tasa de gestación espontánea en los casos de mujeres con edades comprendidas entre los 28-30 años y con una duración de infertilidad inferior a 2-3 años. Por lo que, en un principio, el pronóstico del tratamiento reproductivo en estas pacientes es bueno (Vidal *et al.*, 2009; Reindollar *et al.*, 2010; Pandian y Bhattacharya, 2013).

2.2. Estudio de la pareja estéril

El estudio de ambos miembros de la pareja debe ser simultáneo e iniciarse cuando, tras un año de haber mantenido relaciones frecuentes y no protegidas no se consigue gestación. El periodo de un año no se ha elegido de forma arbitraria, sino que se basa en un estudio clásico en el que se evaluó la posibilidad de embarazo de parejas fértiles (Maruani y Schwartz, 1983). Según este trabajo, la probabilidad de embarazo de las parejas sin problemas reproductivos es de un 20% al mes, llegando a un 93% la probabilidad acumulada en un año. Dado que la edad de la mujer es determinante para su capacidad genésica (Quartim *et al.*, 2012), en pacientes mayores de 35 años el estudio estará indicado si no se ha logrado concebir al cabo de seis meses. De igual modo otras circunstancias individuales pueden hacer que se adelante la evaluación, este sería el caso de mujeres con: patologías uterinas, tubáricas u ováricas, enfermedades de transmisión sexual, ciclos menstruales irregulares, etc. (González *et al.*, 2007a; Bruna *et al.*, 2008)

La pareja se someterá a una serie de pruebas para poder determinar, en la medida de lo posible, el origen de la esterilidad y el tipo de tratamiento que se ajuste más a su situación. Así, se llevará a cabo tanto una completa anamnesis como exploraciones físicas, estudios hormonales y genéticos, seminogramas, etc. Una vez completado el estudio de fertilidad, se procederá a aplicar la técnica de reproducción asistida más adecuada en cada caso.

2.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) abarcan todas las prácticas que implican la manipulación *in vitro* de ovocitos, espermatozoides y/o embriones humanos con fines reproductivos (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Incluyen procedimientos tales como la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* (FIV), el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) y la donación de gametos. Debido a la existencia de un número cada vez mayor de parejas con problemas de fertilidad el uso de las TRA está experimentando un notable aumento. Según el registro nacional, se calcula que en el año 2011 los tratamientos de fertilidad generaron un total de 14 902 partos (Registro_SEF, 2013).

La técnica de reproducción asistida más utilizada es la FIV. Consiste en una secuencia de pasos muy coordinados que comienza con la hiperestimulación ovárica de la paciente, seguida de la recuperación de los ovocitos bajo ecografía transvaginal, fecundación y cultivo embrionario en el laboratorio y transferencia cervical del embrión/es al útero materno. Todo este proceso aparece debidamente especificado en el subapartado 2.2 de Material y Métodos.

Actualmente la fecundación *in vitro* puede realizarse mediante dos procedimientos diferentes: fecundación *in vitro* convencional (FIV-Convencional), en la que óvulo y espermatozoide se unen de forma espontánea en el laboratorio, y la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV-ICSI), en la que la fecundación se realiza seleccionando e inyectando un único espermatozoide en cada óvulo.

Inicialmente, la FIV estaba indicada exclusivamente para conseguir gestaciones en mujeres que habían quedado estériles tras la extirpación de ambas trompas de Falopio debido a embarazos ectópicos previos. Hoy en día, también está indicada para resolver otros muchos problemas como: ausencia, obstrucción o lesión de trompas, endometriosis en grados moderados o severos, alteraciones de la ovulación, edad avanzada, técnicas de ovo-donación, fracaso tras inseminación artificial, disminución del número y/o movilidad de los espermatozoides o aumento de las alteraciones morfológicas de los mismos, ausencia de espermatozoides en eyaculado, vasectomía previa, DGP, etc. (Giles y Vidal, 2012).

2.3.1. Factores pronósticos del éxito del tratamiento

Actualmente los indicadores del éxito de un ciclo de FIV son la edad materna, la reserva folicular, la capacidad reproductiva previa, la respuesta a la estimulación ovárica, el número de embriones obtenidos y la calidad de los mismos (Arday y Calderón, 2008; López, 2008). No obstante, sería de gran utilidad poder determinar más factores pronósticos del éxito del tratamiento, por ejemplo, resultaría muy interesante esclarecer la relación existente entre metabolismo folicular y calidad ovocitaria. Si la composición bioquímica del líquido folicular pudiera pronosticar el estado fértil de la mujer, podríamos considerarla un indicador de fertilidad fácil, repetitivo y fiable. De hecho, este es uno de los objetivos que persigue el trabajo de investigación que hemos llevado a cabo.

Edad materna

En la mujer la edad condiciona de forma evidente su capacidad reproductiva. Cuando en análisis epidemiológicos se estudian poblaciones que no emplean anticonceptivos, se observa que la fertilidad femenina tiene su máximo entre los 20-24 años y posteriormente disminuye de manera uniforme, descendiendo significativamente una vez cumplidos los 35 y de forma muy acentuada a partir de los 40 años (Ziebe *et al.*, 2001).

Consecuentemente, existen numerosos datos en la literatura que confirman que la eficacia de las TRA disminuye con la edad, tal y como se puede apreciar en la *Figura 5*. Además, a medida que aumenta la edad (y disminuye la fertilidad) la incidencia de abortos espontáneos también se eleva (Maroulis, 1991; Nasmyth, 2001). Estudios de hibridación *in situ* en embriones y ovocitos no fecundados han demostrado que la tasa de anomalías cromosómicas aumenta de forma significativa con la edad (Nasmyth, 2001; Pellestor *et al.*, 2003; Remohí *et al.*, 2007).

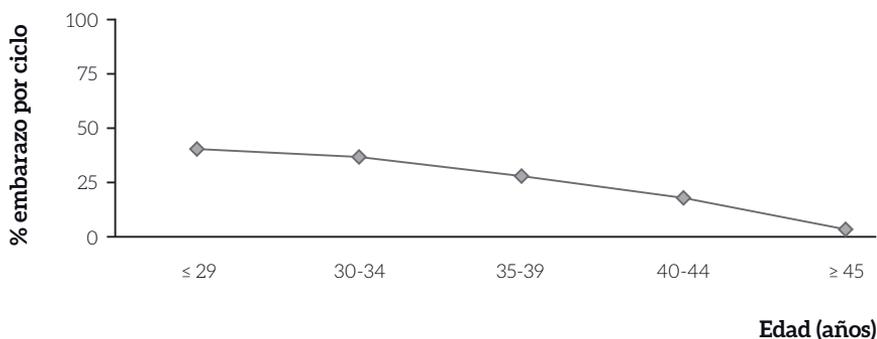


Figura 5. Tasa de embarazo por ciclo iniciado de FIV según el rango de edad. Se representa el porcentaje (%). En esta gráfica se observa cómo a medida que aumenta la edad materna el porcentaje de gestación disminuye (Registro_SEF., 2010).

Número y calidad embrionaria

El principal objetivo de la FIV es el nacimiento de un niño sano. Para ello se debe transferir al útero materno el número suficiente de embriones como para maximizar la probabilidad de embarazo, tratando al mismo tiempo de reducir la posibilidad de gestación múltiple.

Hoy en día, el único método para seleccionar el mejor embrión es la observación y escrutinio del que presenta la morfología más adecuada. Los sistemas de clasificación se basan en características morfocinéticas tales como: número de células embrionarias, ritmo de división, grado y tipo de fragmentación celular, simetría y forma de los blastómeros, presencia de vacuolas, multinucleación, etc.

2.3.2. Complicaciones más comunes

Embarazo múltiple

El riesgo de embarazo múltiple (gestación ≥ 2 sacos embrionarios) está relacionado con la edad de la mujer, el número de embriones transferidos al útero y la calidad de los mismos. Según el registro nacional, la tasa de embarazo múltiple en FIV alcanza el 26,25% (Registro_SEF, 2013). Dicha gestación supone un aumento de los riesgos médicos tanto para la futura madre como para su descendencia, como son: el incremento de la patología del embarazo, la prematuridad, el bajo peso al nacer y las complicaciones neonatales entre otras (Nicolás *et al.*, 2012).

Síndrome de hiperestimulación ovárica

En ocasiones la respuesta ovárica al tratamiento es excesiva, se desarrollan un gran número de folículos, aumenta el tamaño ovárico y se eleva considerablemente la cantidad de estradiol en sangre. Este síndrome se clasifica en leve, moderado y severo. El síndrome severo ocurre de forma excepcional: 0,26% sobre el total de ciclos iniciados (Registro_SEF, 2013) y se caracteriza por la acumulación de líquido en el abdomen e incluso en el tórax, así como por alteraciones de la función renal y/o hepática. En casos críticos se puede asociar a insuficiencia respiratoria o alteraciones de la coagulación e, incluso, puede precisar hospitalización y tratamiento médico-quirúrgico.

Embarazo ectópico

Consiste en la implantación del embrión fuera del útero materno, habitualmente en las trompas de Falopio. Se produce en un 3,1% del total de gestaciones (Registro_SEF, 2013).

Afectación psicológica

Durante el tratamiento de fertilidad, tanto el hombre como la mujer pueden padecer trastornos psicológicos, tales como síntomas de angustia y depresivos. En algunos casos, pueden surgir dificultades en la relación de pareja y niveles elevados de ansiedad en el período de espera entre la aplicación de la técnica y la confirmación de la consecución o no del embarazo, así como ante los fallos repetidos de la técnica (Roca, 2013).

3. LAS PEPTIDASAS

En los últimos años se ha venido describiendo el papel que diferentes péptidos bioactivos (también llamados biopéptidos) pueden tener en diversas situaciones fisiopatológicas, entre ellas cuestiones relacionadas directamente con la (in)fertilidad tanto masculina como femenina, si bien su papel en la fertilidad femenina es mucho menos estudiado que en la masculina, como iremos viendo a lo largo de esta introducción.

Una de las formas más habituales de estudiar las alteraciones peptidérgicas es analizar la actividad de los enzimas que los controlan y que, en general, reciben el nombre de peptidasas. Los péptidos son hidrolizados por un número limitado de enzimas que presentan una especificidad de sustrato relativamente amplia, quedando descartado el concepto “una peptidasa, un sustrato” (Schwartz, 1983; Kenny, 1986). Las peptidasas se encuentran presentes en una gran variedad de tejidos y fluidos corporales por lo que se cree que deben estar involucradas en el metabolismo de una gran cantidad de biopéptidos, fundamentales en la comunicación intercelular del organismo (Fujiwara *et al.*, 1999). En la actualidad, el conocimiento de la función de las peptidasas las ha llevado a su empleo como marcadores tumorales y dianas terapéuticas.

3.1. Clasificación y nomenclatura de las peptidasas

El 2% de los genes que se transcriben son peptidasas, lo que las convierte en uno de los mayores grupos de proteínas funcionales del organismo. Constituyen un grupo muy heterogéneo de proteínas, que pueden encontrarse tanto unidas a membrana como en las fracciones solubles y que pueden presentar tamaños entre 25 y 300 kDa (Taylor, 1993). Por todo ello, no es de extrañar que su clasificación y nomenclatura sea una tarea compleja, que haya ido variando según se ha profundizado en su conocimiento.

En cuanto a la terminología, hay que tener en cuenta que ésta ha sido confusa, ya que en ocasiones se han empleado nombres diferentes para referirse a la misma enzima. Históricamente, los términos proteasa, proteinasa y peptidasa han tenido significados ligeramente diferentes. En la actualidad, a pesar de que algunos autores recomiendan el empleo del término “enzima proteolítico” como el más adecuado y fácilmente entendible, desde el Comité NC-IUBMB² se recomienda el empleo del término “peptidasa” para referirse a todas aquellas enzimas que rompen enlaces peptídicos. Los miembros de este grupo de proteínas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas, en función de la situación del enlace que hidrolizan.

² NC-IUBMB: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Así, las exopeptidasas rompen el enlace peptídico del último, o de los últimos 2 ó 3 aminoácidos de la cadena. Si su actuación tiene lugar en el extremo amino terminal se denominan aminopeptidasas, dipeptidil-peptidasas o tripeptidil-peptidasas, respectivamente. Si la hidrólisis sucede en el extremo carboxilo terminal, las enzimas serían carboxipeptidasas, o peptidil-dipeptidasas. El término dipeptidasa hace referencia a exopeptidasas específicas para hidrolizar el enlace peptídico de los dipéptidos. Por último, las omega-peptidasas son enzimas que eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos (uniones peptídicas formadas por grupos diferentes al α -amino y α -carboxilo).

Las endopeptidasas catalizan la ruptura de enlaces peptídicos dentro de la cadena, y se clasifican en base a su mecanismo catalítico. Es decir, según la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis. Así, dentro de este grupo se describen las aspartil-endopeptidasas, las cisteinil-endopeptidasas, las metaloendopeptidasas, las serilendopeptidasas, las treonil-endopeptidasas, y en un último grupo se englobarían aquellas que aún no han sido clasificadas ("*unclassified-endopeptidasas*").

Una posible clasificación de estas enzimas proteolíticas es la propuesta por el grupo de Marks (1968a, 1968b, 1975), basada en la afinidad por diferentes sustratos cromogénicos. Según esta clasificación, las aminopeptidasas se agruparían en *ácidas*, *básicas* y *neutras*, dependiendo de que actuaran sobre sustratos ácidos, básicos o neutros, respectivamente. Por otro lado, también se ha nombrado a las peptidasas dependiendo del péptido bioactivo sobre el que actúan. Así, podrían describirse peptidasas degradadoras de encefalinas, de hormona liberadora de tirotropina (TRH), o de angiotensinas, entre otras.

En los años 90, se establecieron las bases de un sistema de clasificación según las secuencias y estructuras de las peptidasas, empleando la riqueza de nuevos datos disponibles. De esta clasificación surgió la base de datos MEROPS, que desde 1996 constituye en Internet una fuente referencial con datos de todas las peptidasas. Esta base de datos establece una clasificación jerárquica construida sobre los conceptos de Tipo Catalítico, Clan, Familia y Peptidasa (Barret *et al.*, 2004; ver *Tabla 1*).

En un primer paso, las peptidasas se agrupan según el **Tipo Catalítico**, es decir, la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis anteriormente mencionados, de los cuales tomarían la letra mayúscula inicial (A, C, M, S, T, U) de la clasificación. A continuación las peptidasas se agrupan en clanes o familias, atendiendo a grupos de peptidasas homólogas.

Cada **Clan** agrupa una o varias Familias, con un origen común. El nombre del Clan viene determinado por una segunda letra mayúscula, que no se reutiliza en caso de desaparecer el Clan en posteriores reorganizaciones de la clasificación. No todas las Familias pueden clasificarse en Clanes.

Las **Familias** se agrupan por homología con el miembro más representativo del grupo, en base a la unidad peptidásica. La Familia aporta un número secuencial a la nomenclatura. Este número tampoco se reutiliza. Por último, cada peptidasa tiene un identificador único, con 2 partes separadas por un punto (·).

Aunque existen diversas clasificaciones, las aportadas por la *Enzyme Commission* (**EC**), son las aceptadas actualmente. En esta clasificación las peptidasas se encontrarían dentro del grupo E.C. 3.4, que hace referencia a las hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos. La subclasificación posterior (XX.X) estaría de acuerdo con la nomenclatura anteriormente mencionada, propuesta por Rawlings y Barrett en 1995 y 2010.

3.2. Funciones de las peptidasas

3.2.1. Las peptidasas como enzimas interconvertidoras de biopéptidos

La comunicación entre células es una condición indispensable para el funcionamiento coordinado de cualquier organismo. Esta comunicación se realiza principalmente mediante tres sistemas: el sistema hormonal, el sistema nervioso y los mediadores celulares. Los péptidos bioactivos son “moléculas mensajeras” empleadas por estos tres sistemas. Este tipo de moléculas se caracterizan por su ubicuidad, habiendo sido descritas en tejidos de todos los reinos de seres vivos, y por sus secuencias cortas de aminoácidos que pueden encontrarse libres o encriptadas en proteínas. Estos últimos requerirían la hidrólisis enzimática para su liberación (Sumitomo *et al.*, 2005; Nascimento-Silva *et al.*, 2008). La acción conjunta de estos biopéptidos con las enzimas y receptores involucrados forman los diferentes sistemas peptídicos, de vital importancia en la comunicación celular (Turner, 1986, 1987; Angelisova *et al.*, 1999; Sjostrom *et al.*, 2000; Mina-Osorio, 2008).

El control peptídico es un fenómeno altamente complejo, y a la vez flexible y aplicable al control de muy diversas funciones fisiológicas y en tipos celulares muy distintos. Así, los péptidos bioactivos están regulados por “convertasas” específicas que los hidrolizan (Hallberg *et al.*, 2005).

La función biológica más conocida de las peptidasas es la conversión de péptidos bioactivos (*Fig. 6*). Gracias a su actividad hidrolítica las peptidasas pueden modular las funciones de los mensajeros peptídicos, produciendo tanto formas activas, como inactivas (Antczak *et al.*, 2001; Proost *et al.*, 2007).

En su concepto clásico, las responsables de la conversión de biopéptidos son las peptidasas de superficie celular o ectopeptidasas. Éstas, tienen el centro catalítico dirigido hacia el exterior de la célula, regulando así las funciones de estos mensajeros peptídicos (Turner, 1986, 1987; Taylor, 1993). No obstante, se ha descrito que

tanto las formas unidas a la membrana como las formas solubles intracelulares pueden ser secretadas al exterior, donde participarían en la conversión de péptidos bioactivos (Balogh *et al.*, 1998; Shrimpton *et al.*, 2002). De hecho, los enzimas analizados en esta Memoria son peptidasas presentes en la fracción soluble del LF, por lo que su función no es otra que la de regular la actividad de péptidos bioactivos presentes en el antro folicular y cuyo cometido podría ser crucial en el proceso reproductivo femenino.

3.2.2. Catabolismo proteico y acciones intracrininas de las peptidasas

Hasta hace relativamente poco se pensaba que la función de las peptidasas en el interior de las células se limitaba a la última etapa del catabolismo proteico (Mantle, 1992; O'Cuinn, 1998). Así, y dado que la acción de los péptidos bioactivos ocurre en la superficie celular, las peptidasas citosólicas no tomarían parte en su regulación metabólica, salvo que se secretaran al exterior. Sin embargo, en la última década, se ha descrito que además de la función endocrina, paracrina y autocrina, estos mensajeros peptídicos podrían tener funciones dentro de la propia célula -funciones intracrininas- (Fig. 6).

Según algunos autores, muchos péptidos podrían actuar en el interior de la misma célula donde son sintetizados. Estos péptidos, mediante su unión a receptores intracelulares, regularían por acción intracrina funciones como el crecimiento celular (Re, 2002, 2003; Re y Cook, 2006). Siendo esto así, se ha propuesto que las peptidasas intracelulares realizarían funciones de regulación intracrina, además de su actuación en la última etapa del catabolismo proteico (Ferro *et al.*, 2004; Linardi *et al.*, 2004).

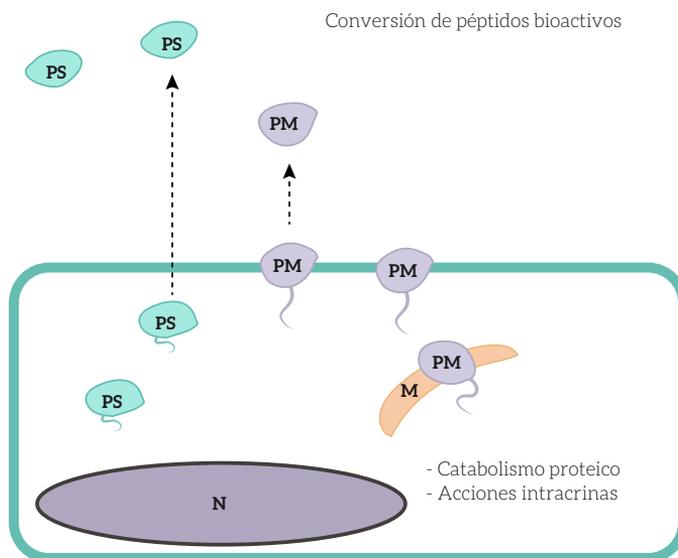


Figura 6. Representación gráfica de las diferentes localizaciones de las peptidasas y sus funciones en estos lugares. (PM) peptidasa anclada a la membrana; **(PS)** peptidasa soluble, tanto citosólica como secretada al espacio extracelular; **(N)** núcleo y **(M)** membrana citoplasmática (Blanco, 2010).

3.2.3. Otras acciones de las peptidasas

Gracias a su actividad catalítica, la acción de las peptidasas también forma parte de los procesos que conllevan a la degradación de la matriz extracelular. Se ha comprobado que tienen importancia en el proceso de rotura folicular (durante la ovulación), en el desarrollo de nuevos tejidos, en la inflamación y en procesos neoplásicos (Pérez et al, 2009; Blanco et al, 2010).

Además, algunas peptidasas pueden ejercer su función como moléculas de adhesión, proceso vital en el reconocimiento celular y necesario en fenómenos como la migración celular (Riemann *et al.*, 1999; Antczak *et al.*, 2001; Pro y Dang, 2004; Carl-McGrath *et al.*, 2006). Otras tienen función receptora, se ha descrito que las estructuras de algunas de las ectopeptidasas estudiadas en este trabajo contienen dominios intracitoplasmáticos de pocos aminoácidos (Riemann *et al.*, 1999; Sumitomo *et al.*, 2005). De esta forma, estas peptidasas podrían dar lugar a señales intracelulares mediante la interacción con diferentes moléculas, condicionando funciones como el crecimiento o la migración celular (Antczak *et al.*, 2001; Nanus, 2003; Sumitomo *et al.*, 2005).

3.3. Las peptidasas en la fisiología y en la patología

Las peptidasas cumplen una tarea fundamental en la comunicación intercelular, condicionando diferentes funciones fisiológicas e influyendo en la génesis y evolución de diferentes procesos patológicos. A nivel del sistema nervioso central, se ha descrito que forman parte en funciones como la memoria, el comportamiento y la nocicepción (Hui, 2007). También es muy conocido su papel en el sistema cardiovascular y en la función renal, ya que las vías metabólicas del sistema renina-angiotensina (denominado RAS o sistema RA) están reguladas por peptidasas (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Carrera *et al.*, 2009). Del mismo modo, han sido descritos cambios en la expresión y función de las peptidasas en: alteraciones de la memoria y del estado de ánimo, enfermedades cardiovasculares, renales, endocrinometabólicas y en procesos tumorales (Wiedeman y Trevillyan, 2003; Hui, 2007; Leung, 2007; Pérez, 2011). De hecho, está ampliamente descrito el empleo de determinadas peptidasas como marcadores tumorales (Murakami *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Havre *et al.*, 2008; Larrinaga *et al.*, 2010, 2011a, 2011b, 2012).

Por otra parte, algunos inhibidores de peptidasas se emplean actualmente en terapia farmacológica. Por ejemplo, el captopril, enalapril, y lisinopril, son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), y se emplean en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Wilcox *et al.*, 1988). Las glipitinas, inhiben la acción de la enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV), y se emplean en el tratamiento de la diabetes tipo II (Wiedeman y Trevillyan, 2003; Drucker y Nauck, 2006). También existen estudios bastante avanzados sobre el empleo de otros inhibidores de peptidasas, como los de la prolil endopeptidasa (PEP) para el tratamiento de la demencia senil o los de la endopeptidasa neutra (NEP) y la aminopeptidasa N (APN) en el tratamiento del dolor, entre otros (García-Horsman *et al.*, 2007; Noble y Roques, 2007).

Algunas de las enzimas mencionadas en el párrafo anterior han sido objeto de estudio en el trabajo que se presenta en esta Tesis. En páginas posteriores se llevará a cabo una descripción más amplia y detallada de algunas de sus funciones y características, así como su posible vinculación con la fertilidad. Destacar que la *Tabla 1* muestra la clasificación jerárquica de las peptidasas analizadas, en ella se puede observar tanto el nombre completo de la enzima así como su acrónimo.

3.4. Papel de las peptidasas en la fertilidad

El ciclo sexual es uno de los principales acontecimientos fisiológicos en los que se generan cambios de los niveles hormonales, por ello no es de extrañar que se produzcan alteraciones en las actividades de los enzimas proteolíticos a lo largo de él.

A finales de la década de los años 60 comienzan a aparecer estudios que establecen una relación clara entre peptidasas y hormonas sexuales. Uno de ellos fue el realizado por Vanhaper en 1969, el cual describía un incremento de actividad hipofisaria de leucina aminopeptidasa (Leu-AP) tras tratamientos con estrógenos. También se observaron incrementos en diversas actividades aminopeptidásicas tras administración de estrógenos y progestágenos en el hipotálamo de ratas de ambos sexos (Bickel *et al.*, 1972; Kuhl *et al.*, 1978). Prácticamente al mismo tiempo se propuso que, tras administración intracerebroventricular de LH, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) era inactivada por la cistina aminopeptidasa (Cys-AP) y por un enzima parecido a la oxitocinasa (Kuhl y Taubert, 1975). Destacar que la degradación de la GnRH no está limitada al eje hipotálamo-hipofisario, ya que en todas las zonas cerebrales existen enzimas capaces de hidrolizar el decapeptido.

A finales de la década de los 80 nuestro departamento realizó un estudio sobre diferencias sexuales en la actividad aminopeptidásica tras orquidectomía y ovariectomía, en el que se observó un incremento de actividad enzimática mayor en machos que en hembras que coincidía con una mayor elevación de los niveles de LH plasmáticos en los primeros tras la castración (de Gandarias *et al.*, 1989). A partir de los trabajos mencionados anteriormente, se realizaron numerosos estudios de seguimiento de la actividad proteolítica durante el ciclo sexual en el eje hipotálamo-hipofisario y en otras regiones cerebrales, observándose cambios cíclicos en estas actividades enzimáticas que podían ser paralelos o antiparalelos a los cambios cíclicos gonadotrópicos (de Gandarias *et al.*, 1990, 1993, 1994a, 1996, 1999a, 1999b).

3.4.1. Regulación del ciclo sexual: modelo de liberación gonadotrópica

A pesar de las investigaciones realizadas no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se produce la liberación cíclica hormonal, es decir, no existe un modelo de liberación gonadotrópica plenamente establecido.

Debido a los cambios conductuales observados en el comportamiento de las mujeres durante el ciclo menstrual, durante mucho tiempo se pensó que debía existir una relación entre éste y el cerebro. Pero hasta que Sawyer (1955) detectó que diversos agentes neurotransmisores inhibían la ovulación, no se pudo comprobar experimentalmente. Actualmente se sabe que un gran número de neuropéptidos interviene en el control de la secreción de hormonas sexuales, tanto a nivel hipotalámico e hipofisario como en otras regiones cerebrales tales como la amígdala o la corteza. Así, existen numerosos trabajos que relacionan la actividad reproductiva con biopéptidos como la angiotensina II (Ang II), el neuropéptido Y, la colecistoquinina y los péptidos opioides (siendo estos últimos los más estudiados).

En ratas se ha observado cómo el tono opioide hipotalámico desciende bruscamente durante el proestro (momento en el que se produce el pico preovulatorio de la LH) (Sarkar y Yen, 1985), este evento es esencial en el mecanismo neural que provoca la secreción de LH, ya que un descenso del tono opioide provocado previamente adelanta el pico hormonal. Parece ser que el sistema opioide se encuentra entre el reloj neural y las neuronas de GnRH, por lo que se plantea que el reloj neural debe restringir el tono opioide (Kalra, 1992). Otros autores proponen que los estrógenos pueden modular la síntesis y/o actividad de enzimas responsables de la degradación o síntesis de péptidos, pudiendo así intervenir en la secreción de gonadotropinas (Fink, 1988). También se ha descrito que el estradiol hace fluctuar la densidad sináptica en hipocampo durante el ciclo estral (Woolley y McEwen, 1992).

Las encefalinas son unos de los EOP más importantes del organismo y se encuentran involucradas en el control de la liberación cíclica hormonal. Se ha estudiado la actividad de tres enzimas degradadoras de encefalinas: la tyr-aminopeptidasa (soluble), la aminopeptidasa A (APA) y la APN (ambas unidas a membrana). Los resultados obtenidos mostraron cómo la actividad soluble cambiaba a lo largo del ciclo presentando mayores niveles de actividad durante la tarde del proestro a nivel hipotalámico, del mismo modo, se observó que la actividad de APN variaba a lo largo del ciclo presentando sus mayores cotas en la tarde del proestro a nivel de hipotálamo, hipófisis y amígdala. Todos estos picos de actividad peptidásica son coincidentes con un descenso en el tono opioide, pudiendo por ello estar implicadas en la regulación de ciclo sexual (de Gandarias *et al.*, 1996; Fernández, 1996).

Los resultados comentados anteriormente han provocado que se haya propuesto un mecanismo de liberación gonadotrópica del eje hipotálamo-hipofisario, complemento del reloj neural de Kalra (1992), en el que durante la fase de estro las encefalinas actuarían inhibiendo (sinaptando) la liberación de GnRH y catecolaminas (excitadoras de la liberación), produciendo una inhibición global. Esto se lograría con una menor degradación del péptido a nivel intracelular y sináptico (baja actividad aminopeptidásica soluble y de membrana). Por el contrario, durante el proestro habría una desinhibición encefalinérgica al producirse un incremento en la actividad enzimática degradadora (de Gandarias *et al.*, 1994b).

3.4.2. Sistemas de comunicación celular y fertilidad

Los péptidos opioides y sus peptidasas, además de actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis modulando la secreción de GnRH, FSH y LH (Fabbri *et al.*, 1989; Dobson y Smith, 2000; Parvizi, 2000), tienen también una acción directa sobre el folículo ovárico (Dell'Aquila *et al.*, 2002; Kaminski *et al.*, 2003).

En el ovario, procesos tan importantes como la oogénesis, la foliculogénesis y la ovulación están controlados tanto hormonalmente como por una gran variedad de sustancias producidas por el propio ovocito y por las células de la granulosa (Karlsson *et al.*, 1997; Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004), por lo que existe una intensa comunicación bidireccional entre los distintos tipos celulares (Fig. 7). El LF contiene una gran cantidad de factores y sustancias que regulan la maduración folicular y ovocitaria. Del mismo modo, la fecundación del ovocito, el transporte del embrión resultante, su evolución y la capacidad de éste de implantarse en el endometrio estarán claramente influenciados por las características del microambiente que el embrión encuentre tanto en las trompas de Falopio como en la cavidad uterina (Facchinetti *et al.*, 1986; Petraglia *et al.*, 1986; Pardanaud y Dieterlenlievre, 1993; Hannoun *et al.*, 2010; Bianchi *et al.*, 2013).

En resumen, durante el ciclo sexual las células ováricas y endometriales sufren cambios dinámicos en cuanto a crecimiento, diferenciación y regresión celular, por lo que el órgano reproductor femenino representa un buen modelo para el estudio de la regulación peptidérgica (Fujiwara *et al.*, 1999). Si lo que buscamos es una optimización de los tratamientos de reproducción asistida, resultará imprescindible conocer todos estos sistemas de comunicación celular con el fin de conseguir el microambiente idóneo para el cultivo de gametos y embriones.

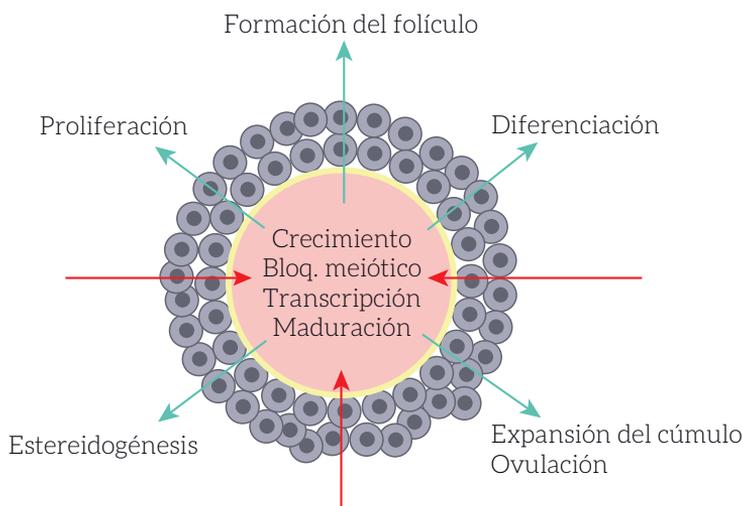


Figura 7. Comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa. Se observa la influencia de las células de la granulosa en el desarrollo ovocitario así como los procesos controlados por el ovocito que se llevan a cabo en las células de la granulosa (adaptado de Eppig, 2001).

Uno de los sistemas de comunicación celular más estudiados es el **sistema opioide**, integrado por los péptidos opioides endógenos (EOP), sus receptores celulares y los enzimas que se encargan de su regulación (peptidasas). El sistema opioide se encuentra presente en órganos y tejidos del tracto genital masculino y femenino, interviniendo en la función reproductora. Otro importante modelo de regulación fisiológica es el **sistema RA**, presente en el ovario de múltiples especies (entre ellas la humana) (Nemeth *et al.*, 1994), de hecho, se ha propuesto su intervención en procesos tan importantes como la esteroidogénesis, la ovulación, el síndrome de ovario poliquístico y el síndrome de hiperestimulación ovárica (Harata *et al.*, 2006).

Fertilidad masculina

Los tres tipos de receptores opioides han sido descritos en la membrana de espermatozoides humanos (Agirregoitia *et al.*, 2006; Albrizio *et al.*, 2006), lo que indicaría una acción directa de los EOP sobre las células espermáticas, y por lo tanto, sobre la capacidad reproductora del hombre. Péptidos opioides como las encefalinas y las endorfinas están presentes en el fluido seminal, siendo su concentración entre 6 y 12 veces mayor que en sangre (Sharp y Pekary, 1981). Además, son varios los estudios que relacionan al sistema opioide con la movilidad espermática, obteniendo resultados contradictorios. En 1982 el equipo de Sastry observó cómo elevadas concentraciones de encefalinas y β -endorfinas disminuían la movilidad espermática. Es más, Ragni describió en 1988 que los adictos a las drogas opiáceas solían padecer astenozoospermia (bajo porcentaje de movilidad espermática). Sin embargo, un grupo japonés refirió bajos niveles de met-enkefalina en plasma seminal en pacientes astenozoospermicos (Fujisawa *et al.*, 1996). Intentando llegar a un consenso, estudios posteriores han sugerido que para que los espermatozoides mantengan la movilidad es necesario un adecuado nivel de encefalinas e, incluso, que el efecto de estos péptidos depende de su concentración en el medio. Por lo que las peptidasas degradadoras de encefalinas, presentes en el líquido seminal, tendrían un papel clave en la movilidad espermática (Subirán *et al.*, 2011).

A lo largo del oviducto el espermatozoide humano obtiene su capacidad fecundante. En vaca se ha descrito cómo la concentración de met-enkefalinas y β -endorfinas varía a lo largo de las distintas partes de su aparato reproductor (Facchinetti *et al.*, 1986; Petraglia *et al.*, 1986). No obstante, el papel que juega el sistema opioide en la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica del espermatozoide es hoy en día desconocido.

Señalar que la mayoría de estudios que relacionan los sistemas de comunicación fisiológicos con la fertilidad se han llevado a cabo en muestras seminales, por lo que el aparato reproductor femenino representa hoy en día una gran incógnita.

Fertilidad femenina

Los receptores de péptidos opioides han sido hallados en varias partes del sistema reproductor femenino, como las células de la granulosa porcina (Slomczynska *et al.*, 1997) o la placenta humana (Belisle *et al.*, 1988). Trabajos recientes han demostrado la presencia del receptor opioide MOR en el complejo oocitocúmulo, donde, gracias al aumento de calcio intracelular mediado por MOR, se ha propuesto dicho receptor como uno de los principales intermediarios en la comunicación bidireccional ovocito-células de la granulosa cuya finalidad es la maduración ovocitaria (Dell'Aquila *et al.*, 2008; Minoia *et al.*, 2008; Iorga *et al.*, 2009) (Fig. 7). Más concretamente, se ha descrito la presencia de los tres tipos de receptores opioides en la membrana de ovocitos humanos, así como una distribución dependiente del grado madurativo del ovocito para los receptores MOR y KOR (Dell'Aquila *et al.*, 2003; Agirregoitia *et al.*, 2012a).

Precusores de péptidos opioides han sido encontrados en el útero y ovario de distintas especies (incluida la humana), de hecho, existe una producción localizada de proopiomelanocortina (POMC), prodinorfina (PDYN) y proencefalina (PENK) en estos órganos (Chen *et al.*, 1986; Douglass *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1998a, 1998b). El RNAm de POMC está presente en folículos antrales, en el cuerpo lúteo y en las células de la granulosa y de la teca, y su expresión está regulada principalmente por la FSH, variando a lo largo del ciclo menstrual. La LH induce la expresión de PENK en las células de la teca en folículos pequeños. Por último citar que las gonadotropinas modulan también la expresión de PDYN, la FSH actúa sobre las células de la granulosa y la LH sobre las células de la teca (Melner *et al.*, 1986; Sanders *et al.*, 1990; Staszkievicz *et al.*, 2007). En resumen, las hormonas gonadotrópicas FSH y LH modulan la expresión de los precursores de péptidos opioides en ovario.

Por todo lo comentado anteriormente, los opioides endógenos, presentes tanto en el líquido folicular como en el fluido de trompas y útero (Petraglia *et al.*, 1985, 1986, 1987; Zhu y Pintar, 1998), podrían tener un papel fundamental en la maduración nuclear final del ovocito, actuando directamente vía receptor (Subirán *et al.*, 2011; Agirregoitia *et al.*, 2012a). De hecho, se considera que un gran número de péptidos bioactivos están relacionados con la función y la diferenciación de las células ováricas.

Con respecto a las petidasas, se ha detectado actividad aminopeptidásica en la membrana uterina de ratas, la cual se correlaciona de forma positiva con la concentración de estradiol sérico, sugiriendo que la actividad aminopeptidásica en útero estaría regulada por estradiol y sería específica de tejido, influyendo indirectamente en el estado endometrial (Neves *et al.*, 2006). En relación al ovario, en 1996 el grupo de Tachibana describió cómo la bestatina aumentaba la esteroidogénesis (dependiente de FSH) de las células de la granulosa porcina, por lo que se ha sugerido que las aminopeptidasas ligadas a membrana son un regulador vital de la esteroidogénesis folicular. Años más tarde, Carrera y sus

compañeros de investigación (2009) hallaron en ovario de rata actividad enzimática tanto en forma soluble como asociada a membrana para APN, aminopeptidasa B (APB), APA y aspartil aminopeptidasa (Asp-AP).

En mujeres sometidas a cirugía se ha detectado actividad para APN en la membrana de las células del estroma endometrial, la teca interna del folículo y el cuerpo lúteo (Fujiwara *et al.*, 1992a; Imai *et al.*, 1992a, 1992b, 1996). Sin embargo, no se ha descrito actividad APN en las células de la granulosa pero sí actividad *APN-like* (Fujiwara *et al.*, 1999). Del mismo modo, se refirió actividad para DPPIV en la membrana de las células glandulares del endometrio y células luteínicas (Fujiwara *et al.*, 1992b; Imai *et al.*, 1992c). Todo ello hizo que, a finales de los años noventa, se propusiera a las ectopeptidasas expresadas en ovario como enzimas determinantes en la función y diferenciación de las células ováricas ya que regulaban la concentraciones extracelulares (intrafoliculares) de péptidos bioactivos, estableciendo un sistema de regulación peptidérgica en la propia cavidad antral (Yoshioka *et al.*, 1998).

En cerebro bovino la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) ha sido caracterizada y purificada *in vivo* como una encefalinasa extracelular (Hersh y McKelvy, 1981), no obstante, al ser considerada una enzima citoplasmática se desconoce su función en el metabolismo opioidoinérgico (Dyer *et al.*, 1990; Constam *et al.*, 1995). El grupo de Tomoharu Osada (2001a) demostró que ratas transgénicas deficientes de PSA presentaban infertilidad ya que eran incapaces de formar y mantener el cuerpo lúteo del embarazo.

Se ha referido presencia de APA a nivel de tejido endometrial, ovárico y placentario (Vinson *et al.*, 1997; Hassan *et al.*, 2000; Ando *et al.*, 2002). La APA es uno de los principales enzimas que regulan la concentración de Ang II en el ovario humano, es más, se ha detectado en líquido folicular una inmunoreactividad *AngII-like* 10 veces mayor que en plasma (Culler *et al.*, 1986). En 2006 Harata describió por primera vez la expresión y distribución celular de APA en el ovario de mujeres a lo largo de su ciclo menstrual. Durante el proceso de foliculogénesis se detectó presencia débil de APA en la membrana del ovocito y en las células de la granulosa, con respecto al cuerpo lúteo se refirió presencia moderada en las células luteínicas grandes y débil en las células luteínicas pequeñas. Finalmente, en el cuerpo amarillo no se observó presencia de APA. Estos resultados han hecho que se especule con la posibilidad de que la AngII intervenga en procesos como la foliculogénesis y la función del cuerpo lúteo.

La Cys-AP u oxitocinasa, única aminopeptidasa de membrana degradadora de oxitocina, ha sido descrita en tejidos tan dispares como cerebro, corazón, riñón, músculo liso, células adiposas, colon, próstata y ovario (Czech y Corvera, 1999;

Moeller *et al.*, 1999; Demaegdt *et al.*, 2004). Considerada en humanos la peptidasa placentaria más importante a nivel de membrana, durante el embarazo se ha detectado en plasma una forma circulante de Cys-AP, resultante del corte proteolítico llevado a cabo en el dominio extracelular de la peptidasa (Nomura *et al.*, 2005). La actividad de Cys-AP en plasma aumenta significativamente durante el tercer trimestre de gestación, para experimentar un efecto *plateau* justo antes del parto (Mizutani *et al.*, 1982; Mustafa *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2009). Debido a que dos de sus principales sustratos, oxitocina y vasopresina, generan contracción y vasoconstricción uterina, se ha establecido que la Cys-AP contribuye al desarrollo normal del embarazo y suprime el dolor mediante la regulación del nivel de estas hormonas en suero (Rogi *et al.*, 1996; Horio *et al.*, 1999).

En una gran cantidad de tejidos y fluidos humanos ha sido detectada actividad para la enzima PEP. Más concretamente, se ha observado elevada actividad en el córtex renal, células epiteliales, fibroblastos, testículos, linfocitos, trombocitos, placenta y ovario porcino (Mizutani *et al.*, 1984; Pereira *et al.*, 2009) mientras que la actividad de PEP en fluidos corporales ha sido baja (Goossens *et al.*, 1996a). En 1998 el grupo de Kimura comparó entre folículos pre-antrales y antrales la actividad PEP encontrada en LF y células de la granulosa, y determinaron mayor actividad en folículos pre-antrales tanto en LF como en granulosa. Además, la hibridación *in situ* reveló mayor expresión de prolil oligopeptidasa RNAm en las células de la granulosa de folículos pre-antrales con respecto a las procedentes de folículos antrales. Lo cual viene a sugerir la importancia de PEP en el desarrollo de las primeras etapas de la foliculogénesis.

Por tanto, las peptidasas ejercen diferentes acciones en distintas etapas del proceso reproductivo femenino. Y es por ello que son moléculas de gran interés para una mejor comprensión de la fertilidad humana, así como para su estudio como posibles marcadores de calidad folicular y ovárica.

3.5. PEPTIDASAS ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO

En la *Tabla 1* aparecen mencionadas las nueve peptidasas analizadas en este trabajo. Más adelante, se representa la localización subcelular de las mismas, así como la identificación del cromosoma en que se encuentra el gen que codifica para cada una de ellas (*Fig. 8*).

Tabla 1. Clasificación jerárquica de las peptidasas objeto de estudio. (M) metaloendopeptidasa, (C) cisteinil-aminopeptidasa, (S) seril-aminopeptidasa. Tomado de *IUBMB Biochemical Nomenclature home page* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>).

Tipo	Clan	Familia	Nº EC	Enzima
M	MA	M1	3.4.11.2	APN , CD13, Alanil-aminopeptidasa de membrana, Aminopeptidasa microsomal, Aminopeptidasa M, Aminopeptidasa N, Aminopeptidasa unida a partículas, Amino-oligopeptidasa, Alanina aminopeptidasa, Aminopeptidasa de membrana I, Pseudoleucina aminopeptidasa, Aminopeptidasa específica de alanina, Cisteinilglicina-dipeptidasa, Cisteinilglicinasa, L-Alanil-aminopeptidasa, Aminopeptidasa neutra
			3.4.11.3	Cys-AP , CAP, Cistil-aminopeptidasa, Oxitocinasa, Cistina aminopeptidasa, L-Cistina aminopeptidasa, Peptidasa de oxitocina, Vasopresinasasa, P-LAP
			3.4.11.6	APB , Aminopeptidasa B, Arilamidasa II, Arginina aminopeptidasa, Arginil-aminopeptidasa, Arginina aminopeptidasa activada por Cl ⁻ , Aminopeptidasa citosólica IV, L-Arginina aminopeptidasa
			3.4.11.7	APA , Glu-AP, EAP, gp160, Aminopeptidasa A, Angiotensinasa A, Aspartato aminopeptidasa, Glutamil aminopeptidasa, Glutamato aminopeptidasa activada por Ca ²⁺ , Antígeno BP-1/6C3 de linfocitos B de ratón, Aminopeptidasa de membrana II, Aminopeptidasa MII, Angiotensinasa A2, L-aspartato aminopeptidasa
			3.4.11.14	PSA , Alanil-aminopeptidasa citosólica, Arilamidasa, Aminopolipeptidasa, Aminopeptidasa activada por tiol, Aminopeptidasa citosólica III, Aminopeptidasa de hígado humana, Aminopeptidasa sensible a la puromicina, Alanil-aminopeptidasa soluble, Alanina aminopeptidasa
	MH	M18	3.4.11.21	Asp-AP , Aspartil aminopeptidasa
C	CF	C15	3.4.19.3	PGI , Piroglutamilwpeptidasa I, 5-oxoprolil-peptidasa, Pirasa, Piroglutamato aminopeptidasa, Piroglutamil aminopeptidasa, L-piroglutamil péptido hidrolasa, Pirrolidona-carboxil-peptidasa, Pirrolidona-carboxil peptidasa, Pirrolidonil peptidasa, Piroglutamidasa, L-pirrolidonacarboxil peptidasa, Pirrolidonecarboxilil peptidasa
S	SC	S9	3.4.14.5	DPPIV , CD26, Dipeptidil-peptidasa IV, Dipeptidil aminopeptidasa IV, Xaa-Pro-dipeptidil-aminopeptidasa, Gly-Pro naftilamidasa, Postprolina dipeptidil aminopeptidasa IV, Antígeno de linfocito CD26, Glicoproteína GP110, Dipeptidil dipeptidasa IV, Glicilprolina aminopeptidasa, X-prolil dipetidil aminopeptidasa, Pep X, Antígeno de leucocito CD26, Glicilprolil dipeptidilaminopeptidasa, Dipeptidil- péptido hidrolasa, Glicilprolil aminopeptidasa, Dipeptidil-aminopeptidasa IV, DPPIV/CD26, Amino acil-prolil dipeptidil aminopeptidasa, Molécula Tp103 activadora de células T, X-PDAP
			3.4.21.26	PEP , Prolil oligopeptidasa, Enzima de actuación post-prolina, Endopeptidasa específica de prolina, Endopeptidasa post-prolina, Endoprolilpeptidasa, Prolil endopeptidasa

3.5.1. Aminopeptidasa neutra (APN)

La APN es una metaloproteína que pertenece a la familia M1 de aminopeptidasas, y el Zn^{2+} es el único metal divalente que interviene en su centro activo. Es una verdadera aminopeptidasa integral de membrana de tipo II (McLellan *et al.*, 1988; Riemann *et al.*, 1999). También se presenta altamente glicosilada, y con el centro activo orientado hacia el exterior celular. Así, esta ectoenzima suele aparecer descrita como un homodímero, con dos subunidades unidas no covalentemente, y un peso molecular aproximado de unos 150 kDa (Sjostrom *et al.*, 2000). A pesar de expresarse principalmente como enzima de membrana, en ocasiones, se puede encontrar de forma soluble en fluidos corporales tales como el plasma sanguíneo, la orina, el líquido seminal (Jung *et al.*, 1984; Erbezniak y Hersh, 1997; Antczak *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Ramón, 2011; Subirán *et al.*, 2011) y el LF, tal y como se ha demostrado en este trabajo. No obstante, se desconoce el mecanismo a través del cual la aminopeptidasa N es liberada de la membrana plasmática.

Su distribución es bastante amplia, es particularmente abundante en las membranas celulares del borde en cepillo del intestino delgado, el riñón y la placenta. También se encuentra presente en el hígado, si bien el mayor interés por esta enzima surgió con el descubrimiento de su participación en la hidrólisis e inactivación de encefalinas en el cerebro (Gros *et al.*, 1985a; Matsas *et al.*, 1985). Además, se ha descrito como implicada en la regulación de la actividad de algunos péptidos como encefalinas, angiotensinas, bradiquininas, citoquinas y quimocinas entre otras (Gros *et al.*, 1985b; Matsas *et al.*, 1985).

La acción de su hidrólisis libera el aminoácido del extremo amino terminal de péptidos que poseen entre 3 y 16 residuos de aminoácidos. Su acción es mayor cuando este aminoácido es alanina, a pesar de que también actúa cuando se encuentran otros aminoácidos, incluida la prolina (si bien en este caso la acción es mucho más lenta). La presencia de un residuo hidrofóbico seguido de prolina, provoca la hidrólisis intacta del dipéptido resultante (Barrett y McDonald, 1986). Además, hidroliza numerosos dipéptidos, pero no aquellos que contengan residuos aspartil, glutamil, histidil, glicil, prolil o valil en el extremo N-terminal (O'Cuinn, 1998).

El gen que codifica para esta enzima (ANPEP) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 15, ocupa 35 kb (Look *et al.*, 1989), y su expresión varía durante el crecimiento y la diferenciación celular (Sjostrom *et al.*, 2000). El papel biológico de esta enzima ha sido ampliamente descrito y se emplea como marcador histológico y/o de pronóstico en algunos tipos de cáncer (Bognerieder *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 2001; Hashida *et al.*, 2002). Además, se conoce su papel en el sistema inmune (Riemann *et al.*, 1999), así como su implicación en la angiogénesis (Bhagwat *et al.*, 2001). Se ha observado que la actividad óptima se da aproximadamente a pH 7 y es activada por la presencia de DTT. Además de los agentes metaloquelantes, los agentes tiol-reactivos, bestatina y particularmente la amastatina provocan la inhibición de la APN (O'Cuinn, 1998; Riemann *et al.*, 1999; Sjostrom *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2004).

3.5.2. Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)

Al igual que la APN, la PSA pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas. En este caso, es una sialoglicoproteína dependiente de Zn^{2+} , y aunque también se activa en presencia de Co^{2+} , en este caso, el complejo formado es menos estable. Es una enzima principalmente citosólica (Tobler *et al.*, 1997), lo que de forma clásica no sería consistente con su acción como enzima degradadora de péptidos bioactivos. Sin embargo, hay autores que proponen su participación en eventos proteolíticos esenciales para el crecimiento y la viabilidad celular (Constam *et al.*, 1995). En este sentido, Stoltze *et alii* (2000) consideran que las exopeptidasas y oligopeptidasas citosólicas tienen su papel en la degradación de oligopéptidos, incluyendo algunos péptidos antigénicos, resultantes del *turnover* proteico celular. No obstante, PSA ha sido detectada en forma soluble en cerebro bovino (Hersh y McKelvy, 1981) y en la presente Tesis también se ha descrito actividad en líquido folicular ovárico por lo que se cree que puede estar involucrada en el proceso reproductivo (Osada *et al.*, 2001a, 2001b).

Su presencia ha sido descrita mayoritariamente en el cerebro. También es abundante en intestino delgado, testículos (Tobler *et al.*, 1997) e hígado (Hiroi *et al.*, 1992), así como en músculo esquelético y riñón (De Souza *et al.*, 1991).

Su acción aminopeptidásica es bastante amplia. Hidroliza preferentemente residuos de alanina del extremo N-terminal de muchos oligopéptidos, siempre y cuando tengan menos de 13 aminoácidos, aunque también puede hidrolizar leucina, arginina, tirosina, fenilalanina y metionina, entre otros, con elevada afinidad (Taylor, 1993). Por el contrario, los péptidos que presentan prolina en última o anteúltima posición no se ven afectados por su acción (Dando *et al.*, 1997). Entre los sustratos de esta enzima, se encuentran las encefalinas, endorfinas y dinorfinas entre otros (Gros *et al.*, 1985a; McLellan *et al.*, 1988).

El gen que codifica para la PSA, denominado *NPEPPS*, se encuentra en el cromosoma 17 (17q21), ocupa 40 kb presenta 23 exones y 22 intrones (Thompson *et al.*, 1999). Al igual que otros miembros de la familia M1, es una metaloproteína de cadena simple, de aproximadamente 100 kDa. Su actividad máxima se da a pH 7,5 y es activada por compuestos como tiol e iones calcio (Haeggström, 2004). Es inhibida por EDTA 1,10-fenantrolina, amastatina, bestatina y puromicina entre otros (Mantle *et al.*, 1983; Dando *et al.*, 1997). La sensibilidad a la puromicina, así como su activación por tioles, son hechos diferenciales de la PSA frente a otras metalopeptidasas (Mantle, 1992).

3.5.3. Aminopeptidasa B (APB)

La aminopeptidasa B pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas, y al igual que otras enzimas de la misma familia, presenta un sitio de unión a Zn^{2+} (Suda *et al.*, 1976; Ocain y Rich, 1987). De acuerdo con su dependencia por este ión, su acción se ve inhibida por sustancias quelantes, así como, por inhibidores típicos de enzimas con acción peptidásica, entre ellos, bestatina, agentes tiol-reactivos, arfamenina A y B (Hopsu *et al.*, 1966; Cadel *et al.*, 1995; O'Cuinn, 1998; Foulon *et al.*, 2004). La actividad de esta enzima de 72 kDa es estimulada por iones clorados (Cl).

Su presencia ha sido mostrada en gran número de tejidos de mamíferos, si bien su nivel de expresión es diferente en los mismos (Foulon *et al.*, 1996). Se ha detectado APB en cerebro, páncreas, corazón, tejido testicular y líquido seminal entre otros (Cadel *et al.*, 1997; Taupenot *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2007; Ramón, 2011). En cuanto a su localización subcelular, inicialmente fue descrita como una proteína citosoluble, y posteriormente ha sido localizada en el retículo endoplasmático, e incluso como enzima de secreción en la matriz extracelular (Lauffart *et al.*, 1988; Tanioka *et al.*, 2003; Cadel *et al.*, 2004). Además, su actividad enzimática también ha sido medida en la fracción de membrana (Varona *et al.*, 2007).

El intervalo de pH en el que actúa esta exopeptidasa de aproximadamente 72kDa es bastante amplio, si bien desarrolla su actividad óptima alrededor de pH 7. Este hecho, junto con su ubicuidad, se presenta como argumento a favor de su adaptabilidad a diversos compartimentos subcelulares y su papel en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos. Algunos autores, la relacionan incluso con fenómenos como la maduración post-traducciona l y otros procesos reguladores en la membrana plasmática (Foulon *et al.*, 2004).

Su denominación como aminopeptidasa básica corresponde al hecho de que su acción libera los aminoácidos lisina o arginina del extremo amino terminal, siempre que el anterior aminoácido no sea una prolina (Gainer *et al.*, 1984; Cadel *et al.*, 1995). Así, entre sus sustratos naturales se encuentran las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, Ang III y kalidinas (McLellan *et al.*, 1988; Foulon *et al.*, 2004).

Al igual que otros genes que transcriben para enzimas con actividad peptidásica, el gen que transcribe para APB, *RNPEP* posee numerosos exones. Este gen, de 24 kb, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (Aurich-Costa *et al.*, 1997) y su producto final es una proteína monomérica cuyo extremo amino terminal podría actuar como péptido señal (Fukasawa *et al.*, 1996; Cadel *et al.*, 1997).

3.5.4. Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV)

La dipeptidil aminopeptidasa IV es una exopeptidasa empleada como marcador tumoral que pertenece a la familia S9 de peptidasas, en la que se engloba un grupo bastante variado de seril-aminopeptidasas. Pertenece al grupo denominado familia prolil oligopeptidasa por lo que es incapaz de hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos (Polgár, 2002). La acción de su hidrólisis libera un dipéptido del extremo amino terminal de algunos oligopéptidos y polipéptidos, siempre que el anteúltimo residuo corresponda a una prolina (o alanina aunque con menor afinidad) y el anterior no sea ni prolina ni hidroxiprolina (O'Cuinn, 1998; Pro y Dang, 2004). La identidad del último aminoácido no es crítica para la acción de esta enzima, siempre que tenga el grupo amino libre (Yoshimoto *et al.*, 1978).

Es una glicoproteína de membrana, que presenta un extremo amino terminal de tan sólo 6 aminoácidos hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y un gran dominio extracelular en el que se haya el centro activo. También se ha visto, que en ocasiones, la pérdida del extremo amino terminal insertado en la membrana, puede originar su presencia en forma soluble en suero humano, líquido cerebroespinal, líquido seminal y otros fluidos coporales (Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Carl-McGrath *et al.*, 2006; Ramón, 2011). Se ha descrito que esta enzima está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimocinas (Havre *et al.*, 2008) y además de su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune, esta aminopeptidasa tendría especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi *et al.*, 1990).

Se ha observado la presencia de DPPIV en diversos tejidos. En algunos de ellos, su presencia tiene lugar en una proporción bastante elevada, como en el riñón, intestino delgado o placenta. En otros tejidos se ha localizado en menor concentración, como en la lengua o en el hígado, mientras que en el corazón, páncreas y cerebro, su presencia es bastante menor. Estos diferentes niveles de expresión estarían relacionados con una característica de los genes que codifican para algunas seril-proteasas (Rawlings *et al.*, 1991), y es el hecho de que el gen *DPP4* (2q24.3) (Abbott *et al.*, 1994) presente múltiples exones, hasta el extremo de que los aminoácidos que codifican para el centro activo se encuentren en 2 exones diferentes. Así, incluso se ha descrito que la mutación de un solo aminoácido de este centro activo provoca que, una vez sintetizada en el retículo endoplásmico, la DPPIV no migre hasta la membrana plasmática y sea degradada rápidamente (Tsuji *et al.*, 1992).

A nivel bioquímico, se puede mencionar que esta seril-aminopeptidasa tiene una actividad óptima a pH 7,8 y que posee un peso molecular de aproximadamente 110 kDa en su forma madura glicosilada. Puede ser inhibida por fluoruro de fenilmetilsulfonilo, diprotina A, bacitracina, puromicina y por los agentes thiol- reactivos: p-cloromercuribenzoato y N-etilmaleimida (O'Cuinn, 1998; Kikkawa *et al.*, 2005).

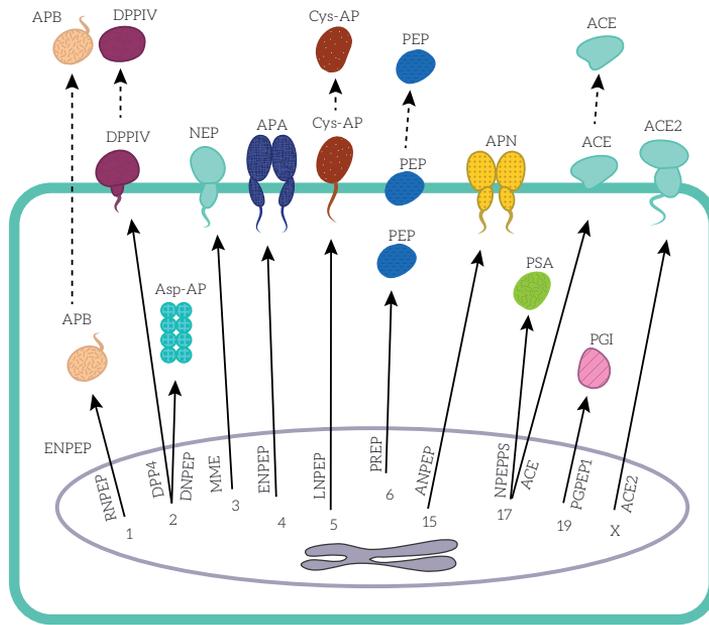


Figura 8. Representación gráfica de las peptidasas. Localización celular (soluble en el citoplasma, de membrana o extracelular), cromosoma en el que se encuentra el gen que las codifica, así como la denominación del mismo (Blanco, 2010).

3.5.5. Aminopeptidasa A (APA)

La APA es una metalopeptidasa de 160kDa que pertenece a la familia M1 de las aminopeptidasas. Su denominación como aminopeptidasa ácida corresponde al hecho de que esta ectopeptidasa libera aminoácidos ácidos del extremo amino terminal. De hecho, hidroliza principalmente residuos glutamilo, aunque también puede hidrolizar con menor especificidad residuos aspartilo (Glenner *et al.*, 1962; Wang *et al.*, 2004). Inicialmente la Asp-AP y la APA se describieron como una misma enzima, pero al avanzar el conocimiento sobre ellas, se descubrió que tenían características propias, y actualmente se clasifican en diferentes familias (Wilk y Thurston, 1990). Se ha descrito la expresión de APA en linfocitos B de ratón, siendo idéntica a la BP-1/6C3 y empleada como antígeno marcador de diferenciación.

Es una proteína de membrana tipo II, y al igual que otras metalopeptidasas, presenta un sitio de unión a Zn^{2+} orientado hacia el exterior celular. En mamíferos, ha sido descrita como una enzima con dos subunidades de un peso molecular aproximado de unos 140 kDa cada una (Wang *et al.*, 2004). Aunque se clasifica como una enzima de membrana, su actividad enzimática también ha sido descrita tanto en la fracción soluble como en suero. En este último caso, su liberación al medio extracelular es consecuencia de la hidrólisis de proteínas de membrana (Carrera *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2006). La APA desarrolla su actividad óptima alrededor de pH 7,2 y es activada por la presencia de iones Ca^{2+} . Dentro de sus inhibidores los más importantes son los agentes quelantes (EDTA, EGTA y 1,10-fenantrolina), así como los metales divalentes (Zini *et al.*, 1996).

La Aminopeptidasa A se expresa en muchos tejidos, especialmente en el cerebro, el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal y renal, y en el endotelio vascular (Lojda y Gossrau, 1980; Marchio *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2006; de Mota *et al.*, 2008). Un conocido sustrato de esta enzima es la Ang II, octapéptido que resulta ser también un importante regulador de la presión sanguínea (Marchio *et al.*, 2004; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007). Además, la APA ha sido relacionada con numerosos tipos de neoplasias, entre ellas, de próstata, de útero, de riñón y células escamosas de cabeza y cuello, así como con el linfoma (Fujimura *et al.*, 2000; Ino *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2009).

En humanos, el gen que codifica para la APA, *ENPEP*, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, ocupa 100 kb y posee 20 exones, así como numerosos intrones (Vazeux *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

3.5.6. Cistil aminopeptidasa (Cys-AP)

Esta enzima es una sialoglicoproteína, que como la APN, PSA, APB y APA pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas. Su presencia de forma soluble en suero de mujeres embarazadas ha sido descrita desde hace más de 50 años, si bien posteriormente se ha descubierto su presencia como proteína transmembrana de tipo II, no solo en placenta, sino también en otros tejidos tales como cerebro, corazón, riñón, colon, próstata, ovario y músculo esquelético (Keller *et al.*, 1995; Rogi *et al.*, 1996; Laustsen *et al.*, 1997; Czech y Corvera, 1999; Moeller *et al.*, 1999; Demaegdts *et al.*, 2004).

En su forma transmembranal presenta un dominio citoplasmático, un pequeño dominio transmembrana y un dominio de mayor tamaño en la cara externa de la célula (Rogi *et al.*, 1996; Laustsen *et al.*, 1997). En esta forma, la Cys-AP ha sido identificada como el receptor AT4, que une Ang IV inhibiendo la actividad enzimática del receptor. Su conversión en enzima sérica durante el embarazo corresponde a la acción de metaloproteasas, que por su acción catalítica liberan el dominio carboxilo terminal (Nomura *et al.*, 2005).

Su acción provoca la liberación de una cisteína del extremo amino terminal de un amplio espectro de sustratos, tales como oxitocina, vasopresina, somatostatina y Ang III (Sjoholm y Yman, 1967; Mitsui *et al.*, 2004). La cistinil-aminopeptidasa es la única aminopeptidasa de membrana descrita como degradadora de oxitocina, por lo que se le suele denominar oxitocinasa. También libera otros aminoácidos neutros o básicos, dependiendo de la identidad del siguiente aminoácido y de la longitud del péptido (Nomura *et al.*, 2005).

Además de en el mantenimiento de la homeostasis durante el embarazo (Rogi *et al.*, 1996), se ha visto involucrada en muchos procesos fisiopatológicos, incluyendo algunos procesos tumorales (Ito *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003). Es también una de las múltiples proteínas relacionadas con el metabolismo de la insulina, se ha descrito que dicha hormona regularía los mecanismos de translocación de Cys-AP (Sumitani *et al.*, 1997).

Como otras metalopeptidasas, su actividad es inhibida por agentes quelantes, como 1,10- fenantrolina, cationes divalentes, amastatina, bestatina y puromicina, estos dos últimos en menor medida (Kandror *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2004). Su actividad es óptima a pH 7,4 y poseen un peso molecular de 160 kDa. Los 18 exones y 17 intrones que constituyen el gen *LNPEP* que codifica para esta enzima, se encuentran en el cromosoma 5.

3.5.7. Prolil endopeptidasa (PEP)

Junto a la DPPIV, la PEP es una enzima perteneciente a la familia S9 de las peptidasas del Clan SC. Esencialmente, se trata de una peptidasa citosólica que ha sido descrita además, como enzima de membrana y también en líquidos corporales, siendo más abundante en plasma que en suero (Gotoh *et al.*, 1988; Oleary *et al.*, 1996; Momeni *et al.*, 2003; Szeltner y Polgar, 2008).

Esta endopeptidasa posee la capacidad de hidrolizar péptidos en el residuo prolina interno, de su extremo carboxilo unido al péptido (Gass y Khosla, 2007). Inicialmente se descubrió su presencia en el útero, como enzima degradadora de oxitocina (Walter *et al.*, 1971), y en la actualidad se conoce su acción sobre otros péptidos bioactivos. Así, rompe específicamente la unión prolina, en péptidos tales como, sustancia P, vasopresina, neurotensinas, angiotensinas I y II, dinorfinas, bradiquininas, TRH, hormona liberadora de de hormona luteinizante (LHRH) y hormona estimuladora de alfa-melanocitos (Welches *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 2004; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007; Myohanen *et al.*, 2011). Al pertenecer a la familia prolil oligopeptidasa no es capaz de hidrolizar moléculas de mayor tamaño, por lo que su especificidad viene dada no sólo por la presencia del aminoácido prolina en la penúltima posición del extremo carboxilo terminal, sino que también viene determinada por el peso de la molécula (Polgár, 2002).

La prolil endopeptidasa se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, localizándose principalmente en cerebro, músculo, testículo, riñón y glándula submaxilar (Goossens *et al.*, 1996a; Gass y Khosla, 2007; Myohanen *et al.*, 2009). Respecto a sus posibles funciones, se cree que participa en la regulación del metabolismo de las sustancias peptídicas mencionadas, y que su acción podría estar relacionada con el aprendizaje, la memoria, el estado de ánimo y otros procesos neurológicos (Li *et al.*, 1996; Morain *et al.*, 2000, 2007; Agirregoitia *et al.*, 2003b). A nivel reproductivo, se ha involucrado a PEP con la meiosis de los espermatoцитos, la diferenciación de las espermátidas, y motilidad de los espermatozoides (Kimura *et al.*, 2002).

Se trata de una peptidasa monomérica de aproximadamente 75 kDa, cuya actividad resulta óptima en un pH entorno a 7,5. El incremento de dicha actividad es posible con NaCl, potasio, fosfato e iones nitrato. Por el contrario, resulta inhibida con Z-thio-prolina-thioprolinal (Gass y Khosla, 2007). El gen *PREP*, que codifica para la enzima PEP, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 6, descrito por Goossens (1996a, 1996b).

3.5.8. Aspartil aminopeptidasa (Asp-AP)

Asp-AP es una metalopeptidasa de la familia M18. Esta enzima constituye más del 0,1% de las proteínas citosólicas solubles de varios tejidos, por lo que debería ser considerada como la principal peptidasa intracelular. Sin embargo, además de su descripción como enzima citosólica, se ha encontrado actividad aspartil-aminopeptidasa ligada a la membrana (Ramirez-Expósito *et al.*, 2000; Varona *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2009). Al igual que otras peptidasas citosólicas, posee elevado peso molecular y se presenta en forma de oligómero, en este caso 8 subunidades idénticas de 53 kDa cada una.

Su elevada concentración y su amplia distribución sugieren un papel importante en el proceso final del metabolismo intracelular de péptidos y proteínas, de forma coordinada con el proteosoma y otras peptidasas (Wilk *et al.*, 1998, 2002). Sin embargo, se cree que podría tener otras funciones más especializadas en base a que interviene en el metabolismo de péptidos biológicamente activos, tales como Ang II, colecistoquinina-8 ó neuropéptido-K (Kelly *et al.*, 1983; Wilk *et al.*, 1998). Su acción radica en la hidrólisis de ácido glutámico, o aspártico (preferentemente) del extremo amino terminal, con preferencia de la presencia de aminoácidos neutros o hidrofóbicos en la siguiente posición. El gen que codifica para esta enzima (*DNPEP*) está ubicado en el cromosoma 2, y su secuencia se encuentra altamente conservada, siendo la única peptidasa de la familia M18 que se ha descrito en mamíferos. Como en el caso de otras metalopeptidasas, su acción es inhibida por EDTA, 1,10-fenantrolina y DTT (Sanderink *et al.*, 1988; O'Cuinn, 1998), y activada por Ca^{2+} . Su pH óptimo se encuentra en 7,5 (Wilk *et al.*, 2004).

3.5.9. Piroglutamil-peptidasa I (PGI)

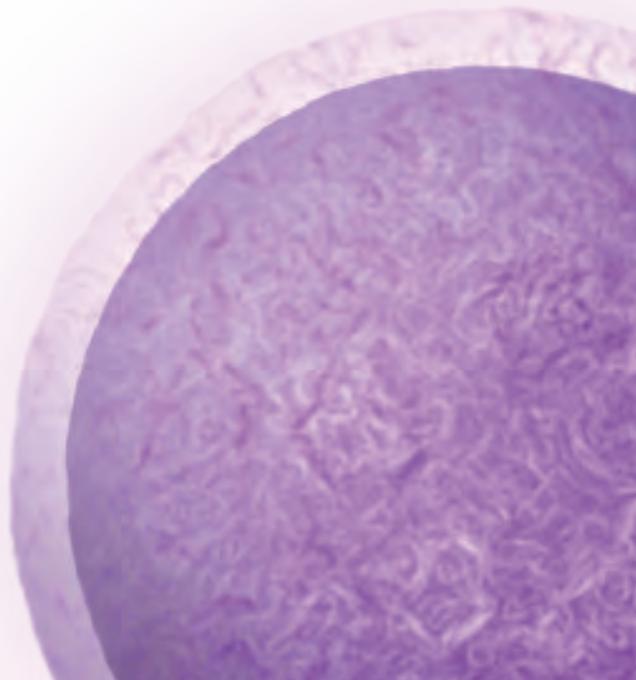
Esta enzima pertenece a la familia C15 de las peptidasas del Clan CF que implica la presencia de una cisteína en el centro activo. Es una peptidasa principalmente citosólica, no obstante, también ha sido descrita a nivel de membrana plasmática (Alba *et al.*, 1995). Junto con la piroglutamil peptidasa II (peptidasa de membrana), constituye el grupo de enzimas que liberan residuos piroglutamil en el extremo N-terminal de péptidos que contienen entre dos y treinta aminoácidos (O'Cuinn, 1998; Dando *et al.*, 2003). A pesar de esta característica común, ambas enzimas pertenecen a clanes diferentes, si bien en un principio se pensó que podría tratarse de la misma enzima.

Su acción provoca la inactivación de péptidos biológicamente activos que contengan piroglutamina en el extremo amino terminal. Así, la neurotensina, la LHRH, la TRH, la bombesina y la leucopirokinesina se encontrarían entre sus sustratos naturales (Mantle, 1992; Awade *et al.*, 1994; Schmitmeier *et al.*, 2002). Por otra parte, dado que la piroglutamina libre posee su propia acción biológica, y teniendo en cuenta su posible relación con enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la pérdida de memoria, algunos autores proponen también un sistema de regulación que implique el mantenimiento del *pool* de piroglutamina libre además de la inactivación de péptidos entre las funciones de esta enzima (Grioli *et al.*, 1990; Cummins y O'Connor, 1998). La eficacia catalítica de

PGI depende en gran medida del aminoácido al que se une la piroglutamina, requiriendo para la misma la presencia de grupos reductores de tioles como DTT, 2-mercaptoetanol o tris(carboxietil)fosfina.

PGI se encuentra ampliamente distribuida en el organismo y su función biológica real puede depender, en gran medida, del tipo de tejido en el que resida. Ha sido descrita mayoritariamente en cerebro y sistema digestivo (Szewczuk y Kwiatkow, 1970), presentando, al menos en ratas, un papel importante para el correcto desarrollo del sistema nervioso central (de Gandarias *et al.*, 2000a, 2000b). También en ratas, se han hallado cambios en la actividad de esta enzima en la corteza cerebral a lo largo de las distintas etapas de su desarrollo (O'Cuinn *et al.*, 1990; Agirregoitia *et al.*, 2007). De igual modo, ha sido referida su presencia en fluidos de secreción como el semen humano (Valdivia *et al.*, 2004). Es una enzima monomérica, de tan solo 24 kDa, cuya actividad resulta óptima a pH 8,5. El gen que la codifica (*PGPEP1*) se localiza en el cromosoma 19p13, consta de cinco exones de los cuales los exones 1-4 y parte del exón 5 se traducen en una proteína que contiene 209 aminoácidos, con un dominio de peptidasa C15 y una tríada catalítica de tres aminoácidos altamente conservada (Abe *et al.*, 2004; Monsuur *et al.*, 2006).

II. OBJETIVOS



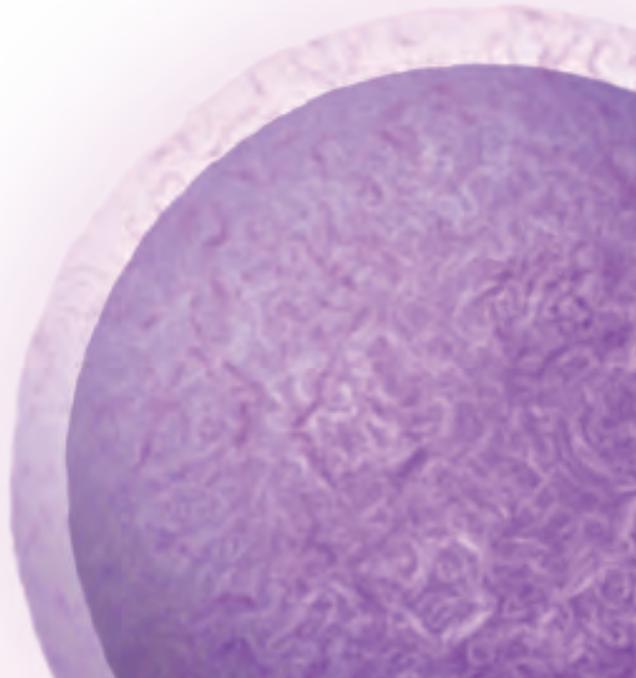
El grupo de investigación de Fisiología Celular (dentro del departamento de Fisiología de la Universidad del País Vasco/EHU) lleva desde el año 1986 estudiando la regulación de diversos sistemas peptidérgicos a partir de su degradación por medio de peptidasas. Inicialmente, se analizó el metabolismo de los neuropéptidos en distintos procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central, ampliándose posteriormente a otros órganos y sistemas. Como se ha presentado en el apartado de Introducción, mediante ensayos sobre integración neuroendocrina, llegamos a proponer un nuevo sistema no cerrado de regulación de la liberación de GnRH y gonadotropinas en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, sugiriendo un importante papel del sistema opioide en el mismo. A partir de estos estudios, surgieron varias líneas de investigación, siendo hoy en día dos las prioritarias: una rama centrada en el estudio del metabolismo peptídico en la reproducción y otra centrada en el desarrollo celular. Tras varios años de experimentación con modelos animales y tejidos humanos, los resultados obtenidos sugieren que las peptidasas están relacionadas con la fertilidad, el desarrollo neoplásico y el envejecimiento de diversos tejidos (de Gandarias *et al.*, 1993, 1994b, 1996, 1999b, 2000b; Irazusta *et al.*, 2002, 2004; Agirregoitia *et al.*, 2003, 2012; Valdivia *et al.*, 2004; Subirán *et al.*, 2008, 2012; Pérez *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2010; Larrinaga *et al.*, 2011a, 2012; Ramón, 2011; Roméu *et al.*, 2011, 2012, 2013, 2014; Peralta, 2012).

La gran mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha que estudian la influencia de la actividad peptidásica en la fertilidad humana se centran en el varón, concretamente en el eyaculado (Fernández *et al.*, 2002). De hecho, se han conseguido hallazgos significativos respecto a la movilidad espermática (Irazusta *et al.*, 2004; Agirregoitia *et al.*, 2006; Subirán *et al.*, 2011). No obstante, existe un gran desconocimiento sobre el papel que juegan las peptidasas en el aparato reproductor femenino. En esta Memoria se ha tratado de aportar claridad a dicho punto ya que se ha descrito y analizado la actividad peptidásica en el líquido folicular de mujeres sometidas a fecundación *in vitro*. Si la composición bioquímica del LF pudiera pronosticar el estado fértil de la mujer, podríamos considerarla un indicador de fertilidad fácil, repetitivo y fiable. Los resultados obtenidos no sólo podrían ayudar a definir la importancia del metabolismo peptídico en la fertilidad femenina (a nivel de calidad folicular y ovocitaria) sino que además podrían optimizar los actuales tratamientos de reproducción asistida.

Así, los objetivos propuestos para este trabajo han sido los siguientes:

1. Comparar los resultados clínicos de un grupo de pacientes sin problemas de fertilidad femenina con los obtenidos en un conjunto de mujeres con patologías reproductivas. De este modo se pretende observar si existe algún tipo de variación respecto a:
 - La respuesta a la estimulación farmacológica
 - El desarrollo evolutivo del ciclo de fecundación *in vitro*
 - La consecución o no de embarazo
2. Describir los niveles de actividad enzimática de nueve peptidasas en la fracción soluble del líquido folicular humano. La mayoría de los enzimas ensayados (excepto la DPPIV) sería la primera vez que se presentan en este tipo de muestra biológica.
3. Estudiar las modificaciones de actividad folicular que pudieran producirse en función de la edad materna o del tipo de infertilidad reproductiva que padeciese la paciente. Para así comprobar el posible papel pronóstico-diagnóstico de los enzimas proteolíticos ensayados.
4. Correlacionar la actividad peptidásica con diferentes parámetros clínicos de fertilidad, tales como: nivel de estradiol sérico, número total de ovocitos, tasa de madurez ovocitaria, porcentaje de fecundación y consecución de embarazo. Obteniendo de esta manera información sobre cómo afecta la actividad de los nueve enzimas analizados sobre la evolución del tratamiento y su teórica implicación en el resultado final del ciclo de fecundación *in vitro*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIAL

En este trabajo se han empleado los aparatos, soluciones, reactivos y productos que aparecen en la *Tabla 2*. Los medios de lavado y cultivo referentes al procesado tanto de gametos como de embriones son estándar y pertenecen a la serie G5 Series™ (Vitrolife, Göteborg, Suecia).

Tabla 2. Aparatos, soluciones, reactivos y productos. (I) Aparatos. Se representa el modelo y marca del aparato **(II)** Soluciones y su composición, (v/v) volumen/volumen, (p/v) peso/volumen. **(III)** Reactivos y productos. Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen.

(I) Aparatos	Modelo. Marca
Centrífuga	Labofuge 200. Heraeus
Inmunoanalizador	Mini Vidas. BioMérieux
Ecógrafo	SSD-620. Aloka
Cabina de flujo laminar	L 126 Dual. K system
Estereomicroscopio - lupa	SMZ 1000. Nikon
Incubador	C 200. Labotect
Incubador	C 60. Labotect
Centrífuga	203. Sigma
Frigorífico	TS-136.3, -18 °C. Teka
Equipo de micromanipulación	IM 188. Narishige Nikon
Ultracongelador	MDF-U5 186 S, -86 °C. Sanyo
Ultracentrífuga	Centrikon T2070, 4 °C. Kontron
Estufa	Hotcold S, 37 °C. Selecta
Espectrofluorímetro	RF-540. Shimadzu
pH-metro	Micro-pH 2002. Crison
Mezclador magnético termoestable	Agimatic-s. Selecta
Homogeneizador Ultraturrax	Miccra D1. ART
Rotor de ángulo fijo	TFT 45.6. Kontron
Balanza de precisión	R180D. Sartorius

(II) Soluciones	Composición
Tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 7,4)	1000 ml H ₂ O 24,22 g TRIZMA-base
Solución homogeneización, Tris-HCl 10 mM	5 % Tris-HCl 0,2 M
Tampón Fosfato 0,1 M (pH 7,4)	18,7 ml A + 81,3 ml B
Fosfato A	1000 ml H ₂ O 27,6 g NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O 0,2 M
Fosfato B	1000 ml H ₂ O 28,4 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 M
Tampón Acetato 0,1 M (pH 4,2)	36,8 ml A + 13,2 ml B + 50 H ₂ O
Acetato A	1000 ml H ₂ O 11,55 ml CH ₃ COOH 0,2 M
Acetato B	1000 ml H ₂ O 27,22 g CH ₃ COONa•3H ₂ O 0,2 M

(III) Reactivos y productos	Proveedor Ciudad, País
Cys-β-naftilamida pGlu-β-naftilamida Glu-β-naftilamida H-Gly-Pro-β-naftilamida Z-Gly-Pro-β-naftilamida	Bachem Bubendorf, Suiza
Ácido Etilen-diamino tetracético (EDTA) Cloruro de Manganeso (MnCl ₂) Acetato sódico trihidratado (CH ₃ COONa•3H ₂ O) Fosfato sódico dibásico (NaH ₂ PO ₄) Fosfato sódico monobásico monohidrato (Na ₂ HPO ₄) Cloruro sódico (NaCl)	Merck Darmstadt, Alemania
Ala-β-naftilamida Arg-β-naftilamida Asp-AP-β-naftilamida Ácido piroglutámico- β-naftilamida Seroalbúmina bovina(BSA) Dimetil-sulfóxido (DMSO) DL-ditiotreitrol (DTT) Cloruro cálcico (CaCl ₂) Puromicina Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-base)	Sigma-Aldrich Steinheim, Alemania
Ácido acético (CH ₃ COOH)	Probus Badalona, España
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac Barcelona, España

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de estudio y criterios de inclusión

Se trata de un estudio prospectivo y observacional, donde las muestras biológicas analizadas proceden de pacientes seleccionadas y diagnosticadas en la Unidad de Reproducción Asistida Quirón Zaragoza. Dadas las implicaciones éticas y relativas a los derechos de los pacientes, el proyecto al cual está asociado este trabajo está aprobado por el Comité Ético de Grupo Hospitalario Quirón Zaragoza a fecha de 1 de junio de 2008.

Se incluyeron en el estudio aquellas mujeres con una edad comprendida entre los 20 y los 48 años que fueran a ser sometidas a un tratamiento de FIV o bien realizaran una donación de óvulos, en cuyo caso la franja de edad se situó entre los 20 y los 31 años. Así mismo, resultó imprescindible que la paciente otorgase libremente su consentimiento informado antes de ser incluida en el estudio (1. Anexo; pág. 169).

2.1.1. Grupos de estudio

Al final del proyecto se analizaron un total de 117 muestras de líquido folicular, distinguiendo dos grandes grupos:

- **Grupo Control (G.C.):** compuesto por 72 muestras procedentes de donantes de óvulos o mujeres cuyo problema reproductivo era exclusivamente el factor masculino severo. Otro conjunto de estudio fue el denominado **Grupo Fértil (FERT)**, formado por 38 muestras pertenecientes al Grupo Control. Debido a la edad de las mujeres que conforman el Grupo Fértil, este será considerado como nuestro grupo control por excelencia.
- **Grupo Infértil (G.I.):** compuesto por 45 muestras procedentes de mujeres diagnosticadas de una única patología reproductiva. Las infertilidades seleccionadas fueron: síndrome de ovario poliquístico, endometriosis ovárica, factor tubárico y esterilidad sin causa aparente.

Estos dos grupos se dividieron en distintos subconjuntos en función del objetivo que perseguimos en cada uno de las secciones que componen esta Memoria. Por un lado, en el apartado 1 de Resultados (Análisis de los Resultados Clínicos) tanto el G.C. como el G.I. se fraccionaron en dos subgrupos según el resultado final del ciclo de FIV (embarazo o no). Por otro lado, en el subapartado 1.3 de Resultados (Tasa de embarazo por transferencia) y apartado 2 de Resultados (Análisis de la Actividad de las Peptidasas) el G.C. se dividió en cinco subgrupos según cinco rangos de edad materna, mientras que en el G.I. se establecieron cuatro subgrupos que correspondían a cada una de las patologías estudiadas. Más concretamente, en el subapartado 2.2 de Resultados (Grupo Fértil: correlación clínica) sólo se tuvo en cuenta el Grupo Fértil. Todas estas clasificaciones aparecen detalladas en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Clasificación de los subgrupos de estudio pertenecientes al Grupo Control y Grupo Infértil.
(A) Según el apartado 1 de Resultados, **(B)** Según el subapartado 1.3 de Resultados y el apartado 2 de Resultados y **(C)** grupo analizado en el subapartado 2.2 de Resultados.

GRUPO CONTROL (G.C.)	
(A)	Embarazo No embarazo
(B)	G1: 20-24 años G2: 25-29 años G3: 30-34 años G4: 35-39 años G5: ≥ 40 años
(C)	*Grupo Fértil (FERT): formado por G1, G2 y G3

GRUPO INFÉRIL (G.I.)	
(A)	Embarazo No embarazo
(B)	SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico END: Endometriosis ovárica FT: Factor Tubárico ESCA: Esterilidad Sin Causa Aparente

2.2. Metodología del tratamiento de FIV

Estimulación ovárica controlada

Se utilizaron dos protocolos con agonistas de la GnRH, aplicándose uno u otro en función de las características de cada paciente:

- **Protocolo largo:** hacía el día 21 de ciclo se administró un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (Decapeptyl, Laboratorios Lasa o Synarel, Laboratorios Pfizer) para, a partir de los primeros días del ciclo menstrual, administrar FSH recombinante (FSHr; Gonal F, Merck-Serono), ajustando la dosis según la respuesta folicular. En los casos en los que fue necesario, se suplementó la estimulación con LH recombinante (LHr; Luveris, Merck- Serono).
- **Protocolo corto:** durante los primeros días de la regla se administró el análogo de la GnRH así como FSHr, ajustando la dosis según la respuesta folicular. De nuevo, si resultó necesario, la estimulación se suplementó utilizando LHr.

En ambos protocolos el control del crecimiento folicular se realizó mediante controles ecográficos periódicos (Aloka) así como con la determinación del estradiol sérico (BioMérieux). La última medición de estas dos variables se realizó dos días antes de la captación ovocitaria, momento en el que la mayoría de los folículos había alcanzado los 17-18 mm de diámetro y en el que se pautó la descarga ovulatoria mediante la administración subcutánea de gonadotropina coriónica humana (hCG) recombinante (Ovitrelle 250 mg, Merck-Serono).

Punción o captación ovocitaria

36 horas después de la administración de la hCG se llevó a cabo la captación, que consiste en puncionar el ovario mediante ecografía vaginal (Aloka) y aspirar el líquido folicular.

En la cabina de flujo laminar (K-system) del laboratorio de embriología los óvulos se identificaron y aislaron del líquido folicular (Nikon), posteriormente se lavaron y se depositaron en su correspondiente placa de incubación. Placa que se introdujo en un incubador biológico (Labotect) con unas condiciones de temperatura, CO₂, O₂ y humedad controladas, semejantes a las de las trompas de Falopio. La fase lútea se suplementó con progesterona micronizada (Utrogestan 200 mg, Laboratorios Seid).

Fecundación, seguimiento y clasificación de la evolución embrionaria

Las muestras seminales se sometieron a una capacitación espermática (Sigma). Práctica que consiste en seleccionar los espermatozoides con mejor motilidad, a la vez que se eliminan los detritus y el plasma seminal. Posteriormente, y según

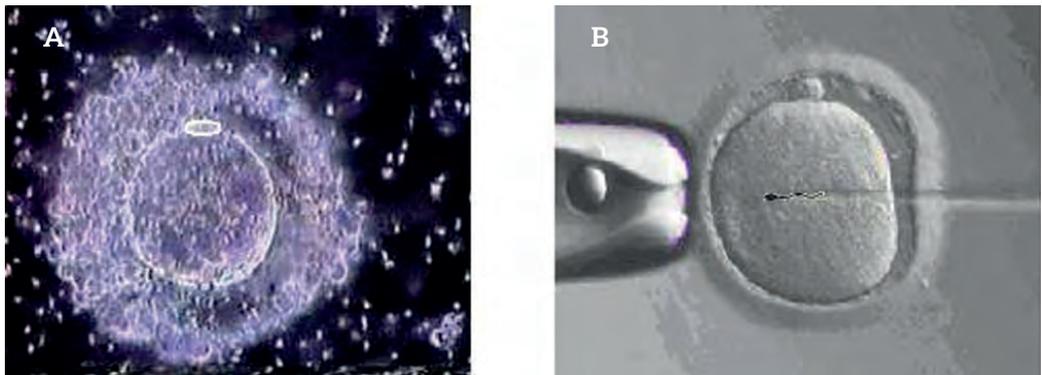


Figura 9. Técnicas de reproducción asistida. (A) FIV-Convencional, se observa el COC rodeado por una nube de espermatozoides. **(B) FIV-ICSI**, gracias a la ayuda de un micromanipulador en el interior del ovocito se deposita un único espermatozoide.

las características reproductivas de cada pareja, se realizó FIV-Convencional o FIV-ICSI (Narishige Nikon), técnicas que aparecen descritas en el subapartado 2.3 de la Introducción así como en la *Figura 9*.

Al día siguiente de la punción ovocitaria (día D+1) se determinó el número de óvulos fecundados correctamente. En los días de cultivo sucesivos (día D+2 y día D+3) se valoró el número de embriones evolutivos así como su calidad.

En nuestro centro seguimos los criterios de clasificación morfocinética marcados por la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) (Ardoy y Calderón, 2008), la cual establece cuatro categorías embrionarias en función del potencial implantatorio esperado (*Tabla 4*). Se consideran embriones de buena calidad, óptimos para transferir, aquellos que en D+3 se encuentran en categoría A o B.

Tabla 4. Calidad embrionaria según criterios ASEBIR (adaptado de Ardoy *et al.*, 2008)

CATEGORÍA

- A:** Embrión de óptima calidad. Máxima capacidad de implantación
- B:** Embrión de buena calidad. Elevada capacidad de implantación
- C:** Embrión regular. Probabilidad de implantación media
- D:** Embrión de mala calidad. Probabilidad de implantación baja

Transferencia embrionaria

Aproximadamente 3 días después de la captación (D+3) se realizó la transferencia embrionaria. A través del cérvix y bajo control ecográfico se depositaron hasta un máximo de tres embriones en el fondo del saco uterino de la paciente. El número de embriones transferidos varió en función de: la edad ovocitaria, el tipo de esterilidad, la calidad embrionaria y el número de transferencias previas sin conseguir gestación. En caso de existir embriones viables sobrantes, estos se almacenarán mediante congelación (Ley_14/2006, 2006).

Prueba de embarazo

14 días después de la transferencia embrionaria la paciente se realizó un test de embarazo para determinar la presencia de hCG en suero (BioMérieux) y así verificar la posible gestación. El embarazo se definió como la existencia de una concentración de β -hCG sérica > 2 UI/L (BioMérieux, 2010a).

Se denomina ciclo de FIV al periodo comprendido entre el inicio del tratamiento reproductivo hasta la finalización del mismo. Es decir, si quedan embriones almacenados hasta que todos estos no sean descongelados no se considerará fin de ciclo.

2.3. Material biológico utilizado

2.3.1. Muestras de plasma sanguíneo

El día en el que se pautó la descarga ovulatoria (dos días antes de la punción ovárica) se realizó la última medición de estradiol sérico.

Para la determinación de los niveles del estrógeno se le extrajo a cada paciente 4,9 ml de sangre y se realizó la separación del plasma sanguíneo mediante una centrifugación a 3000 xg durante 10 minutos (Heraeus). El sobrenadante resultante correspondió al plasma, que fue la fracción que se utilizó. Se pipetearon 200 μ l de la muestra en un pocillo de un cartucho específico del inmunoanализador Mini Vidas. El principio de la determinación asocia el método por competición con una detección final por fluorescencia denominado *Enzyme Linked Fluorescent Assay*.

Se utilizó un cono (SPR[®]) de un solo uso que sirvió a la vez de fase sólida y de sistema de pipeteo. El resto de los reactivos de la reacción inmunológica se encontraban distribuidos a lo largo del cartucho y listos para su empleo. Todas las etapas de la prueba se realizaron automáticamente por el sistema y se basaron en una sucesión de ciclos de aspiración / expulsión del medio de reacción.

El análisis automático consiste en los siguientes pasos: la muestra es transferida al pocillo que contiene el conjugado, el cual es un derivado de estradiol marcado con la fosfatasa alcalina. En el momento en el que el medio es aspirado por el cono tiene lugar una competición entre el estradiol presente en el suero y el derivado de estradiol del conjugado frente a los sitios de unión del anticuerpo

específico anti-estradiol fijado sobre el cono. Las etapas de lavado eliminan los componentes no fijados. Durante la etapa final de revelado, el sustrato (4-Metil umbeliferil fosfato) es aspirado y después expulsado del cono; el enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en un producto (4-Metil umbeliferona) cuya fluorescencia emitida es medida a 450 nm. El valor de la señal de fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración del antígeno presente en la muestra.

Al finalizar la determinación, los resultados fueron calculados automáticamente por el sistema respecto a una curva de calibración memorizada. Los valores de concentración se expresaron en pg de 17 β -estradiol total / mL de plasma (BioMérieux, 2010b).

2.3.2. Muestras de líquido folicular

Durante la punción ovárica y una vez aspirado el primer folículo, el contenido de éste fue transportado rápidamente al laboratorio de embriología para comprobar la presencia del óvulo en el LF. Tras recuperar el ovocito y guardarlo en el incubador correspondiente, el líquido folicular fue aislado y almacenado a -86°C (Sanyo) hasta la fecha del ensayo.

Para su procesamiento los LFs fueron primero descongelados y, con el fin de eliminar posibles impurezas, se centrifugaron a 3000 xg y 4°C durante 5 minutos en una centrífuga Centrikon T2070 empleando el rotor TFT 45.6. A continuación se retiró el sobrenadante, muestra sobre la que se realizó la determinación de las actividades enzimáticas específicas (Fig. 10).

Destacar que ningún LF presentó signos de contaminación sanguínea y que durante todo este proceso las muestras se mantuvieron a 4°C , permaneciendo a dicha temperatura hasta el momento de su incubación.

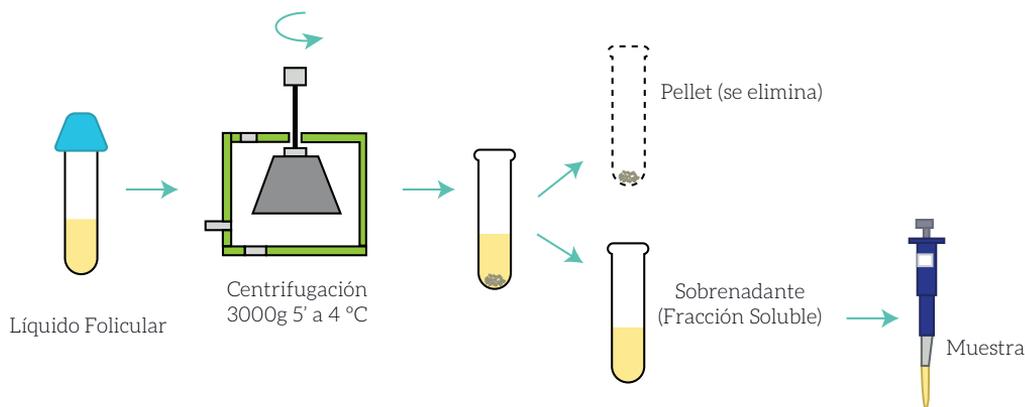


Figura 10. Esquema del procesamiento de la muestra de líquido folicular. Para el estudio de actividad peptidásica se utilizó la fracción soluble representada.

2.4. Análisis de la actividad peptidásica en líquido folicular

2.4.1. Determinación de la actividad

La concentración de una enzima en un tejido o líquido puede determinarse midiendo la velocidad de una reacción catalizada por la enzima en cuestión. Para ello, puede calcularse la disminución en la concentración de sustrato en el tiempo o el incremento que con el tiempo se produce en algunos de los productos de reacción.

Los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido, sin lugar a dudas, los derivados amídicos de la β -naftilamina: las aminoacil- β -naftilamidas (a.a.- β -NA). Las peptidasas poseen la capacidad de romper dicho sustrato, generando aminoácidos libres y moléculas de β -naftilamina. Esta última molécula tiene la particularidad, que no tienen sus derivados amídicos, de ser fluorescente (Greenberg, 1962). Así, cuando es excitada con una luz de 345 nm emite parte de esta energía en una longitud de onda de 412 nm (Fig. 11). Dicha propiedad permite que la cantidad de β -naftilamina liberada pueda ser medida mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está en función de la concentración del enzima en la muestra, de manera que la cantidad de β -naftilamina medida puede ser extrapolada a actividad peptidásica en la muestra estudiada.

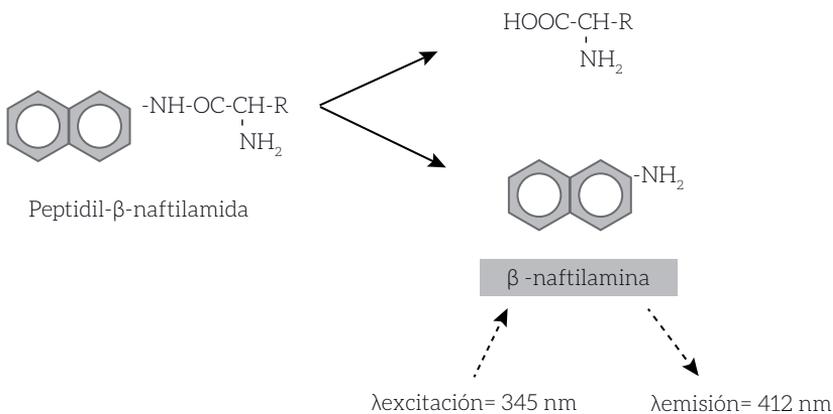


Figura 11. Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, β -naftilamina, emite fluorescencia a 412 nm cuando es excitado a 345 nm.

2.4.2. Ensayo enzimático

Para analizar la actividad peptidásica de PSA, APN, APB, Asp-AP, Cys-AP, PGI, DPPIV, PEP y APA se usaron sustratos del tipo peptidil- β -naftilamida o aminoacil- β -naftilamida.

La reacción se inició al añadir 1 ml de sustrato artificial fluorogénico (*Tabla 5*) sobre la muestra (30 μ l de muestra en el caso de PSA, APN y APB, y 50 μ l para Asp-AP, Cys-AP, PGI, DPPIV, PEP y APA), una vez mezclada, se dejó que la reacción transcurriera durante 30 min a 37 °C (Hotcold S). La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de tampón acetato 0,1 M a pH 4,2. La actividad enzimática de las peptidasas se determinó por métodos espectrofluorimétricos, para lo que se empleó un espectrofluorímetro (Shimadzu). En la *Figura 12* se puede observar la metodología seguida para el ensayo enzimático.

Tabla 5. Composición de las disoluciones empleadas en la determinación de la actividad enzimática. En todos los casos contenían BSA en una concentración de 0,1 mg/ml. **(I)** Sustratos preparados en tampón fosfato 50 mM (pH 7,4). **(II)** Sustratos preparados en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). NA: naftilamida, (Florentin *et al.*, 1984; Alba *et al.*, 1989; Mantle *et al.*, 1990; Silveira *et al.*, 2001).

(I)	Sustrato	mM	pH	DTT (mM)	EDTA (mM)	CaCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	Purocina (μ M)
PEP	Z-Gly-Pro- β -NA	0,125	7,4	2	-	-	-	-
PGI	pGlu- β -NA	0,125	7,4	2	2	-	-	-
APB	Arg- β -NA	0,125	6,5	-	-	-	150	40
APN	Ala- β -NA	0,125	7,4	1,2	-	-	-	40
PSA	Ala- β -NA	0,125	7,4	1,2	-	-	-	-
APA	H-Glu- β -NA	0,125	7,4	0,65	-	0,5	-	-

(II)	Sustrato	mM	pH	NaCl (mM)	MnCl ₂ (mM)	Captopril (nM)
Asp-AP	Asp- β -NA	0,125	7,4	-	1	-
DPPIV	H-Gly-Pro- β -NA	0,200	8,3	-	-	-
Cys-AP	Cys-di- β -NA	0,125	5,9	-	-	-

En todos los casos se incluyeron controles con extracto enzimático y sustrato, que se encontraban en presencia de ácido acético a fin de que no fuera posible la reacción. Los valores se determinaron empleando como blanco tubos que contenían tampón Tris-HCl.

Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se calculó la media y el error estándar. Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente fueron transformados en picomoles de metabolito liberado mediante extrapolación, por ajuste no lineal, de los datos a una ecuación de regresión calculada a partir de una curva patrón. Posteriormente, estos datos fueron convertidos en unidades de actividad peptidásica (UP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresaron como actividad específica (unidades de actividad peptidásica / litro de muestra) \rightarrow (UP/ L muestra).

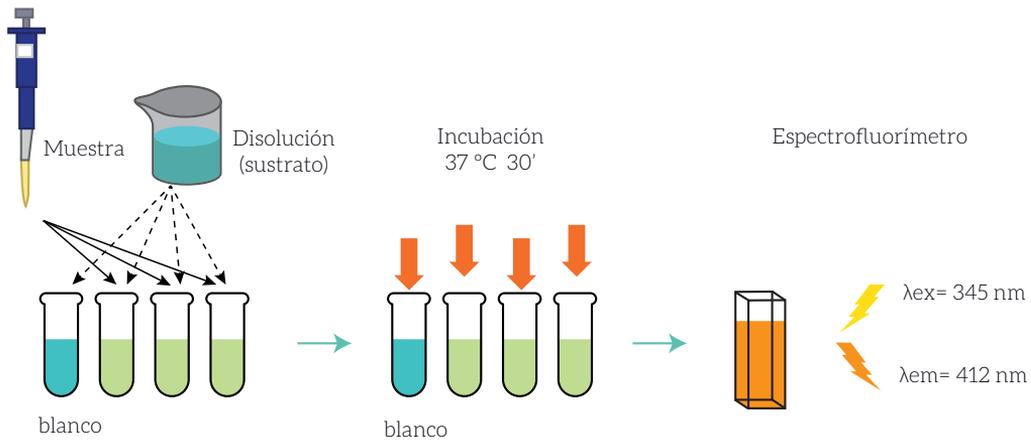


Figura 12. Esquema del procedimiento utilizado para el ensayo enzimático. A la fracción soluble se le añade sustrato artificial fluorogénico, se somete a un proceso de incubación y posteriormente se detiene la reacción enzimática mediante la adición de tampón acetato. La actividad peptidásica se determina gracias a la ayuda de un espectrofluorímetro.

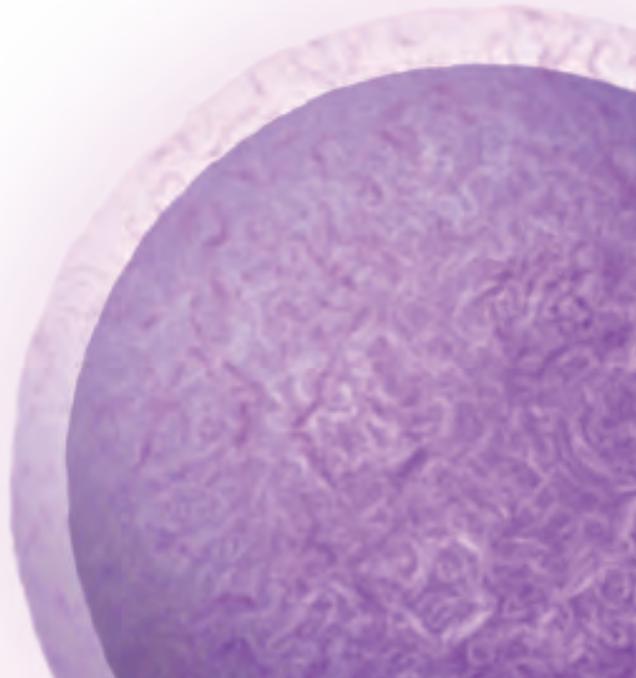
2.5. Tratamiento estadístico

La normalidad de todas las variables se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y, a partir de los resultados obtenidos, se decidió utilizar estadísticos no paramétricos.

Las diferencias entre los distintos grupos de estudio se analizaron mediante el test U de Mann-Whitney. Así mismo, para el análisis de correlaciones bivariadas se utilizó la Rho de Spearman. Para llevar a cabo dicho estudio estadístico se utilizó el software *Statistical Package for Social Sciences 12.0* (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.) y para la realización de los gráficos se empleó el programa Excel de Microsoft Office (Redmond, Washintong, EE.UU.).

Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos en aquellos casos en los que $P < 0,05$. En cada gráfico se especificará individualmente las diferencias significativas halladas.

IV. RESULTADOS



1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS CLÍNICOS

Con el fin de comparar los resultados obtenidos tanto en el Grupo Control como Infértil fue necesario valorar una serie de parámetros clínicos. Parámetros que se recogen sistemáticamente durante el desarrollo del ciclo de FIV y que aportan información sobre la respuesta ovárica a la estimulación farmacológica, la calidad embrionaria y las probabilidades de éxito del tratamiento.

Se analizaron una serie de variables epidemiológicas (edad), de estimulación (días de suministro del análogo, duración del tratamiento con gonadotropinas, dosis total de gonadotropinas, estradiol sérico y número de folículos preovulatorios) y de laboratorio (número total de ovocitos, porcentaje de madurez y de fecundación, calidad embrionaria, número de embriones transferidos y congelados). En el momento de realizar las comparaciones estadísticas no sólo se tuvo en cuenta la pertenencia a uno u otro grupo (G.C. / G.I.) sino también el resultado final del ciclo de FIV, es decir, embarazo o no embarazo. Por último, se cotejó la tasa de embarazo de cada grupo y se comparó la obtenida por los diferentes subconjuntos que los conforman.

Para que la lectura sea más sencilla, en los resultados que se muestran a continuación se utilizará la terminología descrita en el subapartado 2.1.1 de Materiales y Métodos, denominado Grupos de estudio.

1.1. Variables epidemiológicas y de estimulación

En la *Tabla 6* se puede observar cómo dentro del Grupo Control la edad de las pacientes que consiguieron embarazo resultó ser inferior a la del grupo que no logró gestación, diferencia que alcanzó la significancia estadística ($P < 0,001$). Del mismo modo, la edad de las mujeres embarazadas del G.C. fue significativamente menor a la del Grupo de mujeres infértiles, tanto respecto al subgrupo de mujeres gestantes ($P < 0,05$) como no gestantes ($P < 0,01$).

El número de días durante los que se administró análogo al subconjunto de mujeres embarazadas del G.I. fue superior al registrado en los dos subgrupos de pacientes del G.C., siendo dicha diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Dentro del subgrupo embarazo, las pacientes pertenecientes al G.C. mostraron un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de duración de la estimulación ovárica en comparación con el G.I. ($P < 0,01$). En referencia a la cantidad total de gonadotropinas administrada, la dosis de FSHr resultó ser similar en todos los grupos cotejados mientras que para LHr el subconjunto de pacientes gestantes del G.C. necesitó una cantidad significativamente mayor de hormona luteinizante en relación al G.I., independientemente del resultado del ciclo ($P < 0,05$).

Respecto al control de la respuesta folicular a la estimulación farmacológica, el día en que se pauta la descarga ovulatoria no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ni en el nivel de estradiol sérico, ni en el número de folículos observados por ecografía. No obstante, el subgrupo de pacientes no gestantes del Grupo Infértil es el que alcanza los mayores niveles de estradiol en sangre.

Tabla 6. Variables epidemiológicas y de estimulación. Comparación entre los dos grupos estudiados y resultado del ciclo de FIV (embarazo o no). Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos: * dentro del G.C. cuando se compara embarazo vs. no embarazo, \times entre diferentes grupos cuando se compara embarazo vs. embarazo y $\#$ entre diferentes grupos cuando se compara embarazo vs. no embarazo.

VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS Y DE ESTIMULACIÓN	GRUPO CONTROL (G.C.)		GRUPO INFÉRIL (G.I.)	
	Embarazo (n=42)	No embarazo (n=28)	Embarazo (n=25)	No embarazo (n=17)
Edad (años)	30,62 \pm 6,03	36,64 \pm 6,63 *	34,12 \pm 2,99 \times	35,24 \pm 1,39 $\#$
Días con Análogo	12,05 \pm 2,94	11,48 \pm 4,61	14,61 \pm 4,93 \times $\#$	13,25 \pm 5,46
Días con Gonadotropinas	9,44 \pm 1,38	8,74 \pm 1,72	8,48 \pm 1,68 \times	8,81 \pm 1,42
Dosis total de FSHr (UI)	2272,01 \pm 477,37	2283,33 \pm 681,49	2076,63 \pm 582,44	2070 \pm 461,48
Dosis total de LHr (UI)	1727,78 \pm 801,99	1383,33 \pm 812,36	1106,25 \pm 24,44 \times	987,50 \pm 730,88 $\#$
Estradiol sérico (pg/ mL)	2316,66 \pm 969,05	1889,07 \pm 433,96	2264,38 \pm 1337,52	2553,18 \pm 1870,75
Nº de folículos preovulatorios por punción	9,97 \pm 4,70	8,16 \pm 3,78	7,50 \pm 2,63	8,33 \pm 1,91

Edad:

* P<0,01 G.C., embarazo vs. G.C., no embarazo

 \times P<0,05 G.C., embarazo vs. G.I., embarazo $\#$ P<0,01 G.C., embarazo vs. G.I., no embarazo**Días con análogo:** \times P<0,05 G.C., embarazo vs. G.I., embarazo $\#$ P<0,05 G.C., no embarazo vs. G.I., embarazo**Días con gonadotropinas:** \times P<0,01 G.C., embarazo vs. G.I., embarazo**Dosis total de LHr:** \times P<0,05 G.C., embarazo vs. G.I., embarazo $\#$ P<0,05 G.C., embarazo vs. G.I., no embarazo

1.2. Variables de laboratorio

Tal y como se puede apreciar en la *Tabla 7*, dentro del Grupo Control las mujeres que lograron gestación tuvieron un mayor número de óvulos por punción en comparación con las que no quedaron gestantes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$).

En relación al porcentaje de madurez, el subgrupo de pacientes embarazadas pertenecientes al G.I. mostró una tasa de ovocitos maduros superior al subconjunto de mujeres no gestantes del G.C., diferencia que alcanzó la significancia estadística ($P < 0,05$). Además, cuando dicho elevado porcentaje de madurez se comparó con el obtenido en los otros dos subgrupos estudiados (G.C., embarazo y G.I., no embarazo), se observó una importante discrepancia que se acercó a la significancia estadística ($P = 0,05$ y $P = 0,06$).

Respecto a las variables porcentaje de fecundación y tasa de embriones de buena calidad en los días de cultivo 2 y 3 post-punción (D+2 y D+3) se observa que no existen diferencias relevantes entre los distintos grupos de pacientes. No obstante, se debe destacar que las mujeres gestantes del G.I. fueron las que obtuvieron una mayor tasa de embriones categoría A/B en D+2, mientras que en D+3 el porcentaje más elevado de embriones de buena calidad lo obtuvo el subconjunto de embarazadas del G.C.

El hecho de que no existan discrepancias significativas en cuanto a la calidad embrionaria se traduce en un número similar de embriones transferidos y congelados en los cuatro subgrupos analizados, no mostrando diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 7. Variables de laboratorio. Comparación entre los dos grupos estudiados y resultado final del ciclo de FIV (embarazo o no). Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos: * dentro del G.C. cuando se compara embarazo vs. no embarazo, y # entre diferentes grupos cuando se compara embarazo vs. no embarazo.

VARIABLES DE LABORATORIO	GRUPO CONTROL (G.C.)		GRUPO INFÉRIL (G.I.)	
	Embarazo (n=42)	No embarazo (n=28)	Embarazo (n=25)	No embarazo (n=17)
Nº de ovocitos por punción	11,52 \pm 5,14	8,14 \pm 4,01 *	9,84 \pm 5,09	9,88 \pm 5,66
% de madurez	87,42 \pm 14,12	82,09 \pm 18,92	93,23 \pm 13,86 #	83,50 \pm 22,99
% de fecundación	79,35 \pm 16,66	81,73 \pm 18,52	82,16 \pm 21,85	79,63 \pm 18,77
% de embriones de buena calidad en D+2	88,27	87,84	95,51	83,33
% de embriones de buena calidad en D+3	75	70,27	71,35	61,22
Nº embriones por transferencia	2,31 \pm 0,47	2,32 \pm 0,55	2,16 \pm 0,37	2,12 \pm 0,70
Nº embriones por congelación	2,24 \pm 3,03	1,57 \pm 2,90	1,88 \pm 2,64	1,12 \pm 2,55

Nº de ovocitos por punción:

* P<0,01 G.C., embarazo vs. G.C., no embarazo

Porcentaje de madurez:

P<0,05 G.C., no embarazo vs. G.I., embarazo

1.3. Tasa de embarazo por transferencia.

El porcentaje global de gestación por transferencia conseguido en ambos grupos fue prácticamente idéntico, ya que en el Grupo Control se obtuvo un 60 % y en el Grupo Infértil un 59,52%. Para el Grupo Fértil (formado por G1, G2 y G3), la tasa de embarazo / transferencia fue del 72,97%.

Las diferencias se apreciaron cuando se analizaron los porcentajes obtenidos dentro de cada grupo de estudio, tal y como muestran las Figuras 13 y 14.

Grupo Control

Respecto al Grupo Control, el subgrupo G1 es el que alcanzó la mayor tasa de gestación por transferencia, seguido de G4. Posteriormente, y con unos diez puntos de diferencia en relación a G4, se encuentran G2 y G3. Finalmente, G5 resultó ser el subconjunto con el menor porcentaje de gestación / transferencia, diferencia que alcanzó la significancia estadística respecto a G1 ($P < 0,001$), G2 ($P < 0,01$), G3 ($P < 0,01$) y G4 ($P < 0,001$).

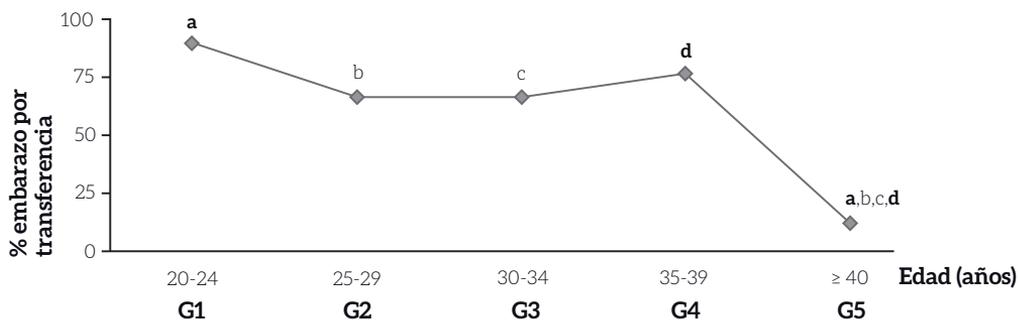


Figura 13. Tasa de embarazo por transferencia según el rango de edad del Grupo Control. Se representa el porcentaje (%) y los valores estadísticamente significativos, ^{a,d} $P < 0,001$ y ^{b,c} $P < 0,01$. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=15), G4 (n=17) y G5 (n=16).

Grupo Infértil

En cuanto al Grupo Infértil, sólo se aprecian discrepancias estadísticamente significativas entre el subgrupo SOP y el subgrupo ESCA ($P < 0,05$). De hecho, la esterilidad sin causa aparente es la infertilidad con la mayor tasa de embarazo por transferencia, seguida a unos 6 - 9 puntos por END y FT.

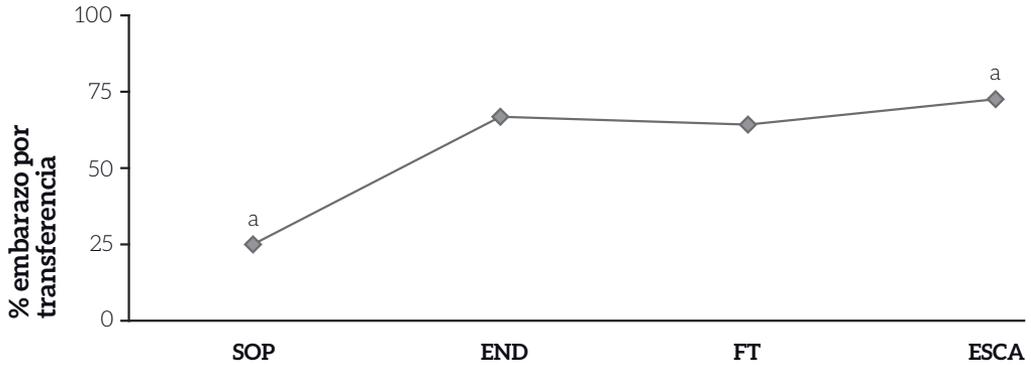


Figura 14. Tasa de embarazo por transferencia según el tipo de problema reproductivo del Grupo Infértil.

Se representa el porcentaje (%) y los valores estadísticamente significativos, ^a $P < 0,05$. SOP ($n=8$; edad= $33,88 \pm 3,09$), END ($n=9$; edad= $34,50 \pm 1,72$ años), FT ($n=14$; edad= $35,87 \pm 1,85$ y ESCA ($n=11$; edad= $34,33 \pm 3,42$).

2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS PEPTIDASAS

Para poder medir la actividad enzimática de todas las peptidasas analizadas en esta investigación se realizaron ensayos fluorimétricos.

El principal objetivo fue demostrar la presencia de APN, PSA, APB, DPPIV, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI en el líquido folicular humano para, a *posteriori*, describir la actividad peptidásica en dicho fluido.

Una vez demostrada la presencia de las nueve enzimas en el LF, se estudió si existía algún tipo de alteración de los niveles de actividad enzimática que pudiera estar ligado a la edad de la mujer. Seguidamente y con el fin de llevar a cabo el cuarto objetivo de esta Memoria, se intentó relacionar la actividad peptidásica del Grupo Fértil (también denominado FERT) con distintos parámetros clínicos de fertilidad.

A continuación, se analizó y comparó la actividad de las nueve enzimas en el LF de mujeres pertenecientes tanto al Grupo Fértil como Grupo Infértil (SOP, END, FT o ESCA). De este modo, se trató de determinar si existe algún tipo de alteración de la actividad enzimática en función de la patología reproductiva que padezca la paciente.

La nomenclatura y características de cada grupo de estudio aparecen especificadas en el subapartado 2.1.1 de Materiales y Métodos. A modo de anexo, todos los datos numéricos han sido reflejados en tablas (2. *Anexo; pág. 171*).

2.1. Grupo Control

2.1.1. Actividad enzimática en el líquido folicular

El Grupo Control se compuso de 72 muestras de LF procedentes tanto de donantes de óvulos como de mujeres cuyo único problema reproductivo era el factor masculino severo. La edad media de este grupo se situó en los 33,63 años.

En todos los líquidos foliculares se detectó actividad para las nueve peptidasas estudiadas. Tal y como muestra la *Figura 15*, las enzimas con mayor actividad en LF fueron APN, PSA, APB y DPPIV.

En el G.C. los niveles de actividad de APN y PSA resultaron ser prácticamente idénticos, mientras que en el Grupo Fértil APN presentó una actividad 13 puntos superior a la de PSA (*Fig. 16*). Cabe destacar que tanto APN como PSA muestran unos niveles de actividad significativamente superiores a los del resto de peptidasas analizadas.

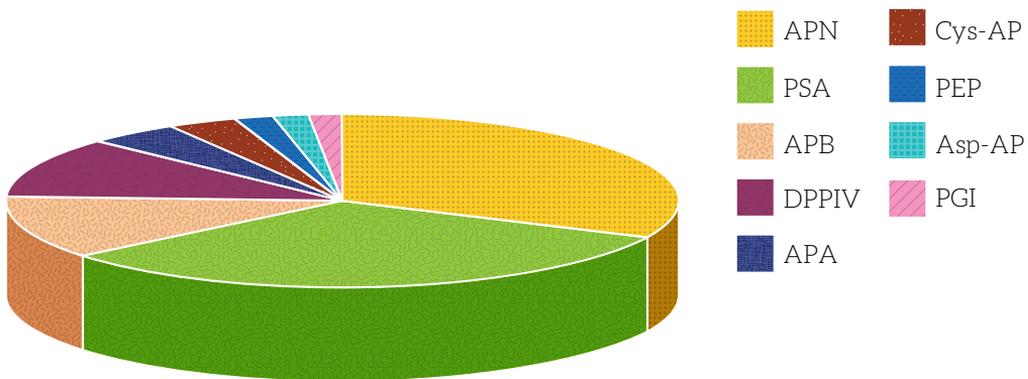


Figura 15. Actividad de las nueve peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media de cada grupo; n=72.

2.1.2. Actividad enzimática en LF según la edad: comparaciones

En la *Figura 16* se representa la actividad enzimática de las nueve peptidasas estudiadas en líquido folicular, agrupadas por rangos de edad.

En un principio, la distribución de la actividad no varió demasiado en los cinco subgrupos estudiados. Destacar que en mujeres de 20 a 29 años (G1 y G2) la actividad enzimática más elevada la registró APN, seguida de PSA, mientras que a partir de los 30 años (G3, G4 y G5) los mayores niveles de actividad fueron para PSA, seguida de APN.

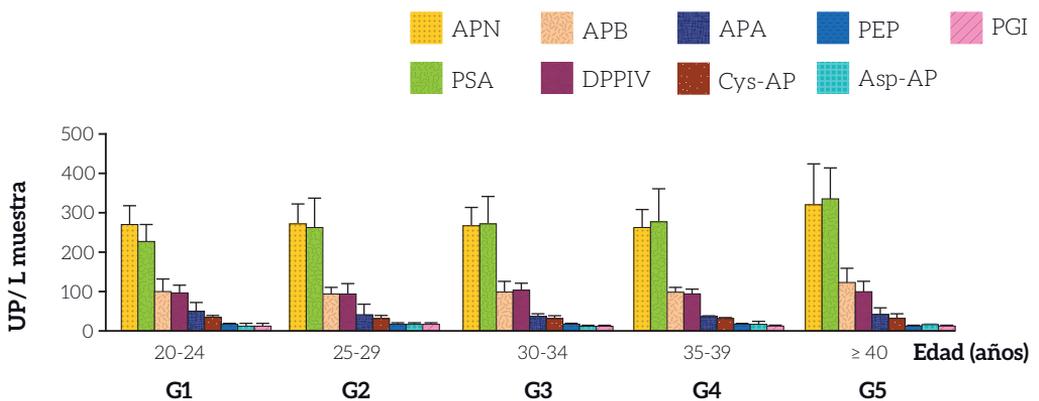


Figura 16. Actividad de las nueve peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=16), G4 (n=18) y G5 (n=16).

A continuación y buscando la máxima concreción, se mostrarán los resultados obtenidos en aquellas enzimas que alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre los cinco subgrupos analizados.

Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)

La Figura 17 muestra la actividad de la enzima PSA en LF en función del rango de edad.

Las mujeres de 40 o más años revelaron un incremento de actividad en comparación al resto de subgrupos, es decir, G1 ($P<0,001$), G2 ($P<0,05$), G3 y G4 ($P<0,05$). No obstante, la diferencia de actividad del subgrupo G3 respecto al G5 no llegó a ser estadísticamente significativa ($P=0,09$). En resumen, los resultados muestran un incremento de actividad enzimática a medida que aumenta la edad materna.

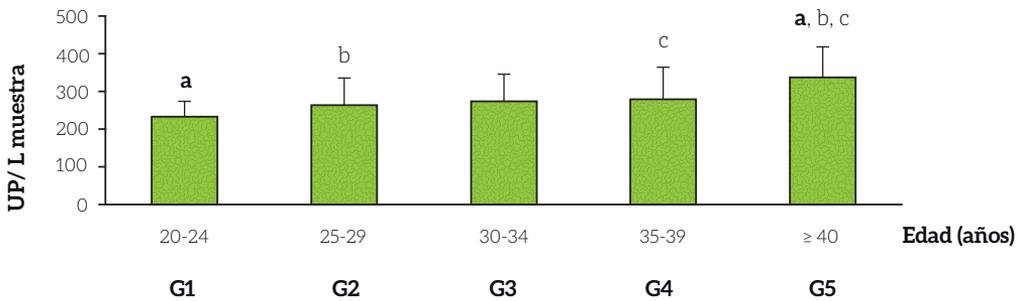


Figura 17. Actividad enzimática de PSA en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, ^a $P<0,001$ y ^{b, c} $P<0,05$. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=16), G4 (n=18) y G5 (n=16).

Aminopeptidasa B (APB)

La actividad enzimática de APB se midió en el líquido folicular de mujeres sin problemas reproductivos y se diferenciaron cinco subgrupos de edad, tal y como muestra la *Figura 18*.

Las mujeres de ≥ 40 años fueron las que obtuvieron el nivel más elevado de actividad para APB, alcanzando diferencias estadísticamente significativas respecto al G2 ($P < 0,05$) y G4 ($P < 0,05$).

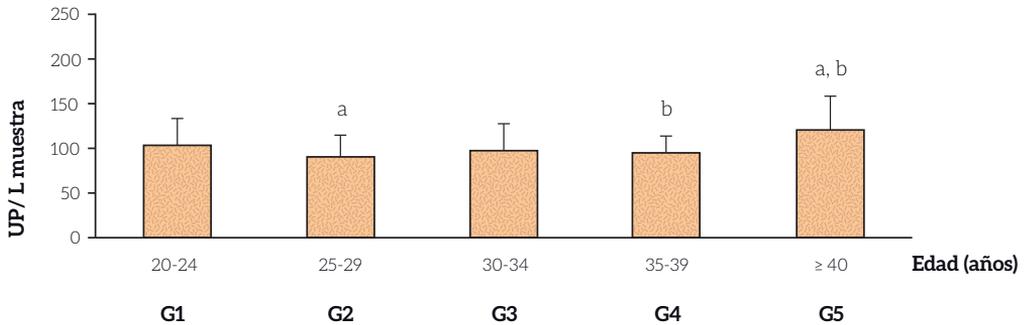


Figura 18. Actividad enzimática de APB en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, ^{a, b} $P < 0,05$. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=16), G4 (n=18) y G5 (n=16).

Cistil aminopeptidasa (Cys-AP)

La Figura 19 presenta la actividad enzimática de Cys-AP en mujeres sin problemas de fertilidad, teniendo en cuenta cinco categorías de edad.

Desde el subgrupo de mujeres de menor edad hasta el subconjunto de mujeres de 35-39 años parece haber una pequeña mengua de los niveles de actividad enzimática, de hecho, la diferencia entre G1 y G4 llegó a ser estadísticamente significativa ($P < 0,05$). Finalmente, en el G5 los valores aumentaron de nuevo, siendo muy similares a los alcanzados por el G1.

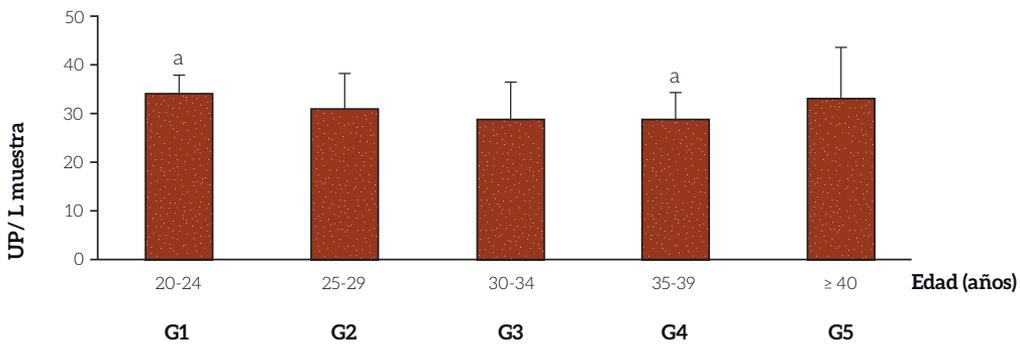


Figura 19. Actividad enzimática de Cys-AP en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min) por L de muestra. Se representan la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, ^a $P < 0,05$. G1 (n=10), G2 (n=11), G3 (n=16), G4 (n=18) y G5 (n=16).

Aspartil aminopeptidasa (Asp-AP)

El ensayo enzimático de Asp-AP se realizó en el LF de mujeres no patológicas y se compararon los resultados obtenidos según los cinco rangos de edad establecidos, tal y como refleja la *Figura 20*.

Los niveles de actividad de G1, G2, G3 y G4 fueron parejos. Sin embargo, en G5 se detectó una disminución de la actividad enzimática que además fue estadísticamente significativa respecto a G4 ($P < 0,05$).

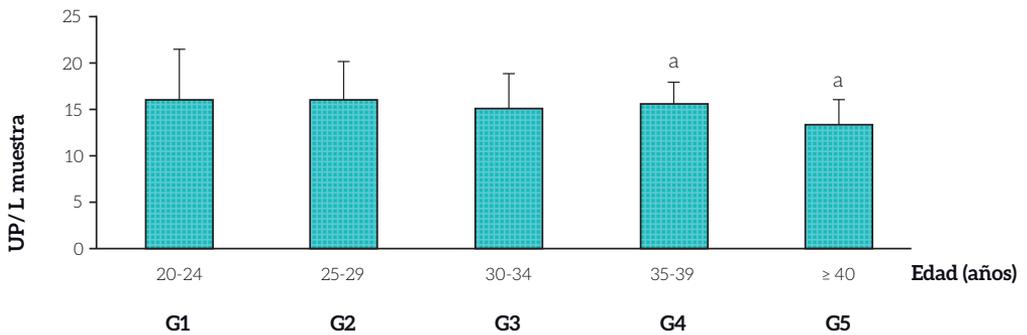


Figura 20. Actividad enzimática de Asp-AP en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, ^a $P < 0,05$. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=16), G4 (n=18) y G5 (n=16).

2.1.3. Actividad enzimática en LF según la edad: correlaciones.

Tras describir el comportamiento de las nueve enzimas seleccionadas, en este apartado se ha tratado de establecer la correlación existente entre actividad peptidásica en LF y edad materna.

En la *Tabla 8* se detallan los resultados obtenidos tras realizar el análisis de correlaciones bivariadas para las nueve peptidasas seleccionadas. Así, PSA fue la única enzima que mostró una correlación clara entre actividad y edad ($P < 0,01$), razón por la que sólo se ha representado el gráfico descrito por dicha peptidasa (*Fig. 21*).

Tabla 8. Correlación entre la actividad peptidásica en LF y la edad en el Grupo Control. P (significación bilateral); n=72.

Peptidasa	Coefficiente de correlación	P
APN	+ 0,091	0,447
PSA	+ 0,349	0,003
APB	+ 0,202	0,089
DPPIV	- 0,122	0,307
APA	- 0,201	0,091
Cys-AP	- 0,102	0,399
PEP	+ 0,070	0,559
Asp-AP	- 0,223	0,060
PGI	- 0,074	0,539

Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)

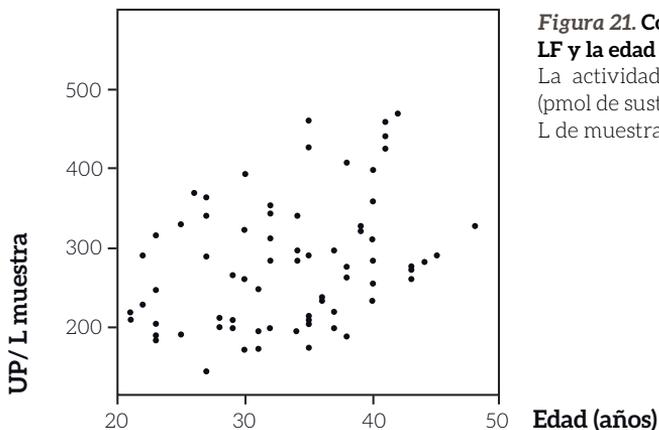


Figura 21. Correlación entre la actividad de PSA en LF y la edad en el Grupo Control.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. PSA (n=72).

2.1.4. Actividad enzimática de PSA en LF según la edad y el resultado de FIV

Al constatar que la actividad enzimática de PSA aumenta con la edad de la mujer (Fig. 17) y que se correlaciona de forma positiva con ella (Fig. 21), se ha intentado esclarecer su posible implicación en el resultado final del ciclo de FIV, es decir, en la consecución o no de gestación.

Como muestra la Figura 22, en el grupo de mujeres embarazadas los niveles de actividad de PSA fueron aumentando paulatinamente hasta los 35-39 años, para observarse en el siguiente subgrupo (G5) un incremento de la actividad de 85 puntos. Por otro lado, el grupo no embarazo registró mayores fluctuaciones de actividad peptidásica: del G1 al G2 hubo un importante aumento de los niveles de actividad (102 puntos), del G2 al G3 el incremento fue ligero (17 puntos), mientras que del G3 al G4 se observó un marcado decrecimiento de la actividad (75 puntos). Finalmente, en el G5 se detectó una nueva subida de los niveles de actividad enzimática respecto a G4 (106 puntos).

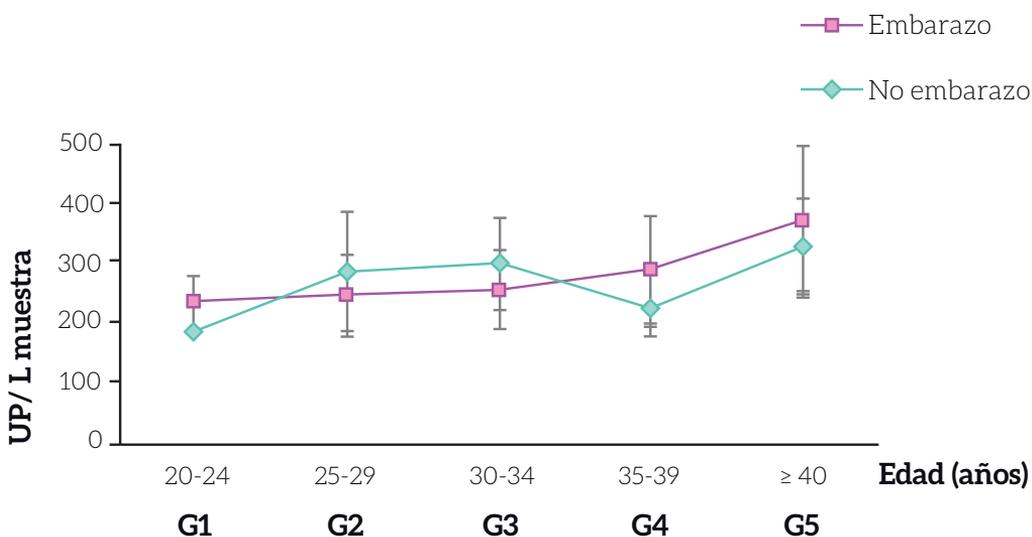


Figura 22. Actividad enzimática de PSA en el LF de mujeres del Grupo Control, distinguiendo entre embarazo y no embarazo. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=15), G4 (n=17) y G5 (n=16).

2.2. Grupo Fértil: correlación clínica

Destacar que el grupo de estudio seleccionado en este apartado ha sido única y exclusivamente el Grupo Fértil, esto es debido a que está considerado como nuestro grupo control por excelencia. Lo constituyeron 38 muestras de LF pertenecientes a mujeres del G.C. con una edad comprendida entre los 20 y los 34 años (G1, G2 y G3), más concretamente, la edad media del grupo fue de 27,79 años.

Los parámetros de fertilidad estudiados fueron los siguientes: nivel de estradiol sérico el día de la descarga ovulatoria, número total de ovocitos por punción, tasa de madurez ovocitaria, porcentaje de fecundación y consecución o no de embarazo. En la *Tabla 9* se especifica la media de las cinco variables examinadas.

Tabla 9. Parámetros clínicos analizados en el Grupo Fértil. Se representa la media \pm ES; (n=38).

Estradiol sérico (pg/ mL)	Nº de ovocitos	% de madurez	% de fecundación	% de embarazo
2415,71 \pm 633,26	12,19 \pm 4,77	87,05 \pm 13,63	83,12 \pm 14,27	72,97

2.2.1 Actividad enzimática en LF y nivel de estradiol en sangre: correlaciones

En la *Tabla 10* se especifican los resultados obtenidos tras realizar el análisis de correlaciones bivariadas para las nueve enzimas seleccionadas. PSA fue la única peptidasa que mostró una correlación clara entre actividad y cantidad de estradiol sérico ($P < 0,05$). Motivo por el cual sólo se ha representado el gráfico descrito por PSA (*Fig. 23*).

Tabla 10. Correlación entre la actividad peptidásica en LF y el nivel de estradiol sérico en el Grupo Fértil.
P (significación bilateral); n=31.

Peptidasa	Coefficiente de correlación	P
APN	- 0,219	0,237
PSA	- 0,440	0,013
APB	- 0,141	0,448
DPPIV	- 0,120	0,521
APA	+ 0,039	0,835
Cys-AP	+ 0,240	0,201
PEP	- 0,103	0,581
Asp-AP	- 0,126	0,499
PGI	- 0,268	0,145

Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)

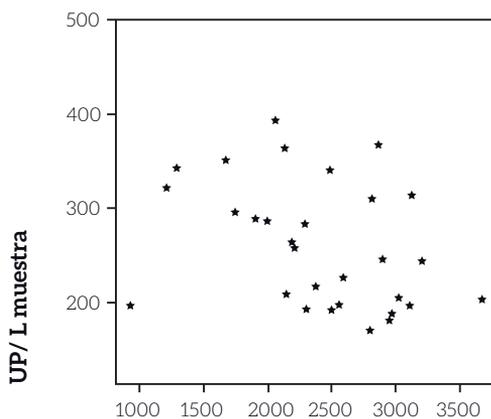


Figura 23. Correlación entre la actividad de PSA en LF y el nivel de estradiol sérico en el Grupo Fértil.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. PSA (n=31).

Estradiol sérico (pg/ ml)

2.2.2. Actividad enzimática en LF y número de ovocitos por punción: correlaciones

La Tabla 11 presenta los resultados hallados tras realizar el análisis de correlaciones bivariadas en las nueve peptidasas estudiadas. Así, PSA fue la única enzima que mostró una correlación de significancia estadística entre actividad y número de ovocitos totales ($P < 0,05$) mientras que para APB la significancia estadística fue de $P = 0,05$. Por esta razón, sólo se ha representado el gráfico descrito por la peptidasa PSA (Fig. 24).

Tabla 11. Correlación entre la actividad peptidásica en LF y el número total de ovocitos por punción en el Grupo Fértil. P (significación bilateral); n=38.

Peptidasa	Coefficiente de correlación	P
APN	- 0,319	0,051
PSA	- 0,380	0,019
APB	- 0,320	0,050
DPPIV	- 0,091	0,588
APA	+ 0,036	0,829
Cys-AP	+ 0,268	0,109
PEP	+ 0,272	0,099
Asp-AP	+ 0,112	0,505
PGI	+ 0,226	0,172

Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)

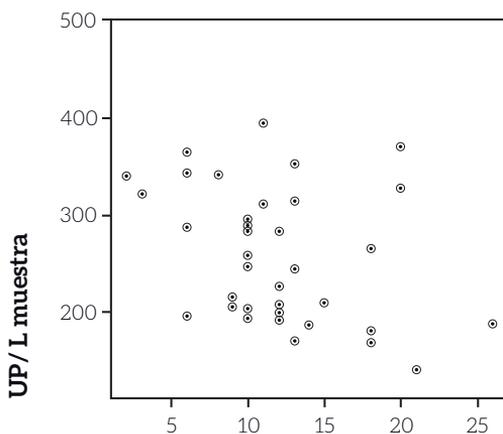


Figura 24. Correlación entre la actividad de PSA en LF y el número total de ovocitos / punción en el Grupo Fértil.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. PSA (n=38).

Nº total de ovocitos obtenidos

2.2.3. Actividad enzimática en LF y tasa de madurez ovocitaria: correlaciones

En la *Tabla 12* se detallan los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de correlación llevado a cabo para las nueve enzimas seleccionadas. Tal y como se puede observar, ninguna de las correlaciones alcanzó significancia estadística ($P > 0,05$).

Tabla 12. Correlación entre la actividad peptidásica en LF y la tasa de madurez ovocitaria en el Grupo Fértil.
P (significación bilateral); n=36.

Peptidasa	Coefficiente de correlación	P
APN	+ 0,134	0,435
PSA	+ 0,287	0,089
APB	+ 0,286	0,091
DPPIV	+ 0,183	0,286
APA	+ 0,123	0,474
Cys-AP	+ 0,317	0,064
PEP	+ 0,175	0,307
Asp-AP	- 0,002	0,992
PGI	+ 0,040	0,815

2.2.4. Actividad enzimática en LF y tasa de fecundación: correlaciones

La *Tabla 13* muestra los resultados obtenidos tras realizar el análisis de correlaciones bivariadas para las nueve peptidasas estudiadas. Al igual que en el subapartado anterior, no se detectaron valores estadísticamente significativos ($P > 0,05$).

Tabla 13. Correlación entre la actividad peptidásica en LF y la tasa de fecundación en el Grupo Fértil.
P (significación bilateral); n=36.

Peptidasa	Coefficiente de correlación	P
APN	- 0,081	0,638
PSA	+ 0,124	0,471
APB	+ 0,146	0,394
DPPIV	+ 0,079	0,649
APA	+ 0,079	0,647
Cys-AP	- 0,173	0,321
PEP	+ 0,083	0,631
Asp-AP	- 0,105	0,543
PGI	- 0,037	0,832

2.2.5. Actividad enzimática en LF y resultado de FIV: comparaciones

El último parámetro de fertilidad analizado fue la consecución o no de gestación, en definitiva, el éxito del tratamiento de fecundación *in vitro*. Intentando ser lo más precisos posible, en este subapartado sólo se han tenido en cuenta los resultados obtenidos en aquellas pacientes en las que el número de embriones transferidos fue dos (ni uno ni tres). A continuación se presentarán las gráficas de aquellas enzimas que mostraron discrepancias de significancia estadística.

Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)

En la *Figura 25* se describe la actividad de PSA en el LF de mujeres del Grupo Fértil en función del resultado final del ciclo de FIV.

Cuando se compararon los dos conjuntos, se observó que el grupo embarazo presentó un descenso de actividad de 81 puntos respecto al grupo no embarazo, diferencia que fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

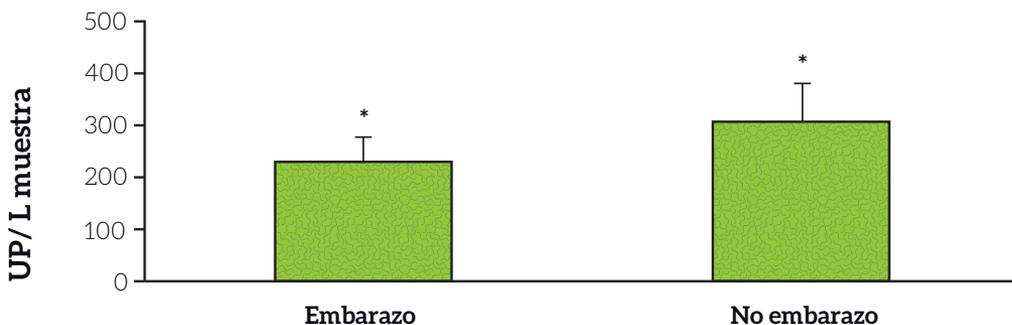


Figura 25. Actividad enzimática de PSA en el LF de mujeres del Grupo Fértil: embarazo vs. no embarazo.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, * $P < 0,05$. Embarazo (n=18), No embarazo (n=7).

Aminopeptidasa A (APA)

El ensayo enzimático de APA se realizó en el LF de pacientes pertenecientes al Grupo Fértil y se dividió en dos grupos en función del éxito del ciclo de FIV, tal y como refleja la *Figura 26*.

En este caso, cuando se cotejaron los dos conjuntos se detectó que el grupo embarazo había alcanzado unos niveles de actividad enzimática ligeramente superiores a los del grupo de mujeres no embarazadas, diferencia que resultó ser estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

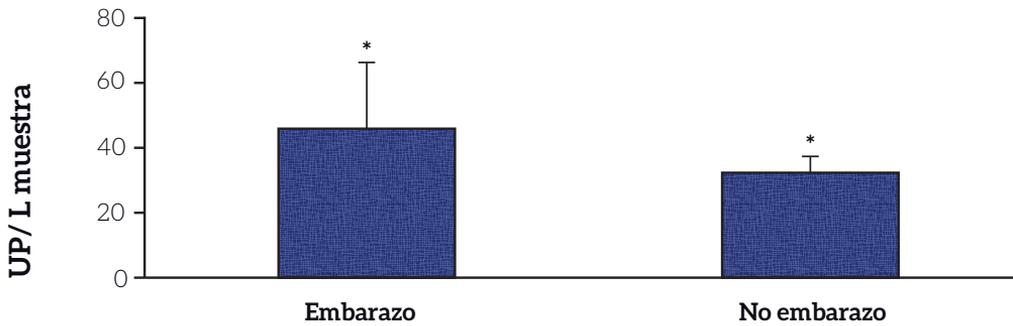


Figura 26. Actividad enzimática de APA en el LF de mujeres del Grupo Fértil: embarazo vs. no embarazo. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, * $P < 0,05$. Embarazo (n=18), No embarazo (n=7).

2.3. Grupo Infértil

2.3.1. Actividad enzimática en el líquido folicular

El Grupo Infértil lo compusieron 45 muestras de LF procedentes de mujeres afectas de uno de los siguientes problemas reproductivos: síndrome de ovario poliquístico (subgrupo SOP), endometriosis ovárica (subgrupo END), factor tubárico (subgrupo FT) y esterilidad sin causa aparente (subgrupo ESCA). La edad media del G.I. fue de 34,33 años.

En todos los líquidos foliculares se detectó actividad para las nueve peptidasas seleccionadas. En la *Figura 27* se puede observar como las enzimas con mayor actividad en LF fueron PSA, APN, APB y DPPIV.

A diferencia del Grupo Control, donde APN y PSA presentaban valores de actividad muy similares, en el Grupo Infértil PSA resultó ser la enzima con mayor actividad, siendo dicha actividad 9 puntos superior a la alcanzada por APN. Es necesario subrayar que, al igual que en el G.C., tanto APN como PSA mostraron unos niveles de actividad significativamente superiores a los del resto de peptidasas estudiadas.

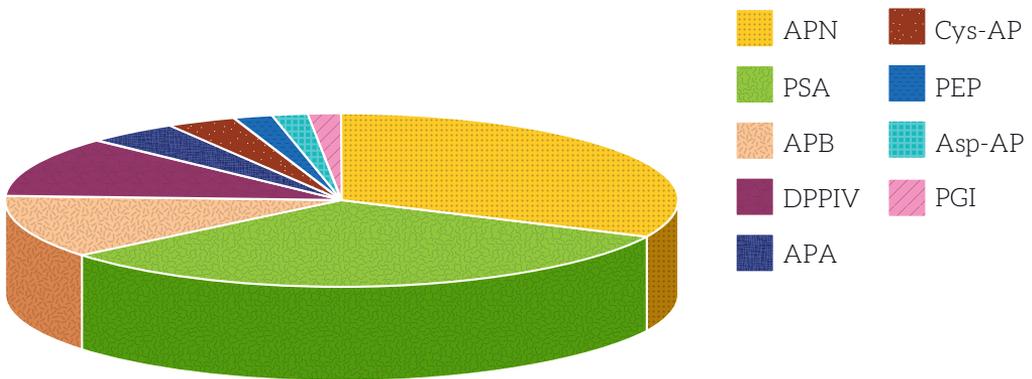


Figura 27. Actividad de las nueve peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Infértil. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media de cada grupo; n=45.

2.3.2. Actividad enzimática en LF según la patología: comparaciones

En la *Figura 28* se representa la actividad enzimática de las nueve peptidasas estudiadas en líquido folicular, agrupadas según el tipo de esterilidad.

Se puede decir que la distribución de la actividad enzimática fue similar en los cuatro subgrupos estudiados. No obstante, cabe señalar que en las pacientes afectas de SOP o END el enzima con mayor actividad resultó ser PSA, seguido de APN. Sin embargo, en el caso de mujeres que padecían FT o ESCA la situación fue justo la inversa; la actividad de APN superó a la de PSA en unos 20 puntos aproximadamente.

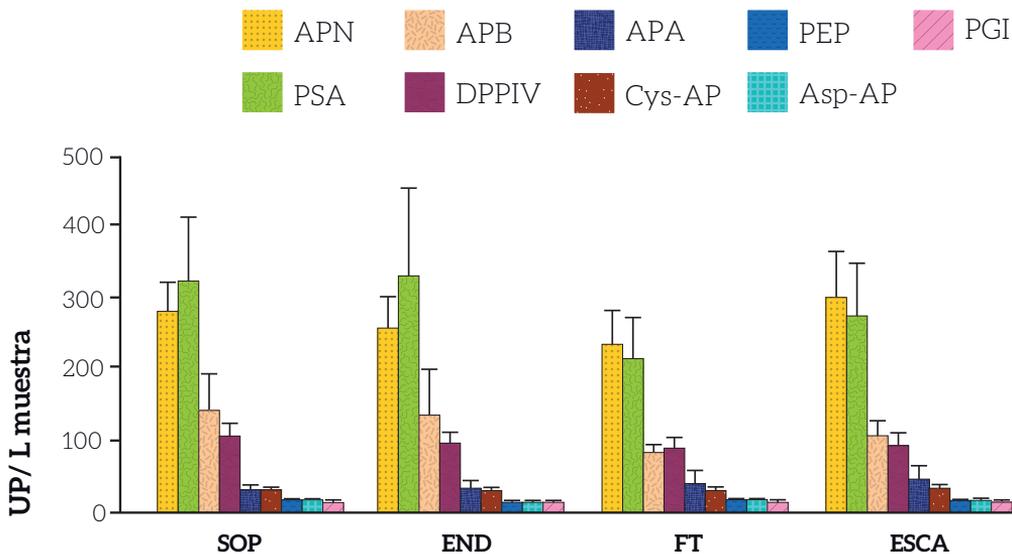


Figura 28. Actividad de las nueve peptidasas seleccionadas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Infértil. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. SOP (n=8), END (n=10), FT (n=15) y ESCA (n=12).

Seguidamente, se mostrarán los resultados obtenidos en aquellas peptidasas que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro infertilidades estudiadas así como con el Grupo Fértil.

Aminopeptidasa neutra (APN)

Tal y como se observa en la *Figura 29*, la actividad enzimática de APN se midió en el LF de mujeres pertenecientes al Grupo Fértil y Grupo Infértil, asimismo se comparó la actividad hallada en los 5 subgrupos.

En relación a FERT, las mujeres afectas de factor tubárico (FT) fueron las que presentaron los menores niveles de actividad enzimática y las que padecían esterilidad sin causa aparente (ESCA) fueron las que obtuvieron los mayores valores de actividad (32 puntos de diferencia en ambos casos). Diferencias que no fueron estadísticamente significativas respecto a FERT ($P > 0,05$), pero que sí lo fueron entre ellas, es decir, cuando se comparó FT frente a ESCA ($P < 0,05$).

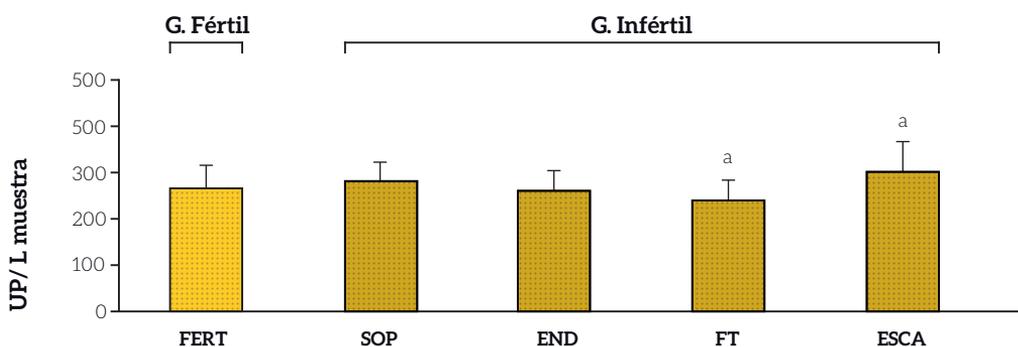


Figura 29. Actividad enzimática de APN en muestras de LF de mujeres del Grupo Fértil e Infértil. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos, ^a $P < 0,05$. FERT (n=38), SOP (n=8), END (n=9), FT (n=14) y ESCA (n=12).

Aminopectidasa sensible a puromicina (PSA)

La Figura 30 muestra la actividad de PSA en el LF de mujeres del Grupo Fértil e Infértil, una vez descritos los cinco subgrupos de estudio, estos se compararon entre sí.

El FT resultó ser el problema reproductivo con menor actividad enzimática en LF, mientras que SOP y END fueron las que presentaron los mayores niveles de actividad, muy similares entre sí (con sólo 5 puntos de diferencia). De hecho, SOP y END fueron las dos únicas patologías que mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a FERT ($P < 0,05$). Cuando se compararon los cuatro problemas reproductivos, se observó que las mujeres afectas de factor tubárico alcanzaban unos niveles de actividad significativamente inferiores a aquellas que padecían síndrome de ovario poliquístico ($P < 0,01$), endometriosis ovárica ($P < 0,05$) o esterilidad sin causa aparente ($P < 0,05$).

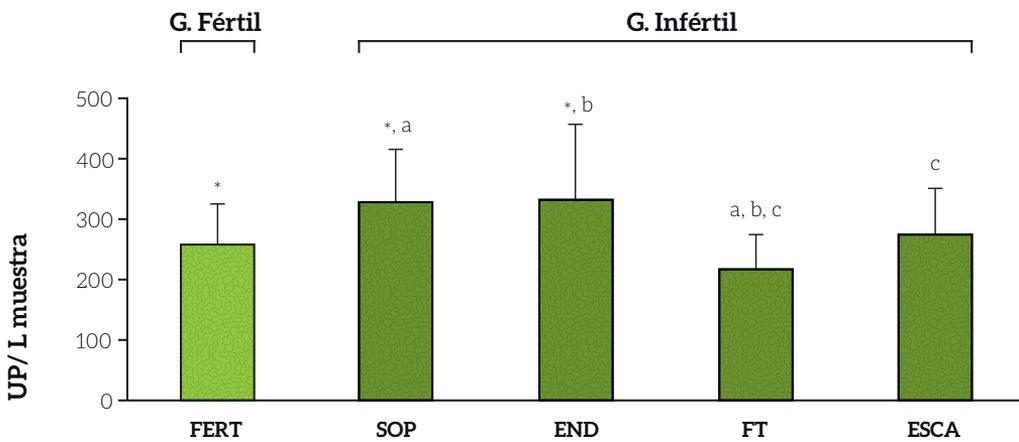


Figura 30. Actividad enzimática de PSA en muestras de LF de mujeres del Grupo Fértil e Infértil. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos: (*) cuando se compara FERT con cada una de las infertilidades y (a, b, c) cuando se comparan las infertilidades entre sí. * $P < 0,05$, ^a $P < 0,01$, ^{b, c} $P < 0,05$. FERT (n=38), SOP (n=8), END (n=9), FT (n=14) y ESCA (n=12).

Aminopeptidasa B (APB)

En la *Figura 31* se representa la actividad enzimática de APB en el LF de pacientes procedentes del Grupo Fértil y Grupo Infértil, posteriormente se cotejaron los valores obtenidos los cinco subgrupos analizados.

Por un lado, SOP y END fueron los problemas reproductivos que alcanzaron los mayores niveles de actividad enzimática, más concretamente, SOP superó en 7 puntos a END. Por otro lado, el subconjunto de mujeres afectas de factor tubárico fue el que obtuvo los menores niveles de actividad, seguido de FERT y ESCA. Respecto al Grupo Fértil, la única infertilidad que mostró diferencias de significancia estadística fue SOP ($P < 0,05$) mientras que el subgrupo END se acercó a ella ($P = 0,07$). Cuando se compararon las patologías entre sí, los valores alcanzados por el FT resultaron ser estadísticamente inferiores a los descritos por el resto de infertilidades: SOP ($P < 0,01$), END ($P < 0,05$) y ESCA ($P < 0,05$).

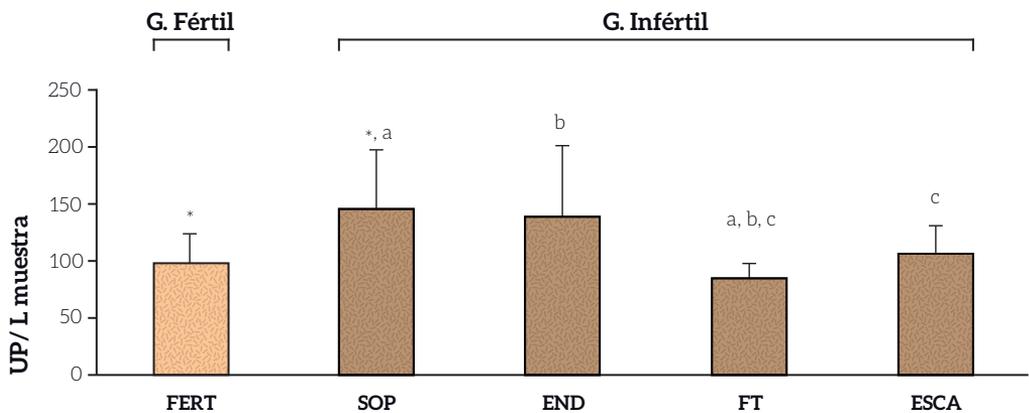


Figura 31. Actividad enzimática de APB en muestras de LF de mujeres del Grupo Fértil e Infértil. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES y los valores estadísticamente significativos: (*) cuando se compara FERT con cada una de las infertilidades y (a, b, c) cuando se comparan las infertilidades entre sí. * $P < 0,05$, ^a $P < 0,01$, ^{b, c} $P < 0,05$. FERT (n=38), SOP (n=8), END (n=9), FT (n=14) y ESCA (n=12).

2.3.3. Actividad enzimática de PSA en LF según tipo de infertilidad y resultado de FIV

Del mismo modo que en el subapartado 2.1.4 y al constatar que PSA presenta alteraciones de actividad en función de la patología que padezca la paciente (Fig. 30), se ha tratado de establecer la relación existente entre actividad enzimática, infertilidad y resultado final del ciclo de FIV.

Como refleja la *Figura 32*, tanto en el grupo de mujeres embarazadas como no embarazadas se observaron importantes fluctuaciones de actividad enzimática. ESCA fue el único subgrupo en el que la actividad alcanzada resultó ser independiente del resultado final del ciclo. Por otro lado, en SOP y FT la actividad descrita por el conjunto de mujeres gestantes fue inferior a la obtenida por el grupo no embarazo en 55 puntos aproximadamente. No obstante, en el caso del subgrupo END aquellas que quedaron gestantes lograron unos niveles de actividad superiores a los del grupo no embarazo en 65 puntos.

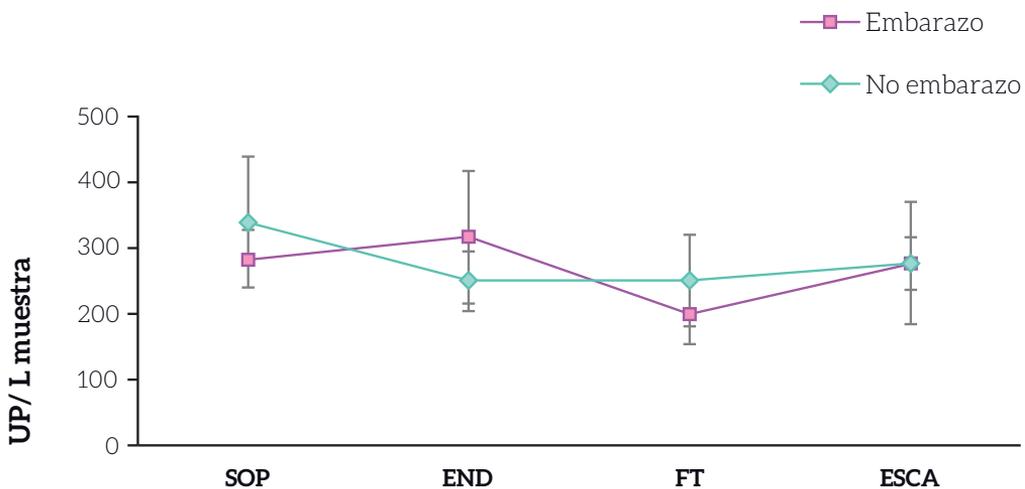
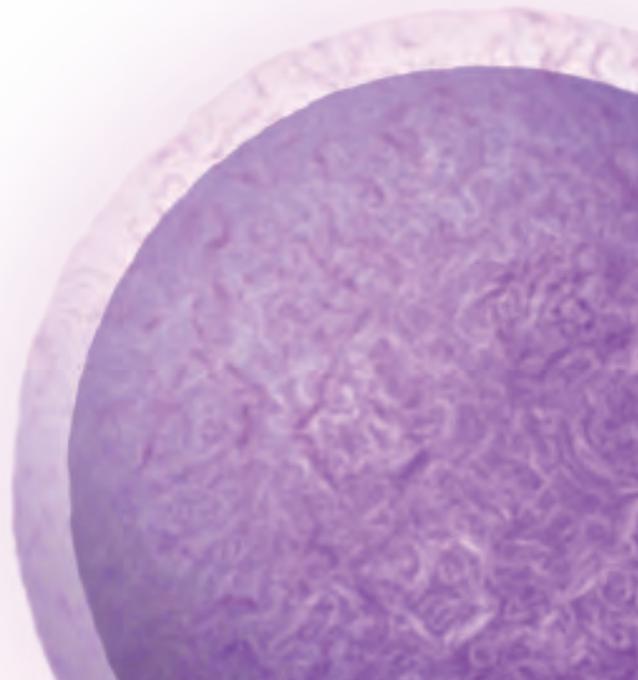


Figura 32. Actividad enzimática de PSA en el LF de mujeres del Grupo Infértil, distinguiendo entre embarazo y no embarazo. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. SOP (n=8), END (n=7), FT (n=13) y ESCA (n=11).

V. DISCUSIÓN



1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LOS TRATAMIENTOS DE FIV

Se calcula que la esterilidad afecta a unos 70 u 80 millones de parejas en todo el mundo y que un 15% de las que viven en países desarrollados consultarán alguna vez por ello (Mendoza *et al.*, 2012). Uno de los principales factores del descenso de la capacidad reproductiva femenina es el incipiente retraso de la maternidad (Minaretzis *et al.*, 1998; Bonilla-Musoles, 2010). De hecho, en nuestro centro de fertilidad hemos observado como la edad de las pacientes en 2003 se situaba en torno a los 34,17 años, encontrándonos actualmente ante una media de 37,23 años. La introducción de las TRA ha aumentado las posibilidades de tratamiento efectivo, convirtiéndose en una opción básica para las parejas estériles. Hoy en día, debido tanto a su capacidad terapéutica como a los resultados alcanzados, la técnica más utilizada es la fecundación *in vitro*. En el subapartado 2.2 de Materiales y Métodos se encuentra detallado todo el proceso que llevamos a cabo durante el desarrollo de un ciclo de FIV.

1.1. Variables epidemiológicas y de estimulación.

De forma rutinaria y durante el tratamiento de FIV se recogen una serie de parámetros clínicos que aportan información sobre la respuesta a la estimulación farmacológica. Estos parámetros son la edad materna, el número de días de suministro de análogo y gonadotropinas, la dosis total de FSH y LH, el estradiol sérico y la cantidad de folículos preovulatorios observados ecográficamente (Tabla 6; pág. 65).

A principios de este siglo, Goverde declaró que la edad de la mujer es el factor más influyente en la probabilidad de embarazo, sea cual sea el tratamiento reproductivo elegido. Teniendo en cuenta la literatura existente, se sabe que la fertilidad femenina alcanza su máximo entre los 20 y los 24 años para disminuir posteriormente de manera uniforme, descendiendo significativamente a partir de los 35 años y de forma muy acentuada pasados los 40 (Remohí *et al.*, 2012; Kovac *et al.*, 2013). Si nos referimos a nuestros resultados, observamos como dentro del Grupo Control las mujeres que quedaron embarazadas presentaban una edad significativamente inferior a las que no resultaron gestantes, hallazgo que presumiblemente era de esperar. Sin embargo, en el Grupo Infértil aunque se aprecia un ligero descenso de edad en el subgrupo embarazo respec-

to al de no embarazo este no llega a ser estadísticamente significativo, lo cual se debe a la homogeneidad en cuanto a la variable edad del G.I. Cuando comparamos ambos grupos entre sí, detectamos que el subconjunto de mujeres gestantes del G.C. presentó una media de edad significativamente inferior a la de las pacientes del G.I., hecho que no nos sorprendió ya que las mujeres que acuden a consulta por problemas reproductivos de origen femenino suelen tener una media de edad en torno a los 34 y 37 años.

Respecto al protocolo de estimulación ovárica controlada, cuando se comparó el número de días de suministro de análogo se detectó un aumento estadísticamente significativo en el subgrupo de mujeres embarazadas del G.I. frente a aquellas pertenecientes al G.C. Esta diferencia es debida a que en el Grupo Infértil el protocolo de estimulación mayoritariamente elegido fue el largo (administración de análogo desde 7 días antes del ciclo menstrual) mientras que en el Grupo Control el protocolo corto (administración de análogo desde el primer día de la regla) fue el más utilizado. Del mismo modo, cuando se cotejó la duración del estímulo mediante el uso de gonadotropinas, hallamos una disminución estadísticamente significativa en el número de días de administración en el subgrupo de pacientes embarazadas del G.I. respecto al subconjunto de mujeres gestantes del G.C., resultado que seguramente sea consecuencia de las propias características de ambos grupos. Sabemos que a medida que aumenta la edad materna las reserva ovárica disminuye (Richardson *et al.*, 1987; Faddy *et al.*, 1992; Gougeon *et al.*, 1994) y se ha descrito cómo en mujeres de baja reserva disminuye el tiempo de estímulo a consecuencia de una aceleración en el proceso de foliculogénesis (Felip *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2013), por lo que las mujeres del G.I. (y las no embarazadas del G.C.) al presentar una edad más elevada que las embarazadas del Grupo Control verán en cierto modo comprometida su reserva y, como consecuencia, el tiempo de administración de gonadotropinas disminuirá.

En resumen, respecto al G.C. el protocolo de estimulación ovárica para las mujeres gestantes del G.I. se ha caracterizado por un mayor número de días de suministro de análogo y una menor duración de la administración de gonadotropinas.

En cuanto a la cantidad de FSH suministrada en cada grupo, aunque se aprecia un aumento en el G.C. en comparación con el G.I. esta diferencia no alcanza la significancia estadística. Pero sí la detectamos cuando analizamos la concentración total de LH administrada, ya que en el subconjunto de mujeres gestantes del G.C. se observó un incremento respecto al G.I. que resultó ser estadísticamente significativo. La explicación a este hecho puede ser debida a que en un ciclo ovulatorio normal los niveles de FSH y LH van aumentando de forma coordinada, cuando en un protocolo de estimulación se pautan elevadas dosis de FSH (como ocurre en el Grupo Control) se produce un desnivel hormonal y el uso de análogos puede no ser suficiente para evitar la consecuente luteinización ovárica precoz (Moore *et al.*, 2011; Remohí *et al.*, 2012). Con el fin de solucionar dicho problema se administran dosis elevadas de LH para equiparar los niveles ambas

hormonas (Filicori, 2003; Filicori *et al.*, 2003; Assidi *et al.*, 2013) y esto es lo que creemos que ha sucedido en el G.C. respecto al resto de pacientes.

El control de la estimulación ovárica se realiza mediante la medición del estradiol sérico y la valoración ecográfica del desarrollo folicular. El por qué se lleva a cabo la determinación del estradiol para calcular la respuesta a la estimulación farmacológica tiene su base en la denominada teoría bicelular de la producción ovárica de estrógenos, según la cual durante los estadios finales del crecimiento folicular las células de la teca, en respuesta a la LH, producen andrógenos a partir de colesterol. Los andrógenos difunden hasta las células de granulosa donde, mediante un fenómeno de aromatización estimulado por FSH, se transforman en estrógenos que son liberados al torrente sanguíneo y a la cavidad antral (Cheng *et al.*, 2002; Lovekamp-Swan y Davis, 2003; Hamel *et al.*, 2005; Speroff y Fritz, 2006). Además de sus múltiples efectos sistémicos, los estrógenos actúan de forma sinérgica con las gonadotropinas promoviendo el crecimiento ovárico, la formación de receptores de LH y FSH e incluso la actividad aromatasa. En resumen, existe una clara correspondencia entre: número de folículos, producción de estrógenos, concentración de estradiol sérico y número de ovocitos obtenidos. Así pues, cuando se comparó la concentración de estradiol y el número de folículos ecográficos no se observaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual nos viene a decir que el protocolo de estímulo empleado en los diferentes grupos ha sido el adecuado ya que ha generado una norma respuesta. Todas las pacientes (con independencia del número de días de suministro de análogo y gonadotropinas así como de la dosis total de FSH / LH administrada) han respondido uniformemente al tratamiento, cumpliendo con uno de los principales objetivos de los protocolos de estimulación ovárica controlada.

En conclusión, los resultados que hemos obtenido son debidos a que cada protocolo de estímulo se ha adaptado no sólo al perfil inicial de cada mujer (edad, reserva folicular, tipo de infertilidad, capacidad reproductiva previa, etc.) sino a la respuesta ovárica que día a día ha ido generando la propia paciente al tratamiento.

1.2. Variables de laboratorio

En el laboratorio de embriología clínica trabajamos con una serie de variables que nos aportan gran información respecto a la evolución del ciclo y a las probabilidades de éxito del mismo. En este apartado analizaremos: el número de óvulos por punción, el porcentaje de madurez ovocitaria, la tasa de fecundación, la calidad embrionaria y el número de embriones transferidos y congelados (*Tabla 7; pág. 67*).

Si nos fijamos en el número total de ovocitos obtenidos por paciente, observamos como dentro del Grupo Control aquellas mujeres que resultaban embarazadas presentaban un aumento estadísticamente significativo respecto a las que no conseguían gestación. Dato que podríamos esperar ya que las pacientes del subgrupo embarazo tenían una edad media significativamente inferior a la del subgrupo no embarazo, por lo que respondieron mejor al tratamiento farmacológico, lo cual se tradujo en una mayor cantidad de folículos reclutados (mayor número de óvulos obtenidos). Destacar que la media del número de ovocitos por punción alcanzada es muy similar a la media nacional, dato que recoge la Sociedad Española de Fertilidad en su registro anual (Registro_SEF, 2013). El hecho de que la media del número de ovocitos exceda a la de folículos observados previamente se debe a que en la última ecografía no se suelen contar todos los folículos en desarrollo sino sólo aquellos con un diámetro igual o superior a 17 mm, que serán los que presumiblemente contengan oocitos secundarios, es decir, óvulos maduros (Nogueira *et al.*, 2006). Consecuentemente, cuando a la variable “número de ovocitos por punción” se le aplica la “tasa de madurez” se obtienen unos resultados similares a la variable “número de folículos preovulatorios”.

No todos los óvulos logrados tras un proceso de estimulación resultan ser maduros. Para convertirse en oocito secundario, el oocito primario debe superar un duro proceso de maduración citoplasmática y nuclear (Picton *et al.*, 1998; Polanski *et al.*, 1998; Baruffi *et al.*, 2004; Rodriguez y Farin, 2004). Según el último registro de la SEF, las donantes de óvulos presentan un porcentaje de madurez ovocitaria del 81% mientras que en los ciclos donde se utilizan ovocitos propios la tasa es del 79,70% (Registro_SEF, 2013). Nosotros hemos conseguido un porcentaje de madurez global del 87,05%. Además, cabe destacar que el subconjunto de mujeres embarazadas del G.I. reveló una tasa de madurez ovocitaria superior a la del resto de subgrupos, de hecho, la diferencia alcanzó la significancia estadística respecto al subconjunto de mujeres no gestantes del G.C. Dicho elevado porcentaje de madurez puede ser debido tanto a una buena pauta de estimulación ovárica como a la edad materna.

Al igual que en el caso de la madurez, no todos los óvulos maduros resultan ser fecundados. Es más, el espermatozoide juega un papel fundamental en el proceso de fertilización por lo que estaríamos ante un fenómeno de intercomunicación y entendimiento constante entre ambos gametos (Choe *et al.*, 2012; Oku-

daira y Funahashi, 2013; Van Blerkom y Caltrider, 2013). Teniendo en cuenta los datos aportados por la Sociedad Española de Fertilidad, la tasa de fecundación en ovocitos de donante así como propios es prácticamente idéntica, 67,70% y 67,80% respectivamente (Registro_SEF, 2013). En nuestro estudio referimos un porcentaje de fecundación unos 10 puntos superior y no detectamos diferencias intergrupales de significancia estadística.

Un indicador sumamente predictivo del éxito del tratamiento es sin duda la calidad embrionaria, la cual viene determinada por una serie de parámetros morfocinéticos de entre los que destacaremos el ritmo de división embrionaria, el número y la morfología celular así como el porcentaje de fragmentación y la presencia de vacuolas en los blastómeros (Prados *et al.*, 2007; Ardoy y Calderón, 2008; Cruz *et al.*, 2012; Campbell *et al.*, 2013). Durante los días 2 y 3 post-captación se lleva a cabo una clasificación morfológica que consiste en asignar a cada embrión una determinada categoría (A, B, C o D) en función de sus características evolutivas (A y B corresponderían a embriones de buena calidad). Según los datos de este estudio, nuestro porcentaje de embriones de buena calidad en D+2 se sitúa en torno al 88,74% para descender en D+3 al 69,46%, tasas relativamente similares a las descritas en la literatura (Hohmann *et al.*, 2003; López, 2008; Fauque *et al.*, 2013; Mantikou *et al.*, 2013). Es más, cuando comparamos los distintos subgrupos entre sí, no apreciamos diferencias estadísticamente significativas ni en D+2 ni en D+3. Consecuentemente, según el indicador “calidad embrionaria” la probabilidad de embarazo de los cuatro subgrupos será muy parecida. No obstante, no hay que olvidar que las posibilidades de gestación en la especie humana dependen tanto de las características embrionarias como de la receptividad endometrial, factor a tener en cuenta y cuyo conocimiento hoy en día resulta todavía insuficiente (Hunault *et al.*, 2002; Ardoy y Calderón, 2008; Palomino *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

El hecho de que no existan diferencias significativas respecto a la calidad embrionaria se traduce en un número similar de embriones transferidos y congelados en los cuatro subgrupos estudiados. Más concretamente, la media global de embriones transferidos por transferencia ha sido de 2,23, cifra muy similar a la de los últimos registros de la SEF. En el año 2003 se prohibió en nuestro país la transferencia de más de 3 embriones al útero materno (Ley_45/2003, 2003) y desde entonces se ha descrito una tendencia clara en la política de transferencia embrionaria; ha disminuido considerablemente la transferencia intrauterina de 3 embriones y ha aumentado significativamente la de 2 (en el año 2011 aproximadamente el 76,20% de las transferencias realizadas fueron de 2 embriones). Es más, el futuro de la reproducción asistida se dirige hacia la *single embryo transfer*, es decir, la transferencia selectiva de un único embrión (Thurin *et al.*, 2004; Steinberg *et al.*, 2013; Yilmaz *et al.*, 2013). Política muy arraigada en los países nórdicos que pretende extenderse hacia el resto de Europa (Olivius *et al.*, 2008; Poikkeus y Tiitinen, 2008; Sundstrom y Saldeen, 2009; Niinimaki *et al.*, 2013). Una vez realizada la transferencia, cuando quedan embriones de buena calidad estos se congelan (Ley_14/2006, 2006) y en nuestro caso a cada paciente se le ha congelado una media de 1,70 embriones por ciclo.

En resumen, el hecho de que no se observen grandes divergencias entre el Grupo Control y Grupo Infértil respecto a las variables de laboratorio analizadas nos lleva a pensar en que además de haberse conseguido una norma respuesta a la estimulación farmacológica, se ha logrado una uniformidad en el desarrollo evolutivo de los ciclos de FIV.

1.3. Tasa de embarazo por transferencia.

El principal objetivo de los tratamientos de reproducción asistida es la consecución del embarazo. Tanto en el G.C. como en el G.I. se ha alcanzado una tasa (global) de gestación por transferencia muy similar, que podría ser consecuencia directa de la semejanza lograda en ambos grupos respecto a la calidad y número de embriones transferidos.

Grupo Control

Como ya sabemos, la fertilidad femenina alcanza su máximo entre los 20 y los 24 años para disminuir posteriormente de forma uniforme. Los datos que obtenemos de la literatura con respecto a las tasas de embarazo por ciclo de FIV iniciado, advierten de una marcada mengua de la capacidad gestante de la mujer a medida que aumenta su edad. Las mujeres menores de 34 años presentan la tasa de embarazo más alta, cercana al 40%, sin embargo, en un rango de edad 5 años el porcentaje de embarazo decae drásticamente, disminuyendo en 10 puntos, tendencia que va a mantenerse a lo largo de la vida reproductiva materna (*Fig. 5; pág. 18*). De hecho, la tasa de gestación en mujeres de más de 45 años es prácticamente nula ya que nos acercamos a la edad de comienzo de la menopausia (Cyrus y Lee, 2013; Dolleman *et al.*, 2013; NIH, 2013).

En la presente investigación también hemos observado un decrecimiento de la fertilidad femenina a medida que aumenta la edad de la paciente (*Fig. 13; pág. 68*). Hay que tener en cuenta que el porcentaje de embarazo analizado en nuestro caso, a diferencia de los datos de la SEF, es por transferencia realizada y no por ciclo de FIV iniciado lo que, en parte, explicaría las superiores tasas de gestación alcanzadas. Más concretamente, en el subgrupo de mujeres de 20 a 24 años el porcentaje de embarazo se situó en el 90% para descender y mantenerse en torno al 65% en los subgrupos 2 y 3, en G4 ascendió sorprendentemente y finalmente en G5 se detectó un decaimiento estadísticamente significativo del porcentaje de gestación respecto a los otros cuatro subgrupos. A nivel global, la tasa de embarazo por transferencia del Grupo Control fue del 60% y si nos fijamos en el rango de edad comprendido entre los 20 y los 34 años (Grupo Fértil) este porcentaje aumentó al 72,97%.

Grupo Infértil

Tal y como ha quedado reflejado en la Introducción, la capacidad reproductiva se ve claramente afectada por distintos tipos de patologías. A continuación se describirán los porcentajes de gestación de los cuatro problemas reproductivos estudiados: SOP, END, FT y ESCA.

Por un lado, lo primero que queremos subrayar es que en el Grupo Infértil se obtuvo un 59,52% de embarazo por transferencia, cifra prácticamente idéntica a la del Grupo Control. Por otro lado, conocedores de la importancia del parámetro “edad materna” para la consecución del embarazo, hemos comprobado que no existían diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad media de las pacientes pertenecientes a cada subgrupo analizado, en concreto, la media de edad del G.I. se situó en 34,68 años. Respecto a los resultados obtenidos, las mujeres afectas de SOP alcanzaron la menor tasa de embarazo por transferencia (25%) mientras que aquellas que padecían END o FT lograron unos porcentajes prácticamente idénticos a los subgrupos 2 y 3 del G.C., por último, las pacientes diagnosticadas de ESCA mostraron una tasa de gestación elevada, muy parecida a la del Grupo Fértil y estadísticamente superior a la de SOP (*Fig. 14; pág. 69*). Más adelante, en el subapartado 2.4 se discutirán conjuntamente estos y otros resultados.

2. REGULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y FERTILIDAD

Los primeros trabajos relacionados con el estudio de la actividad peptidásica, su ubicación, características bioquímicas y sustratos, se remontan a principios de la década de los años 60 del siglo pasado, pero posiblemente el verdadero interés por el estudio de la misma surgió a finales de la década de los 70 con el descubrimiento de que la inhibición de la ACE tenía efectos antihipertensivos (Ondetti y Cushman, 1977). A partir de este momento se multiplicaron las publicaciones relacionadas con el análisis de los enzimas proteolíticos y la regulación de sus péptidos bioactivos, en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, tratando además de encontrar aplicaciones clínicas. Destacar que la mayoría de los estudios estuvieron encaminados a la descripción de las actividades enzimáticas en el sistema nervioso central, no en vano, la década de los años 90 fue declarada oficialmente como “la década del cerebro”. Actualmente existe un nutrido número de estudios sobre actividad peptidásica en tejidos tan diversos como: músculo esquelético, pulmón, corazón, hígado, riñón, intestino, próstata, etc. (Sentandreu y Toldra, 2007; Singh *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2010; Pérez, 2011; Larrinaga *et al.*, 2012; Thorek *et al.*, 2013).

Respecto al LF, las primeras investigaciones datan de principios de 1970, cuando un grupo austriaco determinó la actividad de fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glutamato oxalacetato transaminasa, leucina aminopeptidasa, aldolasa, deshidrogenasa láctica (LDH), isoenzima 1 LDH y malato deshidrogenasa en el LF de folículos pre-antrales y folículos antrales maduros. Actividad que compararon con la encontrada en quistes ováricos y suero (Caucig *et al.*, 1970, 1972; Breiten *et al.*, 1973). Hasta 1988 no se volvió a analizar la presencia enzimática en LF, más concretamente, fue el grupo liderado por Seliger quien describió por vez primera actividad DPPIV en el fluido folicular de pacientes sometidas a intervenciones ginecológicas. Casi diez años más tarde se consiguió purificar PEP del líquido folicular de ovarios de cerda, donde se refirió una mayor actividad de PEP tanto en el LF como en las células de la granulosa de folículos antrales respecto a folículos antrales maduros (Kimura *et al.*, 1997, 1998). Así pues, en esta Memoria se ha tratado de describir la actividad proteolítica de nueve peptidasas en el líquido folicular humano, es necesario señalar que la mayoría de estas enzimas no han sido previamente descritas en dicho fluido.

A pesar de los estudios preliminares en LF, la gran mayoría de trabajos donde se relaciona actividad peptidásica y fertilidad se focalizan en el varón. En 2002 Fernández y colaboradores describieron los niveles de actividad aminopeptidásica en diversas fracciones de semen humano normozoospermico. Los altos valores observados en las distintas fracciones (líquido seminal, prostasomas, fracción espermática citosólica y fracción de membrana), sugirieron que tanto las peptidasas como sus sustratos naturales podrían estar implicados en la fisiología seminal a través de la regulación de péptidos fisiológicamente activos, tan-

to en testículo como en fluido espermático como en el propio espermatozoide. Posteriormente, limitaron su estudio a los enzimas reguladores de los niveles encefalínérgicos, es decir, PSA, APN y NEP. Según sus resultados, la actividad de la NEP quedó restringida a la membrana de los prostasomas y no se detectó actividad para PSA en ninguna de las fracciones seminales mientras que APN fue la única enzima presente en todas las fracciones del eyaculado (Subirán *et al.*, 2008), mostrando una actividad muy superior a la encontrada en cerebro, riñón, corazón, músculo o pulmón (Fernández *et al.*, 2002; Subirán *et al.*, 2011). Con respecto al resto de peptidasas, las enzimas degradadoras de TRH (PGI y PEP) han sido localizadas en todas las fracciones seminales de varones normozoopérmicos (Valdivia *et al.*, 2004) y se ha detectado actividad DPPIV en plasma seminal y en la fracción espermática (capacitada) de pacientes astenozoopérmicos (Ramón, 2011).

2.1. Actividad enzimática de las peptidasas en el LF humano

En nuestro estudio hemos analizado la actividad enzimática de nueve peptidasas en el LF de mujeres sin problemas de fertilidad y de pacientes que sufrían alguna patología reproductiva. Pues bien, tanto en mujeres sanas como infértiles hemos hallado actividad enzimática para las peptidasas: APN, PSA, APB, DPPIV, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI.

Señalar que estos resultados no pueden ser comparados de forma cuantitativa con trabajos de fertilidad previos, ya que la muestra elegida en nuestro estudio es el LF mientras que en dichos estudios el medio elegido era el semen humano. Así, tanto Fernández (2002) como Subirán (2008, 2011) detectaron que en el eyaculado de varones normozoopérmicos los mayores niveles de actividad peptidásica correspondían a la APN. Es más, se considera que APN podría constituir entre el 0,5 y el 1% del total proteico del plasma seminal humano (Huang *et al.*, 1997). Sin embargo, en muestras astenozoospermicas capacitadas se ha observado que los mayores niveles de actividad correspondían a la DPPIV, seguida muy de cerca de la APN, mientras que las enzimas PEP y APB mostraban niveles similares entre sí pero unas 8 ó 9 veces inferiores a los primeros descritos, finalmente para la PGI y la APA los valores alcanzados eran incluso menores, llegando a ser entre 13 y 18 veces inferiores a los detectados para DPPIV y APN respectivamente (Ramón, 2011).

Con respecto a nuestros hallazgos, y al igual que ocurre en el fluido seminal de varones normozoospermicos, la actividad más elevada en LF pertenece a la enzima APN. Siendo muy similar a la registrada para la PSA, la cual no ha sido detectada ni en semen ni en muestras seminales capacitadas. Más concretamente, cuando analizamos estas dos enzimas en el Grupo Control obtuvimos unos valores de actividad prácticamente idénticos (*Fig. 15; pág. 71*), fue en el Grupo Fértil donde detectamos que la APN presentaba una actividad ligeramente superior a la PSA (*Fig. 16; pág. 72*). No obstante, en el Grupo Infértil los papeles de estos dos enzimas se invirtieron, pues PSA fue la que presentó unos niveles de

actividad un tanto superiores a los alcanzados por la APN (Fig. 27; pág. 86). Estos y otros hallazgos serán analizados más adelante en su apartado correspondiente. En referencia al resto de peptidasas y basándonos fundamentalmente en los resultados obtenidos en el Grupo Control: APB y DPPIV fueron las siguientes enzimas con mayor actividad en LF humano, valores muy similares entre sí que llegaron a ser aproximadamente 3 veces inferiores a los obtenidos para APN y PSA. A continuación encontramos APA y Cys-AP, de nuevo con valores parecidos entre sí pero esta vez hasta 6 veces inferiores a los de las principales enzimas descritas. Por último, destacar que Asp- AP, PEP y PGI fueron las peptidasas que registraron los menores niveles de actividad en LF.

De todos los péptidos controlados por peptidasas, el grupo de los EOP ha sido posiblemente el más ensayado en relación con la fertilidad humana. El sistema opioide se encuentra ampliamente distribuido en órganos y tejidos del tracto genital masculino y femenino, jugando un importante papel en la función reproductora (Sun y Schatten, 2006; Agirregoitia *et al.*, 2006, 2012a; 2012b; Subirán *et al.*, 2012). Actualmente se desconoce el mecanismo exacto a través del cual el sistema opioidérgico influye en la fertilidad. Mucho se ha estudiado a nivel masculino pero la cantidad de trabajos que relacionan los opioides con la fertilidad femenina es hoy en día insuficiente. Los EOP, además de actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis modulando la secreción de GnRH, FSH y LH (Fabbri *et al.*, 1989; Dobson y Smith, 2000; Kaminski *et al.*, 2003), también tienen una acción directa en el folículo ovárico, como se ha comprobado analizando tejidos bovinos y porcinos (Dell'Aquila *et al.*, 2002; Kaminski *et al.*, 2003). Cabe destacar que los opioides endógenos se encuentran presentes en el líquido folicular, es más, trabajos recientes han descrito la presencia de receptores de EOP tanto en las células de la granulosa como en el propio ovocito humano, por lo que podrían desempeñar un papel fundamental en la maduración ovocitaria actuando vía receptor (Agirregoitia *et al.*, 2012a; Peralta, 2012). Todo ello, constituiría al líquido antral como una fuente de EOP donde los enzimas que regulan su actividad (las peptidasas) tendrían una acción decisiva tanto en el desarrollo como en la calidad del ovocito.

Uno de los opioides presentes en el LF es la β -endorfina, sus acciones han sido estudiadas en modelos animales, lo cual nos ha permitido conocer su participación en procesos tales como la regulación del desarrollo folicular o la inhibición de la maduración ovocitaria (Sciorsci *et al.*, 2000). En ratas, la β -endorfina es producida localmente en los ovarios (Sanders *et al.*, 1990), donde modula la síntesis de prostaglandinas, la ovulación y el número de oocitos ovulados por ciclo (Falletti *et al.*, 1995, 2003; Dell'Aquila *et al.*, 2002; Polisseni *et al.*, 2005). También se ha observado que hormonas como la LH inhiben los efectos de las β -endorfinas (Kaminski *et al.*, 2003; Dell'Aquila *et al.*, 2008). Trabajos realizados en humanos han detectado una disminución de β -endorfina en el líquido folicular justo antes de la maduración ovocitaria (Tam *et al.*, 1988). En 1995 el grupo liderado por Hameda observó en el ovario porcino una disminución de los sitios de unión específicos para naloxona durante el crecimiento folicular y la maduración, arrojando luz sobre la relación existente entre folículogénesis y péptidos opioides. En el

LF humano también se ha descrito la presencia de otros opioides, como son la met-enkefalina y la α -neonendorfina, cuya concentración varía a lo largo del ciclo menstrual femenino (Petraglia *et al.*, 1986; Aleem *et al.*, 1987; Facchinetti *et al.*, 1988, 1989; Slomczynska *et al.*, 1997; Kaminski *et al.*, 2000, 2003). Además, distintos autores han demostrado el efecto de los péptidos opioides sobre las MAP-quinasas, localizadas en el ovocito e implicadas en la reorganización y distribución de los microtúbulos para formar el huso acromático, participando por tanto en la maduración ovocitaria (Dell'Aquila *et al.*, 2002; Roth y Hansen, 2005; Sakharkar *et al.*, 2006; Sun y Schatten, 2006).

Nuevamente, y al igual que ocurre a nivel masculino, nuestros resultados muestran la importancia de los EOP en los procesos reproductivos, ya que son dos de los principales enzimas encargados de su degradación (APN y PSA) los que presentan mayor actividad en líquido folicular. Ambas peptidasas participan en la regulación de biopéptidos tales como encefalinas, dinorfinas y endorfinas entre otras.

La enzima APN, a pesar de estar considerada como una aminopeptidasa integral de membrana, también se encuentra presente en forma soluble en diferentes fluidos corporales como son: el plasma sanguíneo, la orina, el líquido seminal, la fracción espermática capacitada (Jung *et al.*, 1984; Erbeznik y Hersh, 1997; Antczak *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Ramón, 2011; Subirán *et al.*, 2011) o el líquido folicular, tal y como demuestra esta Memoria. En el ovario se ha detectado actividad enzimática tanto a nivel de membrana como en forma soluble (Carrera *et al.*, 2009). Más concretamente, en el folículo se ha registrado actividad APN en la membrana de las células de la teca interna y actividad APN-like en la membrana de las células de la granulosa, sugiriendo que existe otro tipo de aminopeptidasa presente en dicho compartimento celular (Fujiwara *et al.*, 1999). Lo comentado anteriormente junto con los resultados que hemos obtenido, nos conduciría a pensar que prácticamente toda la APN presente en el folículo se encontraría en su forma soluble en el líquido antral. La APN podría resultar ser una enzima clave en la regulación de la fertilidad femenina y masculina, tal y como demuestra su elevada actividad en el LF de mujeres fértiles, en el fluido seminal de varones normozoospermicos y en la fracción espermática de pacientes astenozoospermicos (Fernández *et al.*, 2002; Irazusta *et al.*, 2004; Ramón, 2011; Subirán *et al.*, 2011; Roméu *et al.*, 2011, 2012). Recientes estudios revelan cómo la APN regula la movilidad espermática a través de un mecanismo que implica al sistema opioide (Subirán *et al.*, 2011, 2012; Agirregoitia *et al.*, 2012b); sin embargo, no sabemos de qué manera incide esta enzima en la capacidad reproductiva de la mujer.

La PSA es una aminopeptidasa citosólica que también ha sido hallada en el medio extracelular (Hersh y McKelvy, 1981; Tobler *et al.*, 1997; Stoltze *et al.*, 2000). A diferencia de los resultados obtenidos en semen humano, donde no se detectó actividad para la PSA en ninguna de las fracciones del eyaculado (Fernández *et al.*, 2002), en el LF resulta ser una de las enzimas con mayor actividad proteolítica. A lo largo de este capítulo iremos viendo cómo la peptidasa

PSA no sólo tiene la particularidad de expresarse activamente en el LF, sino que además resulta ser una enzima clave de la fertilidad femenina en situaciones fisio-patológicas.

Como se ha comentado previamente, en estudios llevados a cabo en muestras capacitadas de varones astenozoospermicos los mayores niveles de actividad enzimática correspondían a la DPPIV (Ramón, 2011), curiosamente, en nuestro caso a pesar de detectar elevada actividad para dicho enzima (similar a la APB) resulta ser unas 3 veces inferior a la de las principales enzimas descritas (APN y PSA). A nivel ovárico, esta seril-aminopeptidasa se encuentra débilmente expresada en la membrana de las células luteínicas de la teca interna que conforman el folículo. Tras la ovulación, la DPPIV también se expresa en la membrana de las células luteinizadas de la granulosa que forman el cuerpo lúteo, es más, si se produce embarazo dicha expresión aumenta de forma considerable por lo que la DPPIV se perfila como uno de los principales enzimas que regulan la concentración peptídica extracelular del cuerpo lúteo (Imai *et al.*, 1992c; Fujiwara *et al.*, 1992b, 1999). Con respecto a su acción enzimática, degrada péptidos biológicamente activos como: la sustancia P, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, el péptido liberador de la gastrina humana, el polipéptido pancreático humano, el péptido del lóbulo corticotropina-like y la (Tyr-) melatostatina. También es un sustrato de la DPPIV la cadena α de la hCG y, probablemente, las cadenas α de FSH, LH y TSH. Actualmente se desconoce si la eliminación de dipéptidos del extremo N-terminal de la hCG tiene algún significado fisiológico en el desarrollo de la función de las células luteínicas, lo que no genera dudas es que la pérdida del dipéptido deja estas proteínas a merced del resto de aminopeptidasas. De igual modo, un gran número de citoquinas son susceptibles a la degradación por parte de DPPIV: la IL-1 β , la IL-2, el factor estimulante de la colonia de macrófagos-granulocitos, la eritropoyetina y la proteína 1a inflamatoria de macrófagos (Flentke *et al.*, 1991; Havre *et al.*, 2008). Lo mencionado anteriormente nos podría conducir a pensar que durante la foliculogénesis la mayor expresión de DPPIV se lleva a cabo en la cavidad antral, y que tanto dicho enzima como sus sustratos tendrían mayor importancia a nivel de cuerpo lúteo que a nivel folicular, por lo que desempeñarían una mayor implicación en el mantenimiento del embarazo que en la propia formación y desarrollo del ovocito. Además, los biopéptidos que la DPPIV regula tendrían menor importancia en la fertilidad femenina que en la masculina, ya que en el varón ejercen un papel fundamental en la movilidad espermática, tal y como se ha observado en muestras de pacientes astenozoospermicos (Ramón, 2011).

De similar actividad a la anterior, la APB es una peptidasa que aunque inicialmente se describió como una proteína citosólica, posteriormente se ha detectado en membrana celular así como en la matriz extracelular a modo de enzima de secreción (Lauffart *et al.*, 1988; Tanioka *et al.*, 2003; Cadel *et al.*, 2004; Varona *et al.*, 2007). De hecho, en el ovario de rata se ha observado actividad para la APB tanto a nivel de membrana como en forma soluble. Entre sus sustratos se encuentran: encefalinas, bradiquinas, somatostatina y Ang III (péptido fundamental del sistema RAS) (Carrera *et al.*, 2009). Con respecto a la fertilidad masculina,

se ha sugerido la implicación de esta exometalopeptidasa en los mecanismos de procesamiento de proproteínas y propéptidos en el curso de la diferenciación espermiática (Cadel *et al.*, 1997). A nivel folicular, destacaremos su participación en la regulación de la concentración de EOP en el LF así como su participación en el sistema RA donde, junto con la APN, participa en la degradación de Ang III a Ang IV (Ward *et al.*, 1990; Szczepanska-Sadowska, 1996).

En el líquido antral la enzima APA presenta valores hasta 6 veces inferiores a los de las principales peptidasas descritas. A pesar de ser una ectoenzima tipo II también ha sido definida como una peptidasa soluble del medio extracelular, lugar al que es liberada gracias a la acción de otras proteínas de membrana (Carrera *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2006). A nivel ovárico se ha observado presencia de APA en la membrana de: el ovocito, las células de la granulosa, las células de la teca y las células luteínicas (Harata *et al.*, 2006). Además, nuestro estudio ha confirmado que también se encuentra presente en forma soluble en el LF. Gracias a esta amplia distribución se ha especulado con la posibilidad de que su sustrato intervenga en fenómenos como la foliculogénesis y la función del *corpus luteum* (Harata *et al.*, 2006). La APA es considerada unas de las angiotensinas más importantes que existen, no en vano es uno de los principales reguladores de la concentración de Ang II en el ovario humano. Las enzimas APA y Asp-AP son las encargadas de metabolizar Ang II en Ang III (Nagatsu *et al.*, 1965), que a su vez será convertida en Ang IV por la APN y la APB (como hemos comentado anteriormente). La Ang II es un importante regulador de la presión arterial por lo que podría controlar el flujo sanguíneo que, a través de la teca interna, llega al folículo. Además, la Ang II y la Ang III son dos componentes vitales del RAS (Hirschi y Damore, 1996; Schlingemann *et al.*, 1996), sistema de comunicación celular que se ha erigido como uno de los principales reguladores de la esteroidogénesis ovárica. Es más, Harata y colaboradores (2006) observaron cómo al comparar ratas sanas con ratas a las que se les había inducido cáncer mamario, éstas últimas presentaban en ovario un aumento significativo de la actividad soluble de las peptidasas APA y Asp-AP, aumento que iba acompañado de una sobreproducción basal de progesterona.

La enzima Cys-AP presenta valores parecidos a los de la APA y es una peptidasa transmembranal que se transforma en soluble mediante la hidrólisis de secretasas hoy en día no identificadas (Nagasaka *et al.*, 1997; Ofner y Hooper, 2002; Nomura *et al.*, 2005). Durante el embarazo es liberada de la membrana de las células del trofoblasto placentario al torrente sanguíneo materno, fenómeno que sólo ha sido descrito en humanos. De hecho, la secuencia Phe¹⁵⁴ Ala¹⁵⁵, identificada como la zona de corte para la liberación de la forma soluble, sólo se haya presente en miembros de la *familia hominidae* (Pham *et al.*, 2009). A nivel enzimático, la Cys-AP se encuentra regulada por la insulina y sus principales sustratos son: oxitocina, vasopresina, somatostatina y Ang III. Considerada una de las reguladoras más importantes de oxitocina y vasopresina en las gestantes, se le ha identificado como una peptidasa clave para el mantenimiento del embarazo y la modulación del dolor durante el parto (Rogi *et al.*, 1996; Horio *et al.*, 1999). Con respecto a su localización en el ovario, el grupo liderado por

Demaegdt identificó en 2004 Cys-AP en la membrana de las células ováricas del *hamster* Chino pero, poco o nada se sabe acerca de su función en dicho compartimento. El trabajo que presentamos es el primer estudio llevado a cabo en mujeres que demuestra la presencia de Cys-AP en el ovario humano, concretamente, en la fracción soluble del LF. Su presencia en el líquido antral podría deberse a un intento por parte del folículo de preparar la cavidad endometrial para la recepción del cigoto, evitando posibles contracciones uterinas durante la implantación embrionaria.

El resto de las enzimas ensayadas: Asp-AP, PEP y PGI, presentan actividades muy inferiores a las de APN y PSA. Si bien en la fracción espermática de varones astenozoospermicos PEP resultó ser el tercer enzima de mayor actividad, en las muestras de líquido folicular presenta unos valores muy bajos, de hecho, de los nueve enzimas analizados sólo PGI alcanza niveles inferiores. Por todo ello, se deduce que tanto la peptidasa PEP como la PGI tendrían mayor importancia a nivel espermático que a nivel folicular. O bien, tal y como describieron Kimura y colaboradores (1998), la importancia de la PEP radicaría en las primeras etapas de la foliculogénesis, es decir, en el desarrollo de folículos pre-antrales.

En resumen, tanto los péptidos bioactivos como las peptidasas que los regulan estarían implicados directa o indirectamente en la fertilidad femenina. El trabajo que presentamos es el primer estudio llevado a cabo en mujeres que demuestra una inequívoca presencia de las enzimas APN, PSA, APB, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI en el ovario humano, más concretamente, en su forma soluble en el LF.

2.2. Actividad de las peptidasas en función de la edad de la mujer

Uno de los principales culpables del descenso de la fertilidad femenina es el denominado “envejecimiento ovocitario” (Faddy *et al.*, 1992; Ballesteros *et al.*, 2009; Roméu *et al.*, 2012; Gossett *et al.*, 2013). Problema al que nos enfrentamos constantemente en los centros de reproducción asistida ya que la edad media de la paciente que solicita someterse a un tratamiento de fertilidad es cada vez mayor. Así pues, en este apartado se analizará el comportamiento de las nueve peptidasas en el LF de mujeres sin problemas reproductivos, teniendo en cuenta cinco rangos de edad. La finalidad no fue otra que la de comprobar si el aumento de la edad conlleva algún tipo de modificación en el metabolismo peptídico del líquido folicular. Lo cual demostraría, por un lado, la implicación de este metabolismo en la fertilidad femenina, y por otro, que las alteraciones peptidérgicas acompañarían a la pérdida de la capacidad reproductora. No en vano, a lo largo de los años un gran número de peptidasas han sido implicadas en la senescencia celular. Actualmente, está plenamente reconocida la intervención de las peptidasas en el proceso de envejecimiento del sistema nervioso central pero se desconoce el papel exacto de estas en otros tejidos o fluidos corporales (Jiang *et al.*, 2001; Agirregoitia *et al.*, 2003a).

Con respecto a nuestros resultados, cuando se analizó de manera global la actividad de las nueve enzimas en función de la edad se observó una distribución constante de la actividad en los distintos subgrupos estudiados (*Fig. 16; pág. 72*). Cabe destacar que a partir de los 30-34 años el nivel de actividad de la PSA superó al de la APN, marcando una tendencia que se mantuvo e incluso aumentó a lo largo de la edad reproductiva. Más concretamente, las enzimas APN, DPPIV, APA, PEP y PGI no mostraron cambios significativos de actividad con respecto a la edad mientras que PSA, APB, Cys-AP y Asp-AP sí que lo hicieron. Lo cual demuestra que efectivamente existe una modificación del metabolismo peptídico asociado a la edad y por lo tanto a la fertilidad femenina.

De las enzimas que presentan alteraciones en función de la edad, la Cys-AP y la Asp-AP no revelaron una tendencia clara por lo que no nos atrevemos a especular sobre estos resultados (*Figs. 19 y 20; págs. 75 y 76*), habida cuenta de que el papel principal de la Cys-AP es la regulación de los niveles de oxitocina y vasopresina, biopéptidos no implicados directamente en la fertilidad sino en el mantenimiento del embarazo y en el parto. Además, se debe señalar que las diferencias halladas entre los subgrupos de estudio que alcanzan la significancia estadística son muy pequeñas (5 puntos para la Cys-AP y 2 puntos para la Asp-AP), por lo que sería necesario un tamaño muestral mayor para obtener unas conclusiones válidas.

Para la enzima APB el subconjunto de mujeres de mayor edad mostró un aumento significativo de actividad con respecto a los subgrupos G2 y G4, por lo que parece ser que el incremento de la edad de la mujer se asocia a un aumento paulatino de la actividad de la aminopeptidasa B (*Fig. 18; pág. 74*). Aunque los diferentes estudios realizados hasta el momento no parecen concluyentes, destacaremos que en 2011 Ramón también detectó un aumento significativo de la actividad de la APB para muestras seminales capacitadas a partir de la cuarta hora post-capacitación. Por todo ello, dicho enzima podría establecerse como un marcador de modificación en función del tiempo, no obstante, es imprescindible llevar a cabo una mayor y pormenorizada investigación tanto a nivel masculino como femenino.

En referencia al tema que nos ocupa, la peptidasa PSA resulta ser una enzima clave ya que observamos una clara variación de su actividad en función de la edad (*Fig. 17; pág. 73*). Así, el subgrupo de pacientes de 40 o más años reveló un incremento significativo de actividad en comparación con los subgrupos G1, G2 y G4, señalar también que aunque el aumento de actividad con respecto al G3 no llegó a ser significativo, sí se acercó a dicha significancia estadística ($P=0,09$). Además, se constató que la actividad de la enzima PSA se correlaciona de forma positiva con la edad de la mujer (*Tabla 8; pág. 77*). Por todo ello, la PSA podría ser considerada un buen marcador de calidad folicular y, en consecuencia, de calidad ovocitaria. No en vano, varios estudios han demostrado cómo importantes proteasas implicadas en el metabolismo peptídico presentaban mayor actividad

a medida que aumentaba la edad del tejido analizado (Keppler *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001; Agirregoitia *et al.*, 2003a).

Una vez descrito el papel de la enzima PSA en el microambiente del folículo ovárico, nos planteamos establecer niveles de actividad óptima, es decir, estipular aquella actividad específica que nos determinaría unos elevados porcentajes de gestación. Con tal fin se intentaron correlacionar tres variables fundamentales: rango de edad, actividad peptidásica y consecución de embarazo (Fig. 22; pág. 78). Por un lado, si nos fijamos en el gráfico descrito por aquellas pacientes que lograban embarazo observamos cómo durante el periodo de mayor potencial reproductivo femenino (de los 20 a los 34 años) la actividad enzimática alcanzaba valores en torno a las 250 UP/ L muestra, para aumentar paulatinamente y encontrarse sobrepasando las 300 UP/ L muestra en mujeres con una edad igual o superior a los 40 años. Por otro lado, para las no gestantes la actividad obtenida en los cinco subgrupos sobrepasó o rozó los límites de la franja de 200 a 300 UP/ L muestra. Estos resultados son preliminares pero parece ser que la actividad óptima de la enzima PSA se encontraría en la franja de 200 a 300 UP/ L muestra. No obstante, para confirmar dicha teoría sería imprescindible un mayor tamaño muestral.

Las aminopeptidasas APN, PSA y APB regulan la concentración de opioides en los diferentes tejidos y fluidos del organismo. Péptidos que han sido relacionados con la fertilidad masculina, más concretamente con la motilidad espermática (Fraser y Adeoya-Osiguwa, 2001; Agirregoitia *et al.*, 2006, 2012b; Subirán *et al.*, 2008, 2009; Pinto *et al.*, 2010). Si bien es cierto que los distintos estudios realizados hasta el momento no son concluyentes, puesto que se ha observado que elevadas concentraciones de EOP pueden producir tanto incrementos como descensos de la movilidad de los espermatozoides, que la concentración de dichos péptidos en el medio sea alta o baja no parece ser determinante sino que lo que resulta de vital importancia es que exista una adecuada concentración opioidérgica en cada momento (Subirán *et al.*, 2011, 2012). Esta hipótesis explicaría el hecho de que la APN no presentara modificaciones de actividad a medida que aumenta la edad de la mujer pero que sí lo hicieran las enzimas APB y PSA, por lo que cada grupo tendría un patrón de actividad aminopeptidásica determinado que generaría una concentración de opioides en LF específico para cada rango de edad.

En conclusión, la actividad de las peptidasas APN, DPPIV, APA, PEP y PGI es independiente de la edad de la mujer mientras que las enzimas APB, Cys-AP y Asp-AP muestran alteraciones de actividad entre determinados grupos de edad. Finalmente, la PSA resulta ser la única peptidasa que revela una tendencia clara: a mayor edad, mayor actividad enzimática. Por lo tanto, y aunque es necesario un mayor número de estudios, la PSA podría ser considerada como un marcador de envejecimiento ovocitario.

2.3. Correlación clínica de la actividad de las peptidasas en el Grupo Fértil

Una vez analizada la variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular según la edad de la mujer, nos planteamos estudiar su correspondencia clínica. Con dicho fin, se seleccionó como conjunto de estudio el denominado Grupo Fértil o FERT ya que este es para nosotros el grupo control por excelencia, aquel en el que se alcanzan las mayores tasas de embarazo y donde se detecta una actividad peptidásica óptima. Consecuentemente, en este apartado se ha intentado relacionar la actividad de los nueve enzimas ensayados con las siguientes variables clínicas: concentración de estradiol sérico, número de ovocitos obtenidos, porcentaje de madurez ovocitaria, tasa de fecundación y consecución de embarazo. Debemos señalar que la media de las cinco variables analizadas se encuentra dentro de los valores esperados (*Tabla 9; pág. 79*).

En los estudios de esterilidad rutinarios el estradiol sérico se utiliza para conocer la reserva ovárica de las pacientes (Buyalos *et al.*, 1997; Barroso *et al.*, 2001; Bruna *et al.*, 2008; López, 2008). Una vez iniciado el tratamiento de FIV, se va controlando la respuesta a la estimulación ovárica mediante una serie de ecografías y analíticas, dichas analíticas nos informan del nivel de estradiol en distintos días del ciclo reproductivo. Según nuestros protocolos, el día en el que se pauta la descarga ovulatoria se realiza la última medición de estradiol en suero, dato que hemos recogido y analizado.

A nivel ovárico varios estudios defienden la capacidad del estradiol folicular para predecir la madurez y fecundabilidad del óvulo correspondiente, relacionando su concentración con: el número de células de la granulosa, la madurez del citoplasma y núcleo ovocitarios (Entman *et al.*, 1987; Kreiner *et al.*, 1987; Teissier *et al.*, 2000; Aparicio, 2009), la tasa de fecundación (Wramsby *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1987; Imoedenhe y A, 1988; Teissier *et al.*, 2000), etc. Hay incluso una gran discrepancia entre autores con respecto al aumento de las tasas de embarazo cuando se dan concentraciones elevadas de estradiol en LF o suero (Berger *et al.*, 1987; Sinosich, 1987; Smith *et al.*, 1988; Judd y Fournet, 1994; Gregory, 1998; Estes *et al.*, 2009). Es más, en 2007 el grupo dirigido por Smitz demostró que no había ningún tipo de paralelismo entre los niveles de esteroides foliculares y los detectados en sangre.

Según nuestros resultados, existe una correlación negativa entre la concentración de estradiol sérico y la actividad de la enzima PSA en LF (*Tabla 10; pág. 80*). Resultados que discrepan con los obtenidos por Neves (2006) a nivel uterino, ya que este autor detectó en ratas una correlación positiva entre la concentración de estradiol circulante y la actividad aminopeptidásica de membrana. Además, tal y como era de esperar según la teoría bicelular de la producción ovárica de estrógenos, también se ha observado una correlación negativa entre la actividad folicular de la PSA y el número total de ovocitos conseguidos tras la punción (*Tabla 11; pág. 81*). Resumiendo, en mujeres fértiles: a menor nivel de

estradiol sérico y menor número de óvulos obtenidos, mayor actividad registrada para la enzima PSA. Lo cual corrobora el hecho de que en el Grupo Control los niveles significativamente más altos de actividad para la PSA se den en mujeres de 40 o más años, ya que en estas pacientes la concentración de estradiol el día de la descarga ovulatoria así como el número de ovocitos logrados tras la captación suele ser menor que en mujeres más jóvenes. Consecuentemente, lo que parece quedar claro es que aquellas pacientes con una edad igual o superior a 40 años presentarán unos elevados niveles de actividad para la peptidasa PSA en LF, una baja concentración de estradiol circulante y un bajo número de ovocitos obtenidos.

Tanto el porcentaje de ovocitos maduros como la tasa de fecundación son dos variables clínicas, objetivas y de gran importancia en lo que se refiere a la evolución del ciclo. De hecho, cuanto más elevados sean ambos porcentajes mayor será la probabilidad de embarazo de la paciente. La detección de alteraciones de la actividad de las peptidasas en función de la madurez ovocitaria nos llevaría a pensar, de forma inequívoca, en el papel de las enzimas estudiadas tanto en la calidad folicular como en la calidad del ovocito. Respecto a la tasa de fecundación, dicha relación no sería tan clara ya que en el proceso de fertilización influye tanto la calidad del gameto femenino como la del masculino (Tomar *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2013; Yetunde y Vasiliki, 2013). Sin embargo, no hemos encontrado correlación alguna entre actividad peptidásica en LF y madurez ovocitaria o tasa de fecundación.

El porcentaje global de gestación por transferencia obtenido en FERT ha sido del 73%. La consecución de embarazo y posterior nacimiento de un bebé sano es el principal objetivo de la reproducción asistida actual, por ello, hemos comparado la variación del metabolismo peptídico en función del resultado final del ciclo de FIV. Intentando alcanzar la máxima precisión sólo se han tenido en cuenta aquellas pacientes en las que el número de embriones transferidos fue única y exclusivamente dos. Así pues, al analizar la actividad de las nueve peptidasas sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para las enzimas PSA y APA, mientras que para las siete restantes los niveles de actividad en el subgrupo embarazo y no embarazo han sido prácticamente idénticos.

Respecto a la aminopeptidasa A, a nivel ovárico destaca por su amplia distribución ya que se ha detectado actividad para la APA en la membrana del ovocito, de las células de la granulosa, de la teca y de las células luteínicas. Además, tal y como demuestra este estudio, también se encuentra presente en el LF. Su extensa localización y ser una de las angiotensinas más importantes del cuerpo humano, le ha supuesto ser considerada una peptidasa clave en los procesos de foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica (Vinson *et al.*, 1997; Hassan *et al.*, 2000). Es más, se cree que también interviene en la función del cuerpo lúteo (Harata *et al.*, 2006) y en el mantenimiento del embarazo (Goto *et al.*, 2006). La APA y su principal sustrato (Ang II) podrían erigirse como dos factores decisivos del microambiente folicular. Sin embargo, a lo largo de esta investigación cuando se ha analizado la actividad de la enzima APA (tanto en el G.C. como en el G.I.) no se

han detectado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los subgrupos estudiados por lo que, *a priori*, su actividad no se vería influida por el envejecimiento ovárico ni por los problemas reproductivos. No obstante, debemos destacar que cuando cotejamos los niveles de actividad en función del resultado final del ciclo de FIV sí que detectamos una variación del metabolismo peptídico en el LF según si la mujer a quedado o no gestante. Las pacientes con un test β -hCG positivo presentan unos niveles de actividad significativamente superiores a los de aquellas que no consiguen embarazo (Fig. 26; pág. 85). Consecuentemente podríamos interpretar que, independientemente de la edad de la mujer o de su tipo de infertilidad, elevados niveles de actividad de la enzima APA en LF indicarían una mayor probabilidad de embarazo, aunque es necesario llevar a cabo un mayor número de estudios para corroborar dicha hipótesis.

Cuando se comparó la actividad de la metalopeptidasa PSA según el resultado del ciclo de FIV, se observó que aquellas mujeres que no quedaron gestantes presentaron un aumento de actividad de 81 puntos frente a aquellas que resultaron embarazadas, diferencia que fue estadísticamente significativa (Fig. 25; pág. 84). Este hecho confirmaría la existencia de una franja de actividad óptima para la enzima PSA en el líquido folicular ovárico.

PSA es la única peptidasa con una tendencia clara: a menor concentración de estradiol y menor número de ovocitos, mayor actividad enzimática. Además, las mujeres no gestantes respecto a las que sí resultaron embarazadas presentaron un aumento de actividad estadísticamente significativo para dicha enzima (Roméu *et al.*, 2014). Por un lado, si este patrón se repitiera en sucesivos ciclos de una misma paciente, PSA podría ser considerada como un indicador pronóstico del éxito del tratamiento de FIV. Por otro lado, si no siguiera un patrón repetitivo se podría investigar qué factores pueden influir directamente en el metabolismo peptídico (fármacos, tipo de vida, dieta, etc) con el fin de controlar, en la medida de lo posible, la actividad de PSA en LF.

2.4. Actividad de las peptidasas en función del tipo de infertilidad

Al igual que ocurre con la edad, nos hemos planteado estudiar si alguno de los enzimas analizados podría servir como marcador diferenciador de calidad folicular en mujeres con distintas patologías reproductivas. Además, se ha intentado relacionar los resultados obtenidos con la tasa de embarazo descrita previamente para cada una de las infertilidades (Fig. 14; pág. 69).

A pesar de la existencia de trabajos en los que se relacionan determinadas alteraciones metabólicas y hormonales con distintos tipos de problemas de fertilidad (Moschos *et al.*, 2002; Castellón *et al.*, 2009; Requena *et al.*, 2009), no hemos encontrado ningún estudio que relacione actividad peptidásica con infertilidad. Por lo tanto, esta es la primera vez que se analizan los niveles de actividad de las enzimas APN, PSA, APB, DPPIV, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI en el LF de mujeres afectas de una de las siguientes patologías: síndrome de ovario

poliquístico (SOP), endometriosis a nivel ovárico (END), factor tubárico (FT) y esterilidad sin causa aparente (ESCA). Primero se trató de describir la actividad hallada en el Grupo Infértil, para después analizar la obtenida en las distintas patologías y detallar las diferencias encontradas respecto al Grupo Fértil (definido como nuestro grupo control por excelencia).

Al examinar la actividad global de las nueve peptidasas en el G.I. hallamos una distribución muy similar a la encontrada en el G.C., previamente descrita en el subapartado 2.1. No obstante, cabe destacar que en este caso la enzima que presentó mayor actividad global no fue la APN sino la PSA (*Fig. 27; pág. 86*). Más concretamente, cuando distinguimos entre las cuatro infertilidades observamos que en las pacientes afectas de SOP o END la enzima con mayor actividad resultaba ser la PSA, seguida de la APN (al igual que ocurría en el G.C. en mujeres con una edad igual o superior a los 30 años), mientras que en el caso de pacientes con FT o ESCA la situación era justo la contraria; la actividad de la peptidasa APN superaba a la de la PSA (como sucedía en el G.C. en mujeres con una edad inferior a los 30 años) (*Fig. 28; pág. 87*).

Con respecto al Grupo Fértil, las pacientes pertenecientes al subgrupo SOP presentaron unos niveles de actividad significativamente superiores para las enzimas PSA y APB. Algo similar ocurrió con las mujeres afectas de endometriosis, ya que en estas tanto la PSA como la APB mostraron una actividad superior a la obtenida en FERT, si bien la enzima APB (a diferencia de la PSA) no llegó a alcanzar la significancia estadística aunque se acercó a ella (*Figs. 30 y 31; págs. 89 y 90*). Por último, los subgrupos FT y ESCA no presentaron discrepancias de significancia estadística respecto a FERT para ninguna de las nueve enzimas estudiadas, por lo que en estas dos infertilidades se descartaría la existencia de una modificación del metabolismo peptídico folicular regulado por estas enzimas. Cuando se compararon las cuatro patologías entre sí se observó que para las enzimas PSA y APB las mujeres afectas de FT presentaron una actividad significativamente inferior a aquellas que padecían SOP, END o ESCA (*Figs. 30 y 31; págs. 89 y 90*). También mencionaremos que en el caso de la peptidasa APN el subgrupo FT mostró una actividad estadísticamente inferior a ESCA pero no al resto de infertilidades (*Fig. 29; pág. 88*), esto unido al hecho de que para la APN no se observaron diferencias significativas entre FERT y las distintas patologías (ni entre los diferentes rangos de edad) hacen que no pueda ser considerada como un marcador de calidad folicular.

Consecuentemente a los resultados descritos, el FT será tratado como un problema reproductivo no ovárico, es decir, al ser una patología que afecta a las trompas uterinas no influirá en el microambiente folicular y, como resultado, no intervendrá en el metabolismo peptídico del LF. Aunque existen gran cantidad de trabajos en los que se asocia la presencia de hidrosálpinx (transtorno tubárico más frecuente) con una reducción en las tasas de implantación y embarazo en tratamientos de FIV, así como con un aumento del número de abortos preco-

ces y embarazos ectópicos (Andersen *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1996; González *et al.*, 2007b; Sharara, 2009; Li *et al.*, 2010; Chanelles *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2012). Tal y como avalan nuestros datos, estos malos resultados reproductivos no serían consecuencia de una mala calidad folicular y/u ovocitaria, sino al efecto que el líquido del hidrosálpinx ejercería tanto sobre la cavidad endometrial como sobre el propio embrión. De hecho, se ha analizado el efecto de dichos líquidos patológicos en el endometrio, observándose que producen una alteración de la expresión y secreción de ciertas sustancias y sustratos tales como las citoquinas IL-1, LIF y CSF-1 (proteínas que actúan como receptores del embrión y como estimuladores de la invasión trofoblástica), lo cual afectaría irrefutablemente a la implantación embrionaria (Strandell y Lindhard, 2002). Igualmente, parece confirmado que el desarrollo de embriones humanos se ve comprometido por la presencia de líquido del hidrosálpinx. Además, resulta razonable pensar que el drenaje continuo del fluido acumulado en las trompas hacia la cavidad uterina generaría un efecto mecánico que arrastraría hacia el exterior a los embriones depositados en el endometrio. Sin embargo, el porcentaje de embarazo por transferencia que hemos obtenido para FT ha sido elevado, cercano al 65%, por lo que especificaremos que nuestro subgrupo no estaba compuesto únicamente por pacientes afectas de hidrosálpinx, lo cual explicaría la buena tasa de gestación conseguida.

El hecho de que el subconjunto ESCA no presente alteraciones de actividad con respecto al Grupo Fértil para ninguna de las peptidasas estudiadas y que al comparar su nivel de actividad con la de FT, ésta muestre unos valores significativamente superiores para las enzimas APN PSA y APB (como ocurre en SOP y END), nos puede dar una idea de la composición del grupo de mujeres con esterilidad de origen desconocido, es decir, estaría formado por pacientes con un abanico muy amplio de problemas reproductivos que irían desde SOP o END no identificadas hasta infertilidades de origen: anatómico, inmunológico, genético, embrionario, etc. Por lo tanto, sería necesario llevar a cabo un pormenorizado estudio clínico en las pacientes afectas de ESCA para poder determinar exactamente a qué es debida la infertilidad que padecen y analizar entonces su metabolismo peptídico. Como apuntábamos en la Introducción, las mujeres que consultan por ESCA suelen tener un buen pronóstico reproductivo (Vidal *et al.*, 2009), no en vano, este es el subgrupo patológico que ha obtenido la mayor tasa de embarazo por transferencia (análoga a la del Grupo Fértil).

Los signos y síntomas del SOP se asocian a una amplia gama de alteraciones hormonales y metabólicas (Legro *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2005; Requena *et al.*, 2009; Fabregues y Manau, 2012; Fontes *et al.*, 2012). Así mismo, un gran número de moléculas ováricas se han relacionado con los cambios hormonales característicos del síndrome de ovario poliquístico, de entre las que destacaremos la inhibina B, el GnSAF, la AMH y la leptina (Moschos *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2005; Homburg, 2009; Fontes *et al.*, 2012). Actualmente, la etiopatogenia del SOP es compleja y poco conocida. Para su mejor entendimiento se han estudiado de forma independiente los distintos compartimentos del eje hipotál-

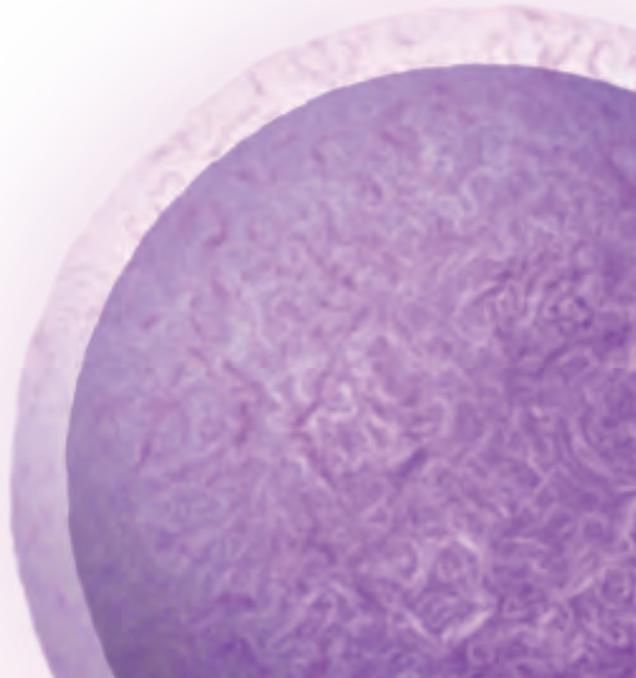
mo-hipofisario-gonadal y se ha concedido especial importancia a la disfunción ovárica por ser el lugar en que se produce la alteración de la foliculogénesis, la cual finalmente permite el desarrollo completo del síndrome. Es difícil correlacionar el ovario poliquístico con un desarrollo folicular anómalo, pero algunos trabajos lo han logrado (Fulghesu *et al.*, 2007; Fabregues y Manau, 2012). También se ha podido demostrar que, cuando se consigue normalizar la foliculogénesis, los oocitos metafase II del SOP tienen el mismo potencial reproductivo que los procedentes de pacientes fértiles (MacDougall *et al.*, 1993; Buyalos y Lee, 1996). Todo lo mencionado anteriormente reafirma los resultados hallados en la presente Memoria, ya que en el síndrome de ovario poliquístico se ha detectado tanto una alteración del metabolismo peptídico folicular como una baja tasa de embarazo por transferencia.

En referencia a la endometriosis ovárica, la bibliografía publicada hasta el momento arroja resultados sumamente contradictorios. Mientras que algunos autores relacionan la afección endometriósica con una disminución de la tasa de implantación embrionaria y embarazo, otros apuntan a unos porcentajes de gestación similares al comparar pacientes afectas de END con parejas control (factor masculino, factor tubárico o esterilidad de origen desconocido) (Alborzi *et al.*, 2006; Sallam *et al.*, 2006). Hecho que avalan nuestros resultados ya que en el subgrupo END hemos obtenido una tasa de embarazo por transferencia similar a la de FT y ESCA. No obstante, parece haber un amplio consenso en cuanto a que la patología endometriósica afectaría al correcto desarrollo de la foliculogénesis, y por lo tanto, a la calidad ovocitaria. Hipótesis que hemos podido confirmar al detectar una modificación del metabolismo peptídico folicular en mujeres que consultan por endometriosis a nivel ovárico.

Por otro lado, para la enzima PSA y al igual que en el subapartado 2.2 de esta Discusión, hemos tratado de correlacionar tres variables fundamentales: tipo de infertilidad, actividad peptidásica y consecución de embarazo (Fig. 32; pág. 91). Los resultados que hemos obtenido han sido controvertidos, ya que si en mujeres "sanas" considerábamos que la franja de actividad óptima para la PSA era de 200 a 300 UP/ L muestra, en el caso de mujeres con problemas de fertilidad no apreciamos una tendencia tan clara. Únicamente en SOP (subconjunto con el menor porcentaje de embarazo / transferencia) vemos cómo se cumplen dichos límites de actividad óptima. Mientras que para los subgrupos END, FT y ESCA (todos con una elevada tasa de gestación / transferencia) el gráfico descrito tanto por el conjunto de mujeres embarazadas como no embarazadas se encuentra dentro de la franja de 200 a 300 UP/ L muestra. Estos resultados hacen que sea sumamente necesario llevar a cabo un mayor número de estudios aleatorizados antes de poder establecer unas conclusiones válidas.

En conclusión, las peptidasas APN, DPPIV, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI no serían buenos indicadores de calidad folicular ya que no muestran diferencias significativas entre el Grupo Fértil y el conjunto de mujeres con problemas reproductivos. El aumento significativo de actividad para las enzimas PSA y APB en patologías como SOP o END respecto a FERT o a FT podría estar asociado a un inadecuado microambiente folicular. De hecho, ambos tipos de infertilidades se focalizan en el ovario mientras que FT y ESCA no lo afectan de forma directa. Consecuentemente, el metabolismo peptídico folicular se encuentra alterado en el síndrome de ovario poliquístico y en la endometriosis ovárica.

VI. CONCLUSIONES

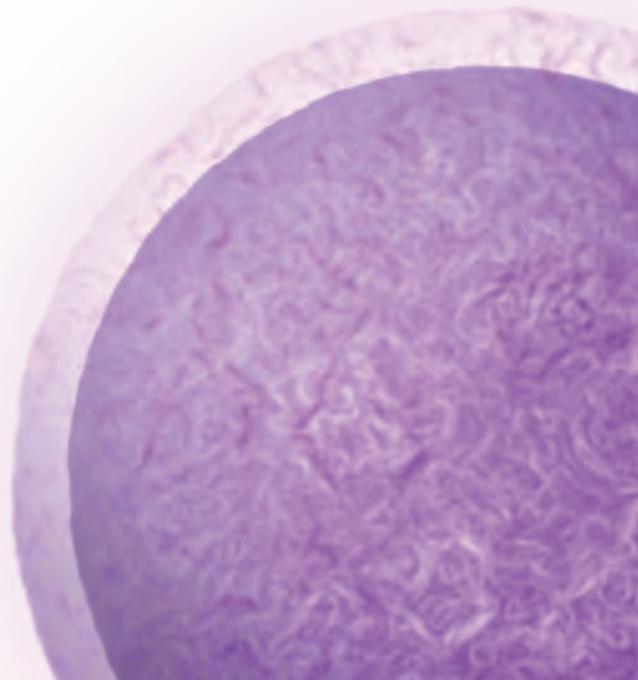


1. Tras un tratamiento de FIV, cuando se comparan las variables de estimulación y de laboratorio en mujeres pertenecientes al Grupo Control y Grupo Infértil (en función de la consecución o no de embarazo) se observa que, a pesar de las diferencias halladas entre los distintos subgrupos, estos generan una norma respuesta a la estimulación farmacológica así como una uniformidad en el desarrollo evolutivo de los ciclos reproductivos.
2. El presente trabajo es el primer estudio que demuestra la inequívoca presencia de las enzimas APN, PSA, APB, APA, Cys-AP, Asp-AP, PEP y PGI en el ovario humano, más concretamente, en la fracción soluble del líquido folicular. De igual modo, se corrobora la presencia previamente descrita de la DPPIV. Los mayores valores de actividad los registran APN y PSA; el resto de peptidasas presentan una actividad significativamente inferior.
3. La actividad enzimática de APN, PEP, DPPIV, PGI y APA es independiente de la edad de la mujer mientras que APB, Asp-AP y Cys-AP muestran alteraciones de actividad entre determinados grupos de edad. PSA es la única peptidasa que revela una tendencia clara: a mayor edad, mayor actividad enzimática. Por lo que PSA podría ser considerada como un marcador de envejecimiento ovocitario, cuya franja de actividad óptima se establecería entre las 200 y las 300 UP/ L muestra.
4. En el Grupo Fértil y en cuanto a la peptidasa PSA se ha observado que tanto la concentración de estradiol sérico (el día de la hCG) como el número de ovocitos obtenidos se correlacionan de forma negativa con la actividad enzimática. Además, las mujeres no gestantes respecto a las que sí resultan embarazadas presentan un aumento de actividad estadísticamente significativo. Si este patrón se repitiera en sucesivos ciclos de una misma paciente, PSA establecerse como un indicador pronóstico del éxito del tratamiento reproductivo.
5. El aumento significativo de actividad para las enzimas PSA y APB en infertilidades como SOP o END respecto al Grupo Fértil o al FT podría estar asociado a un inadecuado microambiente folicular, de hecho, ambos tipos de problemas reproductivos se focalizan en el ovario. En resumen, el metabolismo peptídico se encuentra alterado en el síndrome de ovario poliquístico y en la endometriosis ovárica.

6. Los niveles de actividad detectados para la peptidasa PSA son muy similares entre los siguientes subgrupos: mujeres del Grupo Fértil no embarazadas, mujeres del Grupo Control con una edad igual o superior a los 40 años y mujeres del Grupo Infértil afectas de SOP o END. Actividad enzimática que es superior a las 300 UP/ L muestra. Lo cual corrobora la presencia de un inadecuado microambiente folicular en estos tres subgrupos y la existencia de una franja de actividad óptima.

7. La enzima PSA podría ser utilizada como un parámetro predictivo de calidad folicular. Consecuentemente, la determinación de la actividad de dicha peptidasa en LF se convertiría en una herramienta útil para determinar las probabilidades de éxito del ciclo de FIV, ayudando a orientar a la paciente sobre sus posibles opciones reproductivas y permitiendo llevar a cabo tratamientos cada vez más individualizados.

VII. BIBLIOGRAFÍA





- Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW (1994). *Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase-IV) gene*. Immunogenetics 40(5):331-8.
- Abe K, Fukuda K, Tokui T (2004). *Marginal involvement of pyroglutamyl aminopeptidase I in metabolism of thyrotropin-releasing hormone in rat brain*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27(8):1197-201.
- Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subirán N, Ochoa C, Irazusta J (2006). *Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 91(12):4969-75.
- Agirregoitia E, Peralta L, Mendoza R, Expósito A, Diaz Ereno E, Matorras R, Agirregoitia N (2012a). *Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes*. Reproductive Biomedicine Online 24(5):550-7.
- Agirregoitia E, Subirán N, Valdivia A, Gil J, Zubero J, Irazusta J (2012b). *Regulation of human sperm motility by opioid receptors*. Andrologia 44:578-85.
- Agirregoitia N, Gil J, Ruiz F, Irazusta J, Casis L (2003a). *Effect of aging on rat tissue peptidase activities*. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences 58(9):B792-7.
- Agirregoitia N, Irazusta A, Ruiz F, Irazusta J, Gil J (2003b). *Ontogeny of soluble and particulate prolyl endopeptidase activity in several areas of the rat brain and in the pituitary gland*. Developmental Neuroscience 25(5):316-23.
- Agirregoitia N, Casis L, Gil J, Ruiz F, Irazusta J (2007). *Ontogeny of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in rat tissues*. Regulatory Peptides 139(1-3):52-8.
- Alba F, Iribar C, Ramirez M, Arenas C (1989). *A fluorimetric method for the determination of brain aminopeptidases*. Archivos de neurobiologia 52(4):169-73.
- Alba F, Arenas JC, Lopez MA (1995). *Comparison of soluble and membrane-bound pyroglutamyl peptidase I activities in rat-brain tissues in the presence of detergents*. Neuropeptides 29(2):103-7.
- Alborzi S, Zarei A, Alborzi M (2006). *Management of ovarian endometrioma*. Clinical Obstetrics and Gynecology 49(3):480-91.
- Albrizio M, Guaricci AC, Calamita G, Zarrilli A, Minoia P (2006). *Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells*. Fertility and Sterility 86(6):1776-9.

- Aleem FA, Eltabbakh GH, Omar RA, Southren AL (1987). *Ovarian follicular fluid beta endorphin levels in normal and polycystic ovaries*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 156(5):1197-200.
- Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U (1994). *Human female phenotypic development - role of fetal ovaries*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 79(2):604-8.
- Andersen AN, Yue Z, Meng FJ, Petersen K (1994). *Low implantation rate after in vitro fertilization in patients with hydrosalpinges diagnosed by ultrasonography*. Human Reproduction 9(10):1935-8.
- Ando H, Nagasaka T, Nomura M, Tsukahara SI, Kotani Y, Toda S, Murata Y, Itakura A, Mizutani S (2002). *Premenstrual disappearance of aminopeptidase A in endometrial stromal cells around endometrial spiral arteries/arterioles during the decidual change*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87(5):2303-9.
- Angelisova P, Drbal K, Horejsi V, Cerny J (1999). *Association of CD10 neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Lyn kinase*. Blood 93(4):1437-9.
- Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C (2006). *Proteome analysis of human follicular fluid*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1764(11):1775-85.
- Antczak C, De Meester I, Bauvois B (2001). *Ecto-peptidases in pathophysiology*. Bioessays 23(3):251-60.
- Aparicio I (2009). *Papel de la hormona anti-mülleriana en el manejo de la reserva ovárica en reproducción asistida*. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis doctoral.
- Ardoy M, Calderón G (2008). *Criterios ASEBIR de la valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*. Cuadernos de Embriología Clínica. Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción. Volumen 2 (2a).
- Arteaga M, García I (2013). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. Madrid. Editorial Médica Panamericana.
- Assidi M, Richard FJ, Sirard MA (2013). *FSH in vitro versus LH in vivo: similar genomic effects on the cumulus*. Journal of Ovarian Research 6.
- Aurich-Costa J, Cadel S, Gouzy C, Foulon T, Cherif D, Cohen P (1997). *Assignment of the aminopeptidase B gene (RNPEP) to human chromosome 1 band q32 by in situ hybridization*. Cytogenetics and Cell Genetics 79(1-2):143-4.

- Awade AC, Cleuziat P, Gonzales T, Robertbaudouy J (1994). *Pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp): an enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu- proteins*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 20(1):34-51.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO (2004). *The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(6):2745-9.
- Azziz R, Dumesic DA, Goodarzi MO (2011). *Polycystic ovary syndrome: an ancient disorder?* *Fertility and Sterility* 95(5):1544-8.
- Balasz J, Miro F, Burzaco I, Casamitjana R, Civico S, Balleca JL, Puerto B, Vanrell JA (1995). *The role of luteinizing-hormone in human follicle development and oocyte fertility - Evidence from in vitro fertilization in a woman with long standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulation hormone*. *Human Reproduction* 10(7):1678-83.
- Balasz J (2008). *Edad y Reproducción: aspectos epidemiológicos y generales*.25.
- Balogh A, Cadel S, Foulon T, Picart R, Garabedian AD, Rousselet A, Tougard C, Cohen P (1998). *Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells*. *Journal of Cell Science* 111:161-9.
- Ballesteros A, Castellón G, Sánchez I, Pozzobon C (2009). *Primera visita de esterilidad. Guía de Protocolos en Reproducción Humana*. J. Remohí, J. Bellver, A. Requena and A. Pellicer, Momento Médico Iberoamericana:1.
- Barrett AJ, McDonald JK (1986). *Nomenclature: Protease, proteinase and peptidase*. *Biochemical Journal* 237(3):935.
- Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.
- Barroso G, Oehninger S, Monzo A, Kolm P, Gibbons WE, Muasher SJ (2001). *High FSH : LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3: Impact on follicular development and IVF outcome*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18(9):499-505.
- Baruffi RL, Avelino KB, Petersen CG, Mauri AL, Garcia JM, Franco JG (2004). *Nuclear and cytoplasmic maturation of human oocytes cultured in vitro*. *Fertility and Sterility* 82:S265-S6.
- Belisle S, Petit A, Gallopayet N, Bellabarba D, Lehoux JG, Lemaire S (1988). *Functional opioid receptor sites in human placentas*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 66(2):283-9.

B

- Berger MA, Laufer N, Lewin A, Navot D, Rabinowitz R, Eisenberg S, Margalioth EJ, Schenker JG (1987). *Cholesterol and steroid-levels in human follicular fluids of human menopausal gonadotropin-induced cycles for invitro fertilization*. Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer 4(1):30-3.
- Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH (2001). *CD13/APB is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation*. Blood 97(3):652-9.
- Bianchi L, Gagliardi A, Campanella G, Landi C, Capaldo A, Carleo A, Armini A, De Leo V, Piomboni P, Focarelli R, Bini L (2013). *A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation*. Journal of proteomics 90:61-76.
- Bickel M, Tan JSE, Taubert HD, Kuhl H (1972). *Evidence of a sex-specific effect of testosterone and progesterone upon L-cystine-aminopeptidase activity in hypothalamus and paleopallium of rat*. Neuroendocrinology 9(6):321-31.
- BioMérieux (2010a). VIDAS HCG. Mini VIDAS. Manual del usuario:1-4.
- BioMérieux (2010b). VIDAS Estradiol II. Mini VIDAS. Manual del usuario:1-4.
- Blanco L, Larrinaga G, Pérez I, Lopez JI, Gil J, Agirregoitia E, Varona A (2008). *Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma*. American Journal of Physiology-Renal Physiology 294(4):F850-F8.
- Blanco L (2010). *Alteraciones en la actividad enzimática, expresión tisular y expresión génica de peptidasas en neoplasias renales*. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.
- Blanco L, Pérez I, Sanz B, Gil J, Lopez JI, Ugalde A, Varona A, Larrinaga G (2010). *Changes in Cell-Surface Peptidase Activity in Papillary Renal Cell Carcinoma*. Anticancer Research 30(4):1137-41.
- Bogenrieder T, Finstad CL, Freeman RH, Papandreou CN, Scher HI, Albino AP, Reuter VE, Nanus DM (1997). *Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue*. Prostate 33(4):225-32.
- Bonilla-Musoles F, Pellicer A (2008). *Obstetricia, Reproducción y Ginecología Básicas*. Editorial Médica Panamericana (1a).
- Bonilla-Musoles F (2010). *La realidad es más tozuda que la ficción*. Revista Iberoamericana de Fertilidad 27(1):1-3.

- Botella Llusia J (1995). *Controversies about luteal phase defects*. Anales de la Real Academia Nacional de Medicina 112(1):43-60.
- Breitene G, Caucig H, Friedric F, Holzner JH (1973). *Comparison of enzyme activities of alkaline and acid-phosphatase, lactic-acid dehydrogenase and leucine aminopeptidase from wall and fluid of human ovarian follicles, cysts and serous cystadenomas*. Archiv Fur Gynakologie 215(1):85-94.
- Bruna I, Bethencourt J, Herrero J (2008). *Curso de Reproducción Asistida. Estudio de la pareja estéril (protocolo básico)*. Merck Serono. Bloque I. Tema 2.
- Buyalos RP, Lee CT (1996). *Polycystic ovary syndrome: Pathophysiology and outcome with in vitro fertilization*. Fertility and Sterility 65(1):1-10.
- Buyalos RP, Daneshmand S, Brzechffa PR (1997). *Basal estradiol and follicle-stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy*. Fertility and Sterility 68(2):272-7.
- Cabello Y (2013). *Influencia de la calidad ovocitaria y espermática sobre el fallo de implantación. Fallo de implantación en reproducción asistida*. R. Herrer, A. Mercader and F. del Río. Madrid, Editorial Médica Panamericana:23.
- Cadel S, Pierotti AR, Foulon T, Creminon C, Barre N, Segretain D, Cohen P (1995). *Aminopeptidase B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules*. Molecular and Cellular Endocrinology 110(1- 2):149-60.
- Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, MidolMonnet S, Noel N, Cohen P (1997). *Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A(4) hydrolase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(7):2963-8.
- Cadel S, Piesse C, Gouzy-Darmon C, Cohen P, Foulon T (2004). *Arginyl aminopeptidase. Aminopeptidases in biology and disease*. N. Hooper and U. Lendeckel, Kluwer Academic/Plenum Press. 2:113-26.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL (2013). *Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics*. Reproductive Biomedicine Online 26(5):477-85.
- Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roecken C (2006). *Ectoepitidases in tumour biology: A review*. Histology and Histopathology 21(12):1339-53.
- Carrera MP, Ramirez-Expósito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM (2004). *Glutamyl- but not aspartyl-aminopeptidase activity is modified in serum of N-methyl nitrosourea-induced rat mammary tumours*. Anticancer Research 24(2B):801-5.



- Carrera MP, Ramirez-Expósito MJ, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM (2009). *Ovarian Renin-Angiotensin System-regulating Aminopeptidases Are Involved in Progesterone Overproduction in Rats with Mammary Tumours Induced by N-Methyl Nitrosourea*. *Anticancer Research* 29(11):4633-7.
- Castillón G, Rabadán S, González S, Sánchez I, Ballesteros A (2009). Valoración de la función ovárica. *Guía de Protocolos en Reproducción Humana*. J. Remohí, J. Bellver, A. Requena and A. Pellicer, Momento Médico Iberoamericana:25-35.
- Caucig H, Friedrich F, Hager R, Golob E (1970). *Enzyme studies in follicular and cystic fluids of the human ovary*. *Wiener klinische Wochenschrift* 82(42):936-9.
- Caucig H, Friedrich F, Breitene G, Golob E (1972). *Enzyme activity in fluid of human ovarian follicle*. *Gynecologic Investigation* 3(5-6):215-20.
- Constam DB, Tobler AR, Rensingehl A, Kemler I, Hersh LB, Fontana A (1995). *Puromycin-sensitive aminopeptidase: Sequence, analysis, expression, and functional characterization*. *Journal of Biological Chemistry* 270(45):26931-9.
- Corbett S, Morin-Papunen L (2013). *The Polycystic Ovary Syndrome and recent human evolution*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 373(1-2):39-50.
- Cramer DW, Missmer SA (2002). The epidemiology of endometriosis. *Endometriosis: Emerging Research and Intervention Strategies*. K. Yoshinaga and E. C. Parrott. 955:11- 22.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M (2012). *Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality*. *Reproductive Biomedicine Online* 25(4):371-81.
- Culler MD, Tarlatzis BC, Lightman A, Fernández LA, Decherney AH, Negrovillar A, Naftolin F (1986). *Angiotensin ii-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 62(3):613-5.
- Cummins PM, O'Connor B (1998). *Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1429(1):1-17.
- Cyrus CCY, Lee RD (2013). *On the evolution of intergenerational division of labor, menopause and transfers among adults and offspring*. *Journal of Theoretical Biology* 332:171-80.
- Czech MP, Corvera S (1999). *Signaling mechanisms that regulate glucose transport*. *Journal of Biological Chemistry* 274(4):1865-8.

- Chanelles O, Ducarme G, Sifer C, Hugues JN, Touboul C, Poncelet C (2011). *Hydrosalpinx and infertility: what about conservative surgical management?* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 159(1):122-6.
- Channing CP, Schaerf FW, Anderson LD, Tsafiriri A (1980). *Ovarian follicular and luteal physiology. International review of physiology* 22:117-201.
- Chen CLC, Chang CC, Krieger DT, Bardin CW (1986). *Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis.* Endocrinology 118(6):2382-9.
- Cheng GJ, Zhang WH, Makinen S, Saji S, Warner M, Gustafsson JA, Hovatta O (2002). *A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary.* Biology of Reproduction 66(1):77-84.
- Choe SA, Tae JC, Shin MY, Kim HJ, Kim CH, Lee JY, Hwang D, Kim KC, Suh CS, Jee BC (2012). *Application of Sperm Selection Using Hyaluronic Acid Binding in Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles: A Sibling Oocyte Study.* Journal of Korean Medical Science 27(12):1569-73.
- Dando PM, Young NE, Barrett AJ (1997). *Aminopeptidase PS: a widely distributed cytosolic peptidase.* Proteolysis in Cell Functions 13:88-95.
- Dando PM, Fortunato M, Strand GB, Smith TS, Barrett AJ (2003). *Pyroglutamyl-peptidase I: cloning, sequencing, and characterisation of the recombinant human enzyme.* Protein Expression and Purification 28(1):111-9.
- de Gandarias JM, Ramirez M, Zulaica J, Casis L (1989). *Aminopeptidase (Arylamidase) activity in discrete areas of the rat-brain: Sex differences.* Hormone and Metabolic Research 21(5):285-6.
- de Gandarias JM, Ramirez M, Echevarria E, Irazusta J, Casis L (1990). *Serum and brain aminopeptidase activities in cyclic rats.* General Physiology and Biophysics 9(4):385-9.
- de Gandarias JM, Echevarria E, Irazusta J, Gil J, Casis L (1993). *Brain aminopeptidase activity after subacute xylene exposure.* Neurotoxicology and Teratology 15(1):51-3.
- de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Varona A, Casis L (1994a). *Developmental changes of pyroglutamate-peptidase I activity in several regions of the female and the male rat brain.* The International journal of neuroscience 77(1-2):53-60.



- de Gandarias JM, Irazusta J, Echevarria E, Casis L (1994b). *Regulación de la liberación gonadotrópica hipofisaria: Papel de los enzimas proteolíticos*. Gaceta Médica de Bilbao 91(3):70-4.
- de Gandarias JM, Irazusta J, Fernández D, Gallego M, Silio M, Casis L (1996). *Membrane-bound tyrosine aminopeptidase activities in the rat brain throughout the estrous cycle*. Life Sciences 59(13):1097-101.
- de Gandarias JM, Irazusta J, Varona A, Gil J, Fernández D, Casis L (1999a). *Effect of imipramine on enkephalin-degrading peptidases*. European Neuropsychopharmacology 9(6):493-9.
- de Gandarias JM, Astiazaran JI, Varona A, Fernández D, Gil J, Casis L (1999b). *Effect of lithium treatments on the tyrosine-aminopeptidase activities in the rat brain and the pituitary gland*. Arzneimittel-Forschung-Drug Research 49(10):816-9.
- de Gandarias JM, Gil J, Valdivia A, Larrinaga G, Artola D, Casis L (2000a). *Subcellular distribution of pyroglutamyl-peptidase I activity in the developing rat cerebellum*. Developmental Neuroscience 22(4):264-73.
- de Gandarias JM, Irazusta J, Gil J, Varona A, Ortega F, Casis L (2000b). *Subcellular ontogeny of brain pyroglutamyl peptidase I*. Peptides 21(4):509-17.
- de Graaff AA, D'Hooghe TM, Dunselman GAJ, Dirksen CD, Hummelshoj L, Simoens S, Consortium WE (2013). *The significant effect of endometriosis on physical, mental and social wellbeing: results from an international cross-sectional survey*. Human reproduction (Oxford, England) 28(10):2677-85.
- de Mota N, Iturrioz X, Claperon C, Bodineau L, Fassot C, Roques BP, Palkovits M, Llorens- Cortes C (2008). *Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei*. Journal of Neurochemistry 106(1):416-28.
- de Souza ANC, Bruno JA, Carvalho KM (1991). *An enkephalin degrading aminopeptidase of human brain preserved during the vertebrate phylogeny*. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology 99(3):363-7.
- Dell'Aquila ME, Casavola V, Reshkin SJ, Albrizio M, Guerra L, Maritato F, Minoia P (2002). *Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes*. Molecular Reproduction and Development 63(2):210-22.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Minoia P (2003). *Immunofluorescence detection of the mu-opioid receptor in human oocytes*. Human Reproduction 18:180.

- Dell'Aquila ME, Albrizio M, Guaricci AC, De Santis T, Maritato F, Tremoleda JL, Colenbrander B, Guerra L, Casavola V, Minoia P (2008). *Expression and localization of the mu-opioid receptor (MOR) in the equine cumulus-oocyte complex and its involvement in the seasonal regulation of oocyte meiotic competence*. *Molecular Reproduction and Development* 75(8):1229-46.
- Demaegdt H, Vanderheyden P, De Backer JP, Mosselmans S, Laeremans H, Le MT, Kersemans V, Yvette MB, Vauquelin G (2004). *Endogenous cystinyl aminopeptidase in Chinese hamster ovary cells: characterization by I-125 Ang IV binding and catalytic activity*. *Biochemical Pharmacology* 68(5):885-92.
- Dobson H, Smith RF (2000). *What is stress, and how does it affect reproduction?* *Animal Reproduction Science* 60:743-52.
- Dolleman M, Faddy MJ, van Disseldorp J, van der Schouw YT, Messow CM, Leader B, Peeters PHM, McConnachie A, Nelson SM, Broekmans FJM (2013). *The Relationship Between Anti-Mullerian Hormone in Women Receiving Fertility Assessments and Age at Menopause in Subfertile Women: Evidence From Large Population Studies*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98(5):1946-53.
- Douglass J, Cox B, Quinn B, Civelli O, Herbert E (1987). *Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues*. *Endocrinology* 120(2):707-13.
- Drucker DJ, Nauck MA (2006). *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. *Lancet* 368(9548):1696-705.
- Dyer SH, Slaughter CA, Orth K, Moomaw CR, Hersh LB (1990). *Comparison of the soluble and membrane bound forms of the puromycin sensitive enkephalin degrading aminopeptidases from rat*. *Journal of Neurochemistry* 54(2):547-54.
- Edwards RG (1974). *Follicular fluid*. *Journal of Reproduction and Fertility* 37(1):189-219.
- Entman SS, Maxson WS, Bradley CA, Osteen K, Webster BW, Vaughn WK, Wentz AC (1987). *Follicular fluid transferrin levels in preovulatory human follicles*. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4(2):98-102.
- Eppig JJ (2001). *Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals*. *Reproduction* 122(6):829-38.
- Erbeznik H, Hersh LB (1997). *A novel mammalian high-molecular-weight aminopeptidase*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344(1):228-34.



Estes SJ, Ye B, Qiu W, Cramer D, Hornstein MD, Missmer SA (2009). *A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women ≤ 32 years old*. *Fertility and Sterility* 92(5):1569-78.

F

Fabbri A, Jannini EA, Gnnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A (1989). *Neuro-endocrine control of male reproductive function: The opioid system as a model of control at multiple sites*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 32(1B):145-50.

Fabregues F, Manau D (2012). *Epidemiología y conceptos generales. Síndrome de Ovario Poliquístico*. M. A. Checa, J. J. Espinós and R. Matorras, Editorial Médica Panamericana:1-9.

Facchinetti F, Ruspa M, Turci A, Petraglia F, Segre A, Forabosco A, Genazzani AR (1986). *Met-enkephalin enhances follicle-stimulating hormone-dependent progesterone production from cultured granulosa cells*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 63(5):1222-4.

Facchinetti F, Storchi AR, Petraglia F, Volpe A, Genazzani AR (1988). *Expression of proopiomelanocortin related peptides in human follicular fluid*. *Peptides* 9(5):1089-92.

Facchinetti F, Artini PG, Monaco M, Volpe A, Genazzani AR (1989). *Oocyte fertilization in vitro is associated with high follicular immunoreactive beta endorphin levels*. *Journal of Endocrinological Investigation* 12(10):693-8.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF (1992). *Accelerated disappearance of ovarian follicles in midlife implications for forecasting menopause*. *Human Reproduction* 7(10):1342-6.

Faletti A, Viggiano JM, Gimeno MAF (1995). *Beta endorphin inhibits prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation*. *Prostaglandins* 49(2):93-103.

Faletti AG, Mohn C, Farina M, Lomniczi A, Rettori V (2003). *Interaction among beta-endorphin, nitric oxide and prostaglandins during ovulation in rats*. *Reproduction* 125(4):469-77.

Fauque P, Audureau E, Leandri R, Delaroche L, Assouline S, Epelboin S, Jouanet P, Patrat C (2013). *Is the nuclear status of an embryo an independent factor to predict its ability to develop to term?* *Fertility and Sterility* 99(5):1299-304.e3.

Fauser B, Chang J, Azziz R, Legro R, Dewailly D, Franks S, Tarlatzis R, Fauser B, Balen A, Bouchard P, Dahlgren E, Devoto L, Diamanti E, Dunaif A, Filicori M, Homburg R, Ibanez L, Laven J, Magoffin D, Nestler J, Norman RJ, Pasquali R, Pugeat M, Strauss J, Tan S, Taylor A, Wild R, Wild S, Ehrmann D, Lobo

- R, Rotterdam E-A-s (2004). *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)*. Human Reproduction 19(1):41-7.
- Felip RA, Outomuro BC, Guinart JV, Pérez PAC (2003). *A comparative study of step-down and low-dose step-up ovulation induction regimens with recombinant FSH administration for non-assisted fertility treatment in patients with low ovarian reserve*. Human Reproduction 18:184.
- Fernández D (1996). *Papel de las aminopeptidasas cerebrales en la liberación de gonadotropinas*. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.
- Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L (2002). *Peptidase activities in human semen*. Peptides 23(3):461-8.
- Ferro ES, Hyslop S, Camargo ACM (2004). *Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions*. Journal of Neurochemistry 91(4):769-77.
- Ferro J, Remohí J, Pellicer A (2009). *Valoración Tubárica: evaluación del estado tubárico en medicina reproductiva. Guía de Protocolos en Reproducción Humana*. J. Remohí, J. Bellver, A. Requena and A. Pellicer, Momento Médico Iberoamericana:55-9.
- Filicori M (2003). *Use of luteinizing hormone in the treatment of infertility: time for reassessment?* Fertility and Sterility 79(2):253-5.
- Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Ciampaglia W, Bernardi S (2003). *Current concepts and novel applications of LH activity in ovarian stimulation*. Trends in Endocrinology and Metabolism 14(6):267-73.
- Fink G (1988). *Estrogen and progesterone interactions in the control of gonadotropin and prolactin secretion*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 30(1-6):169-78.
- Flentke GR, Munoz E, Huber BT, Plaut AG, Kettner CA, Bachovchin WW (1991). *Inhibition of dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(4):1556-9.
- Florentin D, Sassi A, Roques BP (1984). *A highly sensitive fluorometric assay for enkephalinase, a neutral metalloendopeptidase that releases Tyrosine-Glycine-Glycine from enkephalins*. Analytical Biochemistry 141(1):62-9.
- Fontes J, Romero B, González I, Aibar L (2012). *Fisiopatología. Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)*. M. A. Checa, J. J. Espinós and R. Matorras, Editorial Médica Panamericana:25-35.

- Foulon T, Cadel S, Chesneau V, Draoui M, Prat A, Cohen P (1996). Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: functional properties, structure, and cellular distribution. *Neuropeptides: Basic and Clinical Advances* 780:106-20.
- Foulon T, Cadel S, Piesse C, Cohen P, Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF (2004). *Aminopeptidase B. Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA (2001). Fertilization promoting peptide - A possible regulator of sperm function in vivo. *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications*, Vol 63 63:1-28.
- Fujimura H, Ino K, Nagasaka T, Nakashima N, Nakazato H, Kikkawa F, Mizutani S (2000). *Aminopeptidase A expression in cervical neoplasia and its relationship to neoplastic transformation and progression*. *Oncology* 58(4):342-52.
- Fujisawa M, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (1996). *Metenkephalin in seminal plasma of infertile men*. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association* 3(4):297-300.
- Fujiwara H, Maeda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Horie K, Takakura K, Taii S, Mori T (1992a). *Differential expression of aminopeptidase N on human ovarian granulosa and theca cells*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 74(1):91-5.
- Fujiwara H, Maeda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Takakura K, Mori T (1992b). *Human luteal cells express dipeptidyl peptidase IV on the cell surface*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75(5):1352-7.
- Fujiwara H, Imai K, Inoue T, Maeda M, Fujii S (1999). *Membrane-bound cell surface peptidases in reproductive organs*. *Endocrine Journal* 46(1):11-25.
- Fukasawa KM, Fukasawa K, Kanari M, Fujii S, Harada M (1996). *Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B*. *Journal of Biological Chemistry* 271(48):30731- 5.
- Fulghesu AM, Angioni S, Frau E, Belosi C, Apa R, Mioni R, Xamin N, Capobianco GP, Dessole S, Fruzzetti F, Lazzarini V, Minerba L, Melis GB, Lanzzone A (2007). *Ultrasound in polycystic ovary syndrome - the measuring of ovarian stroma and relationship with circulating androgens: results of a multicentric study*. *Human Reproduction* 22(9):2501- 8.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O (2008). *Renin-angiotensin system revisited*. *Journal of Internal Medicine* 264(3):224-36.



- Gainer H, Russell JT, Loh YP (1984). An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from β -lipotropin60-65. *Febs Letters* 175(1):135-9.
- Garcia-Horsman JA, Mannisto PT, Venalainen JI (2007). On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 41(1):1-24.
- Garruti G, Depalo R, Vita MG, Lorusso F, Giampetruzzi F, Damato AB, Giorgino F (2009). Adipose tissue, metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome: from pathophysiology to treatment. *Reproductive Biomedicine Online* 19(4):552-63.
- Gass J, Khosla C (2007). Prolyl endopeptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(3):345-55.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82-3:431-46.
- Giles J, Vidal C (2012). Fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática de espermatozoides. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, J. Bellver, R. Matorras, A. Ballesteros and A. Pellicer. Madrid, Editorial Médica Panamericana:341-7.
- Glenner GG, McMillan PJ, Folk JE (1962). A mammalian peptidase specific for hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194(4831):867.
- Gonzales J, Lesourd S, Vandreden P, Richard P, Lefebvre G, Brouzes DV (1992). Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in vitro fertilization (IVF). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 9(3):211-6.
- González C, Boada M, Devesa M, Buenaventura C, Veiga A (2011). Cultivo follicular in vitro - In vitro follicle culture. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* 28(1):99-107.
- González R, Quintana J, Campos I, Magán R, Ballesteros A (2007a). Estudio de la mujer estéril. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, J. Bellver, J. Domingo, E. Bosch and A. Pellicer, McGraw-Hill:1-9.
- González S, Martínez-Cañavete MJ, Fernández-Mellado MJ (2007b). Hidrosálpinx. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, J. Bellver, J. Domingo, E. Bosch and A. Pellicer, McGraw-Hill:133-8.
- Goossens F, DeMeester I, Vanhoof G, Scharpe S (1996a). Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 34(1):17-22.

- Goossens FJ, Wauters JG, Vanhoof GC, Bossuyt PJ, Schatteman KA, Loens K, Scharpe SL (1996b). *Subregional mapping of the human lymphocyte prolyl oligopeptidase gene (PREP) to human chromosome 6q22*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 74(1-2):99-101.
- Gossett DR, Nayak S, Bhatt S, Bailey SC (2013). *What Do Healthy Women Know About the Consequences of Delayed Childbearing?* *Journal of Health Communication* 18:118-28.
- Goto Y, Hattori A, Ishii Y, Mizutani S, Tsujimoto M (2006). *Enzymatic properties of human aminopeptidase A: regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV*. *Journal of Biological Chemistry* 281(33):23503-13.
- Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T (1988). *Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients*. *Clinical Chemistry* 34(12):2499-501.
- Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC (1994). *Age-related-changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of nongrowing and early-growing follicles in aging women*. *Biology of Reproduction* 50(3):653-63.
- Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JPW, Schats R, Rutten FFH, Schoemaker J (2000). *Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis*. *Lancet* 355(9197):13-8.
- Greenberg L (1962). *Fluorimetric measurements of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10^{-14} mole*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 9:430-5.
- Gregory L (1998). *Ovarian markers of implantation potential in assisted reproduction*. *Human Reproduction* 13:117-32.
- Grioli S, Lomeo C, Quattropani MC, Spignoli G, Villardita C (1990). *Pyroglutamic acid improves the age associated memory impairment*. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 4(2):169-73.
- Gros C, Giros B, Schwartz JC (1985a). *Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat-brain: Identification of aminopeptidase-M*. *Neuropeptides* 5(4-6):485-8.
- Gros C, Giros B, Schwartz JC (1985b). *Identification of aminopeptidase-M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes*. *Biochemistry* 24(9):2179-85.



- Guyton AC, Hall JE (2011). *Tratado de fisiología médica*. Barcelona. Elsevier.
- Haeggström J (2004). Aminopeptidase PS. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. A. Barrett, N. Rawlings and J. Woessner, Elsevier Academic Press. 1:313-6.
- Hallberg M, Le Grevés P, Nyberg F (2005). *Neuropeptide processing. Proteases in the Brain*. Lendeckel N.M., Hooper U. Edizioa. Springer Science 203-34.
- Hamada H, Kishioka S, Yamoto M, Nakano R (1995). [H-3] Naloxone binding-sites in porcine ovarian follicles and corpora-lutea during the ovarian cycle. *European Journal of Endocrinology* 132(5):622-6.
- Hamel M, Vanselow J, Nicola ES, Price CA (2005). Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development* 70(2):175-83.
- Hannoun A, Ghaziri G, Abu Musa A, Zreik TG, Hajameh F, Awwad J (2010). Addition of sphingosine-1-phosphate to human oocyte culture medium decreases embryo fragmentation. *Reproductive Biomedicine Online* 20(3):328-34.
- Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F (2006). Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility* 86(2):433-9.
- Harb H, Gallos I, Chu J, Harb M, Coomarasamy A (2013). The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 120(11):1308-20.
- Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M (2002). Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: Its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 122(2):376-86.
- Hassan E, Creatsas G, Mastorakos G, Michalas S (2000). Clinical implications of the ovarian/endometrial renin-angiotensin-aldosterone system. *Young Woman at the Rise of the 21st Century: Gynecological and Reproductive Issues in Health and Disease*. G. Creatsas, G. Mastorakos and G. P. Chrousos. 900:107-18.
- Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH (2008). The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 13:1634-45.

- Hersh LB, McKelvy JF (1981). *An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin*. *Journal of Neurochemistry* 36(1):171-8.
- Hiroi Y, Endo Y, Natori Y (1992). *Purification and properties of an aminopeptidase from rat liver cytosol*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294(2):440-5.
- Hirschi KK, Damore PA (1996). *Pericytes in the microvasculature*. *Cardiovascular Research* 32(4):687-98.
- Hohmann FP, Macklon NS, Fauser B (2003). *A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(1):166-73.
- Hohmann FP, Laven JSE, Mulders A, Oberye J JL, Mannaerts B, de Jong FH, Fauser B (2005). *LH suppression following different low doses of the GnRH antagonist ganirelix in polycystic ovary syndrome*. *Journal of Endocrinological Investigation* 28(11):990-7.
- Homburg R (2009). *Androgen circle of polycystic ovary syndrome*. *Human Reproduction* 24(7):1548-55.
- Hopsu VK, Makinen KK, Glenner GG (1966). *Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and affector studies*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 114(3):567-75.
- Horio J, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Nakanishi Y, Kumano Y, Takami S, Kinoshita M, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S (1999). *Structural organization of the 5'-end and chromosomal assignment of human placental leucine aminopeptidase insulin-regulated membrane aminopeptidase gene*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262(1):269-74.
- Huang K, Takahara S, Kinouchi T, Takeyama M, Ishida T, Ueyama H, Nishi K, Ohkubo I (1997). *Alanyl aminopeptidase from human seminal plasma: Purification, characterization, and immunohistochemical localization in the male genital tract*. *Journal of Biochemistry* 122(4):779-87.
- Hui K-S (2007). *Brain-specific aminopeptidase: From enkephalinase to protector against neurodegeneration*. *Neurochemical Research* 32(12):2062-71.
- Hunault CC, Eijkemans MJC, Pieters M, Velde ERT, Habbema JDF, Fauser B, Macklon NS (2002). *A prediction model for selecting patients undergoing in vitro fertilization for elective single embryo transfer*. *Fertility and Sterility* 77(4):725-32.

- Hwang S-R, O'Neill A, Bark S, Foulon T, Hook V (2007). *Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules*. Journal of Neurochemistry 100(5):1340-50.
- Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Okamoto N, Kariya M, Emi N, Takakura K, Kanzaki H, Mori T (1992a). *Human endometrial stromal cells and decidual cells express cluster of differentiation (CD) 13 antigen/aminopeptidase N and CD10 antigen/neutral endopeptidase*. Biology of Reproduction 46(3):328-34.
- Imai K, Kanzaki H, Fujiwara H, Kariya M, Okamoto N, Takakura K, Maeda M, Mori T (1992b). *Expression of aminopeptidase N and neutral endopeptidase on the endometrial stromal cells in endometriosis and adenomyosis*. Human Reproduction 7(9):1326-8.
- Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Kariya M, Takakura K, Kanzaki H, Mori T (1992c). *Dipeptidyl peptidase IV as a differentiation marker of the human endometrial glandular cells*. Human Reproduction 7(9):1189-94.
- Imai K, Kanzaki H, Mori T (1996). *Cell surface peptidases in human endometrium*. Molecular human reproduction 2(6):425-31.
- Imoedenhe D, A S (1988). *A study of intraovarian predictors of oocyte fertilization in vitro*. IVth Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Barcelona. Abstr 217.
- Ino K, Uehara C, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Suzuki T, Khin EE, Ito M, Takeuchi M, Itakura A, Mizutani S (2003). *Enhancement of aminopeptidase A expression during angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT(1) receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 88(8):3973-82.
- Iorga AI, Valentini L, De Santis T, Ambruosi B, Albrizio M, Guaricci AC, Caira M, Dell'Aquila ME (2009). *Expression of the mu Opioid Receptor and Effects of the Opioid Antagonist Baloxone on In Vitro Maturation of Oocytes Recovered from Anoestrous Bitches*. Reproduction in Domestic Animals 44:263-8.
- Irazusta J, Larrinaga G, Gonzalez-Maeso J, Gil J, Meana JJ, Casis L (2002). *Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain*. Neurochemistry International 40(4):337-45.
- Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L (2004). *Enkephalin- degrading enzymes in normal and subfertile human semen*. Journal of Andrology 25(5):733-9.

Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yoshida S, Hioki T, Tatematsu M, Yamamoto H, Hirano K (2001). *Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion*. International Journal of Cancer 92(1):49-54.

Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Kikkawa F, Tsujimoto M, Ishiura S, Mizutani S (2004). *ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase*. Biochemical and Biophysical Research Communications 314(4):1008-13.

Ito T, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Iwase A, Kikkawa F, Tsujimoto M, Mizutani S (2001). *Transcriptional regulation of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene*. Molecular human reproduction 7(9):887-94.

Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y (1998). *Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence*. Journal of Biochemistry 124(2):428-33.

J

Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, Hu YH (2001). *The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(4):1930-4.

Judd HL, Fournet N (1994). *Changes of ovarian hormonal function with aging*. Experimental Gerontology 29(3-4):285-98.

Jung K, Pergande M, Wischke UW (1984). *Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline-phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human-urine*. Biomedica Biochimica Acta 43(12):1357-64.

K

Kalra SP (1992). *Hypothalamic opioid systems and reproduction - physiological considerations*. Hormones in Gynecological Endocrinology.

Kamath MS, Bhattacharya S (2012). *Demographics of infertility and management of unexplained infertility*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 26(6):729-38.

Kaminski T, Siawrys G, Bogacka I, Przala J (2000). *The physiological role of beta-endorphin in porcine ovarian follicles*. Reproduction Nutrition Development 40(1):63-75.

Kaminski T, Siawrys G, Bogacka I, Okrasa S, Przala J (2003). *The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells*. Animal Reproduction Science 78(1-2):71-84.

Kandror KV, Yu LC, Pilch PF (1994). *The major protein of Glut4-containing vesicles, gp160, has aminopeptidase activity*. Journal of Biological Chemistry 269(49):30777-80.

- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B (1997). *Expression of functional leptin receptors in the human ovary*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 82(12):4144-8.
- Katz E, Akman MA, Damewood MD, Garcia JE (1996). *Deleterious effect of the presence of hydrosalpinx on implantation and pregnancy rates with in vitro fertilization*. Fertility and Sterility 66(1):122-5.
- Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE (1995). *Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles*. Journal of Biological Chemistry 270(40):23612-8.
- Kelly JA, Neidle EL, Neidle A (1983). *An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues*. Journal of Neurochemistry 40(6):1727-34.
- Kenny J (1986). *Cell - surface peptidases are neither peptide - specific nor organ - specific*. Trends in Biochemical Sciences 11(1):40-2.
- Keppler D, Walter R, Pérez C, Sierra F (2000). *Increased expression of mature cathepsin B in aging rat liver*. Cell and Tissue Research 302(2):181-8.
- Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nomura S, Mizutani S (2005). *Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1751(1):45-51.
- Kimura A, Ohnishi J, Takahashi T (1997). *Analysis of prolyl endopeptidase activity and expression during follicular maturation in porcine ovary*. Advances in Comparative Endocrinology, Tomes 1 and 2.
- Kimura A, Ohnishi J, Okimura H, Hamabata T, Takahashi T (1998). *Localization of prolyl endopeptidase mRNA in small growing follicles of porcine ovary*. Molecular Reproduction and Development 50(2):121-7.
- Kimura A, Matsui H, Takahashi T (2002). *Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility*. Zoological Science 19(1):93-102.
- Kovac JR, Smith RP, Lipshultz LI (2013). *Relationship between advanced paternal age and male fertility highlights an impending paradigm shift in reproductive biology*. Fertility and Sterility 100(1):58-9.
- Kreiner D, Liu HC, Itskovitz J, Veeck L, Rosenwaks Z (1987). *Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality*. Fertility and Sterility 48(6):991- 4.

Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D'Herde K (2008). *Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis*. *Apoptosis* 13(9):1065-87.

Kuhl H, Taubert HD (1975). *Short-loop feedback mechanism of luteinizing-hormone: LH stimulates hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate LH-RH in rat hypothalamus*. *Acta Endocrinologica* 78(4):649-63.

Kuhl H, Rosniatowski C, Taubert HD (1978). *Activity of an LH-RH-degrading enzyme in anterior-pituitary during rat estrus cycle and its alteration by injections of sex-hormones*. *Acta Endocrinologica* 87(3):476-84.

Larrinaga G, Pérez I, Blanco L, Lopez JI, Andres L, Etxezarraga C, Santaolalla F, Zabala A, Varona A, Irazusta J (2010). *Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia*. *Regulatory Peptides* 163(1-3):102-6.

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Zarrazquin I, Casis L, Antonio Anta J, Martinez A, Santaolalla F (2011a). *Altered dipeptidyl peptidase IV and prolyl endopeptidase activities in chronic tonsillitis, tonsillar hyperplasia and adenoid hyperplasia*. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(3):347-50.

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Irazusta A, Zarrazquin I, Elena Sanchez C, Sanchez del Rey A, Zabala A, Santaolalla F (2011b). *Activity of soluble aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV and membrane-bound aminopeptidase B and pyroglutamyl peptidase I in adenoid hyperplasia, tonsillar hyperplasia and chronic tonsillitis*. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 75(11):1399-403.

Larrinaga G, Blanco L, Sanz B, Pérez I, Gil J, Unda M, Andres L, Casis L, Lopez JI (2012). *The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 303(12):F1584-F91.

Lauffart B, McDermott J, Jones P, Mantle D (1988). *Amino acid inhibition of aminopeptidases purified from human cerebral cortex*. *Biochemical Society Transactions* 16(5):849-50.

Laustsen PG, Rasmussen TE, Petersen K, PedrazaDiaz S, Moestrup SK, Gliemann J, SottrupJensen L, Kristensen T (1997). *The complete amino acid sequence of human placental oxytocinase*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression* 1352(1):1-7.

Lee MS, Benrafael Z, Meloni F, Mastroianni L, Flickinger GL (1987). *Relationship of human oocyte maturity, fertilization, and cleavage to follicular-fluid prolactin and steroids*. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4(3):168-72.

- Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A (1999). *Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: A prospective, controlled study in 254 affected women*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84(1):165-9.
- Leung PS (2007). *The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas*. Journal of Physiology-London 580(1):31-7.
- Lewis SEM, Aitken RJ, Conner SJ, De Iuliis G, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P (2013). *The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment*. Reproductive Biomedicine Online 27(4):325-37.
- Ley_14/2006 (2006). Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2006-9292, Gobierno de España. Boletín Oficial del Estado (BOE). núm 126: 19947-56.
- Ley_45/2003 (2003). Ley 45/2003, de 21 de noviembre, sobre técnicas de reproducción asistida. <http://www.boe.es/boe/dias/2003/11/22/pdfs/A41458-41463.pdf>, Gobierno de España. Boletín Oficial del Estado (BOE). núm 280: 41458-63.
- Li JR, Wilk E, Wilk S (1996). *Inhibition of prolyl oligopeptidase by Fmoc- aminoacylpyrrolidine-2-nitriles*. Journal of Neurochemistry 66(5):2105-12.
- Li L, Xu B-f, Chen Q-j, Sun X-x (2010). *Effects of hydrosalpinx on pinopodes, leukaemia inhibitory factor, integrin beta 3 and MUC1 expression in the peri-implantation endometrium*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 151(2):171-5.
- Linardi A, Panunto PC, Ferro ES, Hyslop S (2004). *Peptidase activities in rats treated chronically with N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)*. Biochemical Pharmacology 68(2):205-14.
- Lindner C, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, Bettendorf G (1988). *Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes*. Hormone and Metabolic Research 20(4):243-6.
- Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG (2007). *Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma - An optimal and practical panel for differential diagnosis*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 131(8):1290-7.
- Lojda Z, Gossrau R (1980). *Study on aminopeptidase A*. Histochemistry 67(3):267-90.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC (1989). *Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase-N*. Journal of Clinical Investigation 83(4):1299-307.

López ME (2008). *Calidad folicular: Agonistas versus antagonistas de la GnRH en una población de buen pronóstico*. Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Tesis doctoral.

Lovekamp-Swan T, Davis BJ (2003). *Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system*. Environmental Health Perspectives 111(2):139-45.

MacDougall MJ, Tan SL, Balen A, Jacobs HS (1993). *A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in vitro fertilization*. Human Reproduction 8(2):233-7.

Mantikou E, Youssef MAFM, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S (2013). *Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review*. Human Reproduction Update 19(3):210-20.

Mantle D, Hardy MF, Lauffart B, McDermott JR, Smith AI, Pennington RJT (1983). *Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle*. Biochemical Journal 211(3):567-73.

Mantle D, Lauffart B, McDermott J, Gibson A (1990). *Characterization of aminopeptidases in human kidney soluble fraction*. Clinica Chimica Acta 187(2):105-13.

Mantle D (1992). *Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues*. Clinica Chimica Acta 207(1-2):107-18.

Marchio S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA, Hajitou A, Ozawa MG, Trepel M, Giordano RJ, Nanus DM, Dijkman H, Oosterwijk E, Sidman RL, Cooper MD, Bussolino F, Pasqualini R, Arap W (2004). *Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels*. Cancer Cell 5(2):151-62.

Marks N, Datta RK, Lajtha A (1968a). *Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases*. Journal of Biological Chemistry 243(11):2882-8.

Marks N, Datta RK, Lajtha A (1968b). *The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain. Macromolecules and Function of the neurone*. Lodin Z. Edizioa. Excerpta Medica.

Marks N, Stern F, Lajtha A (1975). *Changes in proteolytic enzymes and proteins during maturation of brain*. Brain Research 86(2):307-22.

Maroulis GB (1991). *Effect of aging on fertility and pregnancy*. Seminars in Reproductive Endocrinology 9(3):165-75.

- Martínez-Salazar J, Cerrillo M, Ferrando M (2007). Tratamiento quirúrgico de la endometriosis. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, J. Bellver, J. Domingo, E. Bosch and A. Pellicer, McGraw-Hill:75-83.
- Maruani P, Schwartz D (1983). *Sterility and fecundability estimation*. Journal of Theoretical Biology 105(2):211-9.
- Matalliotakis IM, Cakmak H, Mahutte N, Fragouli Y, Arici A, Sakkas D (2007). *Women with advanced-stage endometriosis and previous surgery respond less well to gonadotropin stimulation, but have similar IVF implantation and delivery rates compared with women with tubal factor infertility*. Fertility and Sterility 88(6):1568-72.
- Matsas R, Stephenson SL, Hryszko J, Kenny AJ, Turner AJ (1985). *The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase-N*. Biochemical Journal 231(2):445-9.
- Matsumoto H, Rogi T, Yamashiro K, Kodama S, Tsuruoka N, Hattori A, Takio K, Mizutani S, Tsujimoto M (2000). *Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells*. European Journal of Biochemistry 267(1):46-52.
- McLellan S, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB (1988). *Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases*. Journal of Neurochemistry 51(5):1552-9.
- Melner MH, Young SL, Czerwiec FS, Lyn D, Puett D, Roberts JL, Koos RD (1986). *The regulation of granulosa cell proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid by androgens and gonadotropins*. Endocrinology 119(5):2082-8.
- Mendoza Ladrón N, Salamanca A, Lobo P (2012). Factores socioculturales y reproducción. *Estilo de vida y fertilidad*. M. Checa, D. Manau and F. Martínez. Madrid, Editorial Médica Panamericana:1-11.
- Meyer C, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ (2005). *Vascular dysfunction and metabolic parameters in polycystic ovary syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90(8):4630-5.
- Mina-Osorio P (2008). *The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target*. Trends in Molecular Medicine 14(8):361-71.
- Minaretzis D, Harris D, Alper MM, Mortola JF, Berger MJ, Power D (1998). *Multivariate analysis of factors predictive of successful live births in in vitro fertilization (IVF) suggests strategies to improve IVF outcome*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 15(6):365-71.

- Minguez Y, Rubio C, Bernal A, Gaitan P, Remohi J, Simon C, Pellicer A (1997). *The impact of endometriosis in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection because of male infertility*. Human Reproduction 12(10):2282-5.
- Minoia R, Neglia G, Gasparri B, Ambruosi B, Dell'Aquila ME, Zicarelli L (2008). *Immunofluorescence Detection of Mu-opioid Receptors on Buffalo (Bubalis Bubalis) Primary and In Vitro Matured Oocytes*. Reproduction in Domestic Animals 43:81-.
- Mitsui T, Nomura S, Itakura A, Mizutani S (2004). *Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27(6):768-71.
- Miyazaki T, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Katz E, Wallach EE (1991). *Do prostaglandins lead to ovulation in the rabbit by stimulating proteolytic - enzyme activity?* Fertility and Sterility 55(6):1183-8.
- Mizutani S, Hayakawa H, Akiyama H, Sakura H, Yoshino M, Oya M, Kawashima Y (1982). *Simultaneous determinations of plasma oxytocin and serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) during late pregnancy*. Clinical Biochemistry 15(3):141-5.
- Mizutani S, Sumi S, Suzuki O, Narita O, Tomoda Y (1984). *Post-proline endopeptidase in human placenta*. Biochemical and Biophysical Acta 1(2):113-7.
- Moeller I, Albiston AL, Lew RA, Mendelsohn FAO, Chai SY (1999). *A globin fragment, LVV- hemorphin-7, induces H-3 thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT(4) receptor*. Journal of Neurochemistry 73(1):301-8.
- Molina R (1990). *Parámetros bioquímicos del líquido folicular y su relación con la fertilización in vitro de los ovocitos*. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Universidad de Granada.
- Momeni N, Yoshimoto T, Ryberg B, Sandberg-Wollheim M, Grubb A (2003). *Factors influencing analysis of prolyl endopeptidase in human blood and cerebrospinal fluid: increase in assay sensitivity*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 63(6):387-95.
- Monsuur AJ, Stepniak D, Diosdado B, Wapenaar MC, Mearin ML, Koning F, Wijmenga C (2006). *Genetic and functional analysis of pyroglutamyl-peptidase I in coeliac disease*. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 18(6):637-44.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T (1990). *Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro*. Journal of reproduction and fertility. Supplement 40:197-210.
- Moore K, Persaud T (1999). *Embriología Clínica*. McGraw-Hill.1 (8).

- Moore K, Persaud T, Torchia MG (2011). *The Developing Human: clinically oriented embryology*. Saunders - Elsevier (9).
- Morain P, Robin JL, De Nanteuil G, Jochemsen R, Heidet V, Guez D (2000). *Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study*. British Journal of Clinical Pharmacology 50(4):350-9.
- Morain P, Boeijsinga PH, Demazieres A, De Nanteuil G, Luthringer R (2007). *Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers*. Neuropsychobiology 55(3-4):176-83.
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS (2002). *Leptin and reproduction: a review*. Fertility and Sterility 77(3):433-44.
- Motta PM, Makabe S (1986). *Elimination of germ-cells during differentiation of the human- ovary: an electron-microscopic study*. European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology 22(5-6):271-86.
- Múgica J, Roméu C, Urries A, Sanz B, Pérez I, Casis L (2009). *Metabolismo peptídico en líquido folicular*. Revista del Laboratorio Clínico 2:46.
- Murakami H, Yokoyama A, Kondo K, Nakanishi S, Kohno N, Miyake M (2005). *Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer*. Clinical Cancer Research 11(24):8674-9.
- Mustafa T, Chai SY, May CN, Mendelsohn FAO, Albiston AL (2004). *Oxytocinase/insulin- regulated aminopeptidase is distributed throughout the sheep, female reproductive tract and is regulated by oestrogen in the uterus*. Regulatory Peptides 122(2):85-9.
- Myohanen TT, Kaariainen TM, Jalkanen AJ, Piltonen M, Mannisto PT (2009). *Localization of prolyl oligopeptidase in the thalamic and cortical projection neurons: A retrograde neurotracing study in the rat brain*. Neuroscience Letters 450(2):201-5.
- Myohanen TT, Tenorio-Laranga J, Jokinen B, Vazquez-Sanchez R, Moreno-Baylach MJ, Garcia-Horsman JA, Mannisto PT (2011). *Prolyl oligopeptidase induces angiogenesis both in vitro and in vivo in a novel regulatory manner*. British Journal of Pharmacology 163(8):1666-78.
- Nagasaka T, Nomura S, Okamura M, Tsujimoto M, Nakazato H, Oiso Y, Nakashima N, Mizutani S (1997). *Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues*. Reproduction Fertility and Development 9(8):747-53.



- Nagatsu I, Gillespi.L, Folk JE, Glenner GG (1965). *Serum aminopeptidases, "angiotensinase", and hypertension: I. Degradation of angiotensin II by human serum*. *Biochemical Pharmacology* 14(5):721-&.
- Nanus DM (2003). *Of peptides and peptidases: The role of cell surface peptidases in cancer*. *Clinical Cancer Research* 9(17):6307-9.
- Nascimento-Silva MCL, Leal AT, Daffre S, Juliano L, Vaz ID, Paiva-Silva GD, Oliveira PL, Sorgine MHF (2008). *BYC, an atypical aspartic endopeptidase from Rhipicephalus (Boophilus) microplus eggs*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 149(4):599-607.
- Nasmyth K (2001). *Disseminating the genome: Joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis*. *Annual Review of Genetics* 35:673-745.
- Nemeth G, Pepperell JR, Yamada Y, Palumbo A, Naftolin F (1994). *The basis and evidence of a role for the ovarian renin-angiotensin system in health and disease*. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 1(2):118-27.
- Neves LAA, Chappell MC, Ferrario CM, Gallagher PE, Ganten D, Brosnihan KB (2006). *Effect of estrogen on neprilysin expression in uterus and kidney of Sprague-Dawley normotensive and heterozygous (mRen2)27-transgenic hypertensive rats*. *Peptides* 27(11):2912-8.
- Nicolás M, Fernández L, Albero P, Landeras J (2012). *Prevención del embarazo múltiple*. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, J. Bellver, R. Matorras, A. Ballesteros and A. Pellicer. Madrid, Editorial Médica Panamericana:547-58.
- NIH. (2013, 13/09/2011). *Institutos Nacionales de la Salud (NIH) - Medline Plus: Menopausia* Retrieved 06/01/2013, 2013, from <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000894.htm>.
- Niinimaki M, Suikkari AM, Makinen S, Soderstrom-Anttila V, Martikainen H (2013). *Elective single-embryo transfer in women aged 40-44 years*. *Human Reproduction* 28(2):331-5.
- Noble F, Roques BP (2007). *Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11(2):145-59.
- Nogueira D, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Ron-El R, Smitz J (2006). *Oocyte maturity and preimplantation development in relation to follicle diameter in gonadotropin-releasing hormone agonist or antagonist treatments*. *Fertility and Sterility* 85(3):578-83.

- Nomura S, Tsujimoto M, Mizutani S, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004). *Cystinyl aminopeptidase, oxytocinase and insulin-regulated aminopeptidase. Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.
- Nomura S, Ito T, Yamamoto E, Sumigama S, Iwase A, Okada M, Shibata K, Ando H, Ino K, Kikkawa F, Mizutani S (2005). *Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy*. *Biochimica Et Biophysica Acta- Proteins and Proteomics* 1751(1):19-25.
- O'Cuinn G, O'Connor B, Elmore M (1990). *Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue*. *Journal of Neurochemistry* 54(1):1-13.
- O'Cuinn G (1998). *Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells*. *Biochemical Society Transactions* 26(3):279-92.
- Ocain TD, Rich DH (1987). *L-Lysinethiol: A subnanomolar inhibitor of aminopeptidase B*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 145(3):1038-42.
- Ofner LD, Hooper NM (2002). *Ectodomain shedding of cystinyl aminopeptidase from human placental membranes*. *Placenta* 23(1):65-70.
- Okohue JE, Onuh SO, Ikimalo JI (2013). *Comparison of IVF/ICSI outcome in patients with polycystic ovarian syndrome or tubal factor infertility*. *Nigerian journal of clinical practice* 16(2):207-10.
- Oktem O, Urman B (2010). *Understanding follicle growth in vivo*. *Human Reproduction* 25(12):2944-54.
- Okudaira Y, Funahashi H (2013). *146 effect of protein synthesis inhibitor on boar sperm capacitation and fertilization in vitro*. *Reproduction, fertility, and development* 26(1):186- 7.
- Oleary RM, Gallagher SP, Oconnor B (1996). *Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28(4):441-9.
- Olivius C, Lundin K, Bergh C (2008). *Predictive factors for live birth in cryopreservation single embryo transfer cycles*. *Reproductive Biomedicine Online* 17(5):676-83.
- Ondetti MA, Cushman DW (1977). *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents*. *Science* 196(4288):441-4.



Osada T, Watanabe G, Sakaki Y, Takeuchi T (2001a). *Puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for the maternal recognition of pregnancy in mice*. *Molecular Endocrinology* 15(6):882-93.

Osada T, Watanabe G, Kondo S, Toyoda M, Sakaki Y, Takeuchi T (2001b). *Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice*. *Molecular Endocrinology* 15(6):960-71.

P

Palomino WA, Argandoña F, Azua R, Kohen P, Devoto L (2013). *Complement C3 and Decay-Accelerating Factor Expression Levels Are Modulated by Human Chorionic Gonadotropin in Endometrial Compartments During the Implantation Window*. *Reproductive Sciences* 20(9):1103-10.

Pandian Z, Bhattacharya S (2013). *IVF for unexplained infertility*. *Human Reproduction Update* 19(5):431.

Paolini P, Egui P, Gartner F (1963). *Insufflation in 200 cases of hydrosalpinx*. *Revista de obstetricia y ginecología de Venezuela* 23:649-56.

Pardanaud L, Dieterlenlievre F (1993). *Emergence of endothelial and hematopoietic cells in the avian embryo*. *Anatomy and Embryology* 187(2):107-14.

Parvizi N (2000). *Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female*. *Anim Reprod Sci* 60-61:31-47.

Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2003). *Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes*. *Human Genetics* 112(2):195-203.

Peralta L (2012). *Expresión y localización de los receptores opioides (δ , κ , μ) y los receptores cannabinoides (CB_1 , CB_2) durante la reanudación de la meiosis en ovocitos humanos*. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Pereira VM, Reis FM, Santos RAS, Cassali GD, Santos SHS, Honorato-Sampaio K, dos Reis AM (2009). *Gonadotropin Stimulation Increases the Expression of Angiotensin-(1-7) and Mas Receptor in the Rat Ovary*. *Reproductive Sciences* 16(12):1165-74.

Pérez I, Varona A, Blanco L, Gil J, Santaolalla F, Zabala A, Martínez Ibarquén A, Irazusta J, Larrinaga G (2009). *Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma*. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 31(10):1335-40.

Pérez I (2011). *Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en neoplasias colorectales*. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

- Petraglia F, Comitini G, Dambrogio G, Volpe A, Facchinetti F, Alessandrini G, Genazzani AR (1985). *Short-term effects of ovariectomy: The opioid control of LH secretion in fertile climateric and postmenopausal women*. *Journal of Endocrinological Investigation* 8(4):325-30.
- Petraglia F, Facchinetti F, Mfuta K, Ruspa M, Bonavera JJ, Gandolfi F, Genazzani AR (1986). *Endogenous opioid peptides in uterine fluid*. *Fertility and Sterility* 46(2):247-51.
- Petraglia F, Dimeo G, Storchi R, Segre A, Facchinetti F, Szalay S, Volpe A, Genazzani AR (1987). *Proopiomelanocortin related peptides and methionine enkephalin in human follicular fluid: Changes during the menstrual cycle*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 157(1):142-6.
- Pham V, Burns P, Albiston AL, Yeatman HR, Ng L, Diwakarla S, Chai SY (2009). *Reproduction and maternal behavior in insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) knockout mice*. *Peptides* 30(10):1861-5.
- Picton H, Briggs D, Gosden R (1998). *The molecular basis of oocyte growth and development*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145(1-2):27-37.
- Pinto FM, Ravina CG, Subirán N, Cejudo-Roman A, Fernández-Sánchez M, Irazusta J, Garrido N, Candenas L (2010). *Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8.
- Poikkeus P, Tiitinen A (2008). *Does single embryo transfer improve the obstetric and neonatal outcome of singleton pregnancy?* *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 87(9):888-92.
- Polanski Z, Ledan E, Brunet S, Louvet S, Verlhac MH, Kubiak JZ, Maro B (1998). *Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes*. *Development* 125(24):4989-97.
- Polgár L (2002). *The prolyl oligopeptidase family*. *Cell Mol Life Sci* 59(2):349-62.
- Polisseni F, Faletti AG, Pereira VM, Reis AM, Camargos AF, Reis FM (2005). *Prolactin inhibits oocyte release after gonadotropin stimulation in the rat: Putative mechanism involving ovarian production of beta-endorphin and prostaglandin*. *Fertility and Sterility* 83:1119-24.
- Prados N, Crespo M, Hernández MJ, Ruiz M, García J, Vime P, Calderón G, Fernández-Sánchez M (2007). *Criterios de selección embrionaria. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, A. Cobo, J. Romero, M. J. de los Santos and A. Pellicer, McGraw-Hill:202-14.
- Pro B, Dang NH (2004). *CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer*. *Histology and Histopathology* 19(4):1345-51.

Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, Schutyser E, Put W, Parmentier M, Struyf S, Van Damme J (2007). *Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration*. Blood 110(1):37-44.

Quartim C, Melo MA, Reis S (2012). *Estilo de vida y ambiente. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. J. Remohí, J. Bellver, R. Matorras, A. Ballesteros and A. Pellicer. Madrid, Editorial Médica Panamericana:13-23.

Rabinovici J, Jaffe RB (1990). *Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads*. Endocrine Reviews 11(4):532-57.

Ragni G, Delauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Gambaro V (1988). *Gonadal function in male heroin and methadone addicts*. International Journal of Andrology 11(2):93-100.

Ramirez-Expósito MJ, Martinez JM, Prieto I, Alba F, Ramirez M (2000). *Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs*. Hormone and Metabolic Research 32(5):161-3.

Ramón M (2011). *Estudio de la actividad aminopeptidásica en espermatozoides astenozoospermicos. Comparación clínica*. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.

Rawlings ND, Polgar L, Barrett AJ (1991). *A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase*. Biochemical Journal 279:907-8.

Rawlings ND, Barrett AJ (1995). *Evolutionary families of metallopeptidases*. Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases 248:183-228.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010). *MEROPS: the peptidase database*. Nucleic Acids Research 38:D227-D33.

Re RN (2002). *The origins of intracrine hormone action*. American Journal of the Medical Sciences 323(1):43-8.

Re RN (2003). *Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes*. Hypertension 42(2):117-22.

Re RN, Cook JL (2006). *An intracrine view of angiogenesis*. Bioessays 28(9):943-53.

Registro_SEF. (2010). *Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2.008*. from https://www.registrosef.com/public/docs/sef2008_FIV.pdf.

- Registro_SEF. (2013). *Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2.011.* from https://www.registrosef.com/public/docs/sef2011_IAFIV.pdf.
- Reindollar RH, Regan MM, Neumann PJ, Levine BS, Thornton KL, Alper MM, Goldman MB (2010). *A randomized clinical trial to evaluate optimal treatment for unexplained infertility: the fast track and standard treatment (FASTT) trial.* *Fertility and Sterility* 94(3):888-99.
- Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A (2007). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Estudio de la mujer estéril.* McGraw-Hill (3a).
- Remohí J, Bellver J, Matorras R, Ballesteros A, Pellicer A (2012). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana.* Madrid. Editorial Médica Panamericana (4a).
- Requena A, Pellicer A, Bellver J (2009). Síndrome de Ovarios Poliquísticos (SOP): definición, alteraciones hormonales y metabólicas. *Guía de Protocolos en Reproducción Humana.* J. Remohí, J. Bellver, A. Requena and A. Pellicer, *Momento Médico Iberoamericana*:79-82.
- Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF (1987). *Follicular depletion during the menopausal transition - evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion.* *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 65(6):1231-7.
- Riemann D, Kehlen A, Langner J (1999). *CD13 - not just a marker in leukemia typing.* *Immunology Today* 20(2):83-8.
- Roca M (2013). Aspectos psicológicos a tener en cuenta en pacientes con múltiples fallos de implantación. *Fallo de implantación en reproducción asistida.* R. Herrer, A. Mercader and F. del Río. Madrid, Editorial Médica Panamericana:75-83.
- Rodríguez-Gálvez I, Carranza F, Caligara C, Ramos J, Fernández M, Pellicer A, Remohí J (2007). Diagnóstico y tratamiento del síndrome de ovarios poliquísticos. *Manual práctico de esterilidad en reproducción humana.* J. Remohí, J. Bellver, J. Domingo, E. Bosch and A. Pellicer, McGraw-Hill. 49-60.
- Rodriguez KF, Farin CE (2004). *Gene transcription and regulation of oocyte maturation.* *Reproduction Fertility and Development* 16(1-2):55-67.
- Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y (1996). *Human placental leucine aminopeptidase oxytocinase: a new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family.* *Journal of Biological Chemistry* 271(1):56-61.

- Roméu C, Urries A, Lierta M, Sánchez-Rubio J, Duque JA, Sanz B, Pérez I, Casis L (2009). *Niveles de actividad de los sistemas de control encefalínérgico en líquido folicular de mujeres fértiles de diferentes edades*. Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción 14(2):158.
- Roméu C, Urries A, Lierta M, Sánchez-Rubio J, Duque JA, Sanz B, Pérez I, Casis L (2010). *Metabolismo de los derivados de la proopiomelanocortina en el líquido folicular de pacientes infértiles*. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana 27:257.
- Roméu C, Urries A, Lierta M, Rubio JS, Sanz B, Pérez I, Casis L (2011). *Aminopeptidase activity in human follicular fluid*. Human Reproduction 26:I226-17.
- Roméu C, Lierta M, Chueca A, Sobreviela M, Urries A, Sanz B, Pérez I, Casis L (2012). *Variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular según la edad de la mujer*. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana 29:150-1.
- Roméu C, Lierta M, Chueca A, de Bonrostro C, Giménez I, Sobreviela M, Urries A, Urizar I, Estomba H, Casis L (2013). *Variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular de mujeres patológicas*. Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción 18(2):192.
- Roméu C, Lierta M, Chueca A, de Bonrostro C, Giménez I, Urries A, Pérez I, Casis L (2014). *Metabolismo peptídico en el líquido folicular: correlación clínica*. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. Pendiente de publicación.
- Roth Z, Hansen PJ (2005). *Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation*. Reproduction 129(2):235-44.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J (2007). *The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappa B pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases*. Trends in Cardiovascular Medicine 17(1):19-25.
- Ruiz A, De los Santos MJ, Vidal C, Remohi J, Pellicer A (2003). *The impact of assisted reproduction in the definition and incidence of unexplained infertility*. Fertility and Sterility 80:S126-S.
- Russell DL, Robker RL (2007). *Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex*. Human Reproduction Update 13(3):289-312.



- Sadler TW (2009). *Langman: Embriología Médica*. Madrid. Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer.
- Sakharkar AJ, Singru PS, Mazumdar M, Subhedar N (2006). *Reproduction phase-related expression of beta-endorphin-like immunoreactivity in the nucleus lateralis tuberis of the female indian major carp Cirrhinus mrigala: Correlation with the luteinising hormone cells-ovary axis*. *Journal of Neuroendocrinology* 18(5):319-29.
- Salerno A, Di Iorio L, Nazzaro A (2011). *A proteomic analysis of human follicular fluid in women undergoing IVF cycles*. *Fertility and Sterility* 96(3):S193-S.
- Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S, Arici A (2006). *Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis*. *The Cochrane database of systematic reviews*(1):CD004635-CD.
- Sánchez E, Sánchez V, García-Velasco JA, Remohí J (2009). *Endometriosis. Guía de Protocolos en Reproducción Humana*. J. Remohí, J. Bellver, A. Requena and A. Pellicer, Momento Médico Iberoamericana:141-6.
- Sanderink GJ, Artur Y, Siest G (1988). *Human aminopeptidases: a review of the literature*. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 26(12):795-807.
- Sanders SL, Melner MH, Curry TE (1990). *Cellular localization of ovarian proopiomelanocortin messenger RNA during follicular and luteal development in the rat*. *Molecular Endocrinology* 4(9):1311-9.
- Sarkar DK, Yen SSC (1985). *Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous-cycle and after ovariectomy in rats*. *Endocrinology* 116(5):2075- 9.
- Sastry BVR, Janson VE, Owens LK, Tayeb OS (1982). *Enkephalin-like and substance P-like immunoreactivities of mammalian sperm and accessory sex glands*. *Biochemical Pharmacology* 31(21):3519-22.
- Sawyer CH (1955). *Rhinencephalic involvement in pituitary activation by intraventricular histamine in the rabbit under Bembutal anesthesia*. *American Journal of Physiology* 180(1):37-46.
- Sciorsci RL, Bianchi P, Minoia P (2000). *High levels of endorphin and related pathologies of veterinary concern. A review*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 22(4):575- 626.
- Scott RT, Hodgen GD (1990). *The ovarian follicle - life cycle of a pelvic clock*. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 33(3):551-62.

- Schlingemann RO, Oosterwijk E, Wesseling P, Rietveld FJR, Ruiter DJ (1996). *Aminopeptidase A is a constituent of activated pericytes in angiogenesis*. Journal of Pathology 179(4):436-42.
- Schmitmeier S, Thole H, Bader A, Bauer K (2002). *Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin*. European Journal of Biochemistry 269(4):1278-86.
- Schwartz JC (1983). *Metabolism of enkephalins and the inactivating neuropeptidase concept*. Trends in Neurosciences 6(2):45-8.
- Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW (2006). *Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF*. Human Reproduction 21(11):2960-8.
- Seliger E, Blumenauer V, Heins J, Neubert K, Kaltwasser P, Schoneich C, Bergleiter R (1988). *Determination of dipeptidyl peptidase IV in human follicular fluid: a preliminary report*. Zentralblatt Fur Gynakologie 110(20):1312-4.
- Sentandreu MA, Toldra F (2007). *Oligopeptides hydrolysed by muscle dipeptidyl peptidases can generate angiotensin-I converting enzyme inhibitory dipeptides*. European Food Research and Technology 224(6):785-90.
- Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferman N (1973). *Proteins of human follicular fluid - blood - follicle barrier*. Fertility and Sterility 24(6):429-34.
- Sharara FI (2009). *Reply: Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves outcome in IVF*. Human Reproduction 24(3):756-.
- Sharp B, Pekary AE (1981). *β -endorphin-61-91 and other β -endorphin-immunoreactive peptides in human semen*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 52(3):586-8.
- Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA (2002). *Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling*. Endocrine Reviews 23(5):647-64.
- Silveira PF, Irazusta J, Gil J, Agirregoitia N, Casis L (2001). *Interactions among challenges of hydromineral balance, angiotensin-converting enzyme, and cystine aminopeptidase*. Peptides 22(12):2137-44.
- Silverthorn DU, Johnson BR (2008). *Fisiología humana: un enfoque integrado*. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.
- Singh J, Naran A, Misso NL, Rigby PJ, Thompson PJ, Bhoola KD (2008). *Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma*. International Immunopharmacology 8(2):300-6.

- Singh N, Bahadur A, Malhotra N, Kalaivani M, Mittal S (2013). *Prospective analysis of ovarian reserve markers as determinant in response to controlled ovarian stimulation in women undergoing IVF cycles in low resource setting in India.* Archives of Gynecology and Obstetrics 288(3):697-703.
- Sinosich M (1987). Human ovarian follicular antigens. *Future aspects in vitro fertilization.* W. Feichtinger and P. Kemeter. Berlin, Springer Science+Business Media 64-92.
- Siristatidis C, Bhattacharya S (2007). *Unexplained infertility does it really exist? Does it matter?* Human Reproduction 22(8):2084-7.
- Sjoholm I, Yman L (1967). *Degradation of oxytocin, lysine-vasopressin, angiotensin II and agniotensin-II-amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase).* Acta Pharmaceutica Suecica 4(2):65-&.
- Sjostrom H, Noren O, Olsen J (2000). *Structure and function of aminopeptidase N.* Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2 477:25-34.
- Slomczynska M, Pierzchala-Koziec K, Gregoraszczyk E, Maderspach K, Wierzchos E (1997). *The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells.* Cytobios 92(370-71):195-202.
- Smith E, Anthony F, Masson G (1988). *Oocyte development as assessed by steroid hormone and prostaglandin concentrations in follicular fluid.* IV Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Barcelona. Abstr 221.
- Smitz J, Andersen AN, Devroey P, Arce JC (2007). *Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients.* Human Reproduction 22(3):676-87.
- Speroff L, Fritz MA (2006). *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad.* Madrid. Wolters Kluwer Health España.
- Stanger JD, Yovich JL (1985). *Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing-hormone levels during the follicular phase.* British Journal of Obstetrics and Gynaecology 92(4):385-93.
- Staszkievicz J, Skowronski MT, Kaminski T, Siawryns G, Krazinski BE, Kusmider M, Przala J, Okrasa S (2007). *Expression of proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin genes in porcine theca and granulosa cells.* Animal Reproduction Science 101(1-2):97- 112.
- Stein IP, Leventhal ML (1932). *Infertility and sterility - An analytic study of three hundred couples.* Journal of the American Medical Association 98:621-8.

- Steinberg ML, Boulet S, Kissin D, Warner L, Jamieson DJ (2013). *Elective single embryo transfer trends and predictors of a good perinatal outcome-United States, 1999 to 2010*. *Fertility and Sterility* 99(7):1937-43.
- Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2000). *Two new proteases in the MHC class I processing pathway*. *Nature Immunology* 1(5):413-8.
- Strandell A, Waldenstrom U, Nilsson L, Hamberger L (1994). *Hydrosalpinx reduces in vitro fertilization / embryo transfer pregnancy rates*. *Human Reproduction* 9(5):861-3.
- Strandell A, Lindhard A (2002). *Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid*. *Human Reproduction* 17(5):1141-5.
- Subirán N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J (2008). *Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility*. *Fertility and Sterility* 89:1571-7.
- Subirán N (2009). *Expresión y localización de la met-enkefalina y de las enzimas degradadoras de encefalinas en semen humano: implicación en la movilidad espermática*. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral.
- Subirán N, Casis L, Irazusta J (2011). *Regulation of Male Fertility by the Opioid System*. *Molecular Medicine* 17(7-8):846-53.
- Subirán N, Candenas L, Pinto FM, Cejudo-Roman A, Agirregoitia E, Irazusta J (2012). *Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide*. *Fertility and Sterility* 98(3):617-U382.
- Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H (1976). *Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177(1):196-200.
- Sumitani S, Ramlal T, Somwar R, Keller SR, Klip A (1997). *Insulin regulation and selective segregation with glucose transporter-4 of the membrane aminopeptidase vp165 in rat skeletal muscle cells*. *Endocrinology* 138(3):1029-34.
- Sumitomo M, Shen RQ, Nanus DM (2005). *Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1751(1):52-9.
- Sun QY, Schatten H (2006). *Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization*. *Reproduction* 131(2):193-205.

- Sundstrom P, Saldeen P (2009). *Cumulative delivery rate in an in vitro fertilization program with a single embryo transfer policy*. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 88(6):700-6.
- Suzuki Y, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, Tsujimoto M, Mizutani S (2003). *Possible role of placental leucine aminopeptidase in the anti-proliferative effect of oxytocin in human endometrial adenocarcinoma*. *Clinical Cancer Research* 9(4):1528-34.
- Szczepanska-Sadowska E (1996). *Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst*. *Regulatory Peptides* 66(1-2):65-71.
- Szeltner Z, Polgar L (2008). *Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase*. *Current Protein & Peptide Science* 9(1):96-107.
- Szewczuk A, Kwiatkow.J (1970). *Pyrrolidonyl peptidase in animal, plant and human tissues: occurrence and some properties of enzyme*. *European Journal of Biochemistry* 15(1):92-6.
- Tachibana T, Fujiwara H, Suginami H, Nakamura K, Honda T, Yamada S, Maeda M, Mori T (1996). *An aminopeptidase inhibitor, bestatin, enhances progesterone and oestradiol secretion by porcine granulosa cells stimulated with follicle stimulating hormone in vitro*. *Human Reproduction* 11(3):497-502.
- Tam PPL, Ng TB, Mao KR (1988). *Beta endorphin levels in the preovulatory follicles and the outcome of in vitro fertilization*. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 5(2):91-5.
- Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, Tsujimoto M (2003). *Human leukocyte derived arginine aminopeptidase: the third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases*. *Journal of Biological Chemistry* 278(34):32275-83.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003). *Mechanisms of disease: the chromogranin-secretogranin family*. *New England Journal of Medicine* 348(12):1134-49.
- Taylor A (1993). *Aminopeptidases - towards a mechanism of action*. *Trends in Biochemical Sciences* 18(5):167-72.
- Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y (2000). *Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability*. *Human Reproduction* 15(12):2471-7.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M (1987). *Mammalian oocyte maturation*. *Reproduction Nutrition Development* 27(5):865-96.



- Thompson MW, Tobler A, Fontana A, Hersh LB (1999). *Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258(2):234-40.
- Thorek DLJ, Evans MJ, Carlsson SV, Ulmert D, Lilja H (2013). *Prostate-specific kallikrein- related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. Established relevance and emerging roles*. *Thrombosis and haemostasis* 110(3):484-92.
- Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, Bergh C (2004). *Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization*. *New England Journal of Medicine* 351(23):2392-402.
- Tiruppathi C, Ganapathy V, Leibach FH (1990). *Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles. Studies in a novel rat strain with a genetic absence of dipeptidyl peptidase IV*. *Journal of Biological Chemistry* 265(4):2048-53.
- Tobler AR, Constam DB, SchmittGraff A, Malipiero U, Schlapbach R, Fontana A (1997). *Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons*. *Journal of Neurochemistry* 68(3):889-97.
- Tomar AK, Saraswat M, Chhikara N, Kumar S, Yadav VK, Sooch BS, Singh TP, Yadav S (2010). *Differential proteomics of sperm: insights, challenges and future prospects*. *Biomarkers in Medicine* 4(6):905-10.
- Tsafiriri A, Dekel N, Narami S (1982). *The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation*. *Journal of Reproduction and Fertility* 64(2):541-51.
- Tsafiriri A, Pomerantz SH (1986). *Oocyte maturation inhibitor*. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 15(1):157-70.
- Tsuji E, Misumi Y, Fujiwara T, Takami N, Ogata S, Ikehara Y (1992). *An active-site mutation (Gly(633) → Arg) of dipeptidyl peptidase-IV causes its retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum*. *Biochemistry* 31(47):11921-7.
- Turner AJ (1986). *Processing and metabolism of neuropeptides*. *Essays in Biochemistry* 22:69- 119.
- Turner AJ (1987). *Metabolism of enkephalins*. *Isi Atlas of Science-Pharmacology* 1(1):74-7.
- Turner AJ, Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF (2004). *Membrane alanyl aminopeptidase*. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.

- Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, Mugica J, Ochoa C, Casis L (2004). *Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia*. *Regulatory Peptides* 122(2):79-84.
- Van Blerkom J, Caltrider K (2013). *Sperm attachment and penetration competence in the human oocyte: a possible aetiology of fertilization failure involving the organization of oolemmal lipid raft microdomains influenced by the Delta Psi m of subplasmalemmal mitochondria*. *Reproductive Biomedicine Online* 27(6):690-701.
- Vanhaper T (1969). *Aminoacyl and dipeptidyl arylamidases (aminopeptidases) of pituitary gland as related to function*. *Endocrinology* 85(6):1062-&.
- Varona A, Blanco L, Lopez JI, Gil J, Agirregoitia E, Irazusta J, Larrinaga G (2007). *Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292(2):F780-F8.
- Vazeux G, Wang JY, Corvol P, LlorensCortes C (1996). *Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A*. *Journal of Biological Chemistry* 271(15):9069-74.
- Vidal C, Giles J, Pellicer A, Remohí J (2009). *Esterilidad de Origen Desconocido. Guía de Protocolos en Reproducción Humana*. J. Remohí, J. Bellver, A. Requena and A. Pellicer, *Momento Médico Iberoamericana*:147-51.
- Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, Djahanbakhch O (1997). *Tissue renin-angiotensin systems and reproduction*. *Human Reproduction* 12(4):651-62.
- Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerényi TD (1971). *Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme*. *Science (New York, N.Y.)* 173(3999):827-9.
- Wang H, Bocca S, Anderson S, Yu L, Rhavi BS, Horcajadas J, Oehninger S (2013). *Sex Steroids Regulate Epithelial-Stromal Cell Cross Talk and Trophoblast Attachment Invasion in a Three-Dimensional Human Endometrial Culture System*. *Tissue Engineering Part C-Methods* 19(9):676-87.
- Wang JY, Walker H, Lin Q, Jenkins N, Copeland NG, Watanabe T, Burrows PD, Cooper MD (1996). *The mouse BP-1 gene: Structure, chromosomal localization, and regulation of expression by type I interferons and interleukin-7*. *Genomics* 33(2):167-76.
- Wang J, Cooper MD, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004). *Aminopeptidase A. Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.

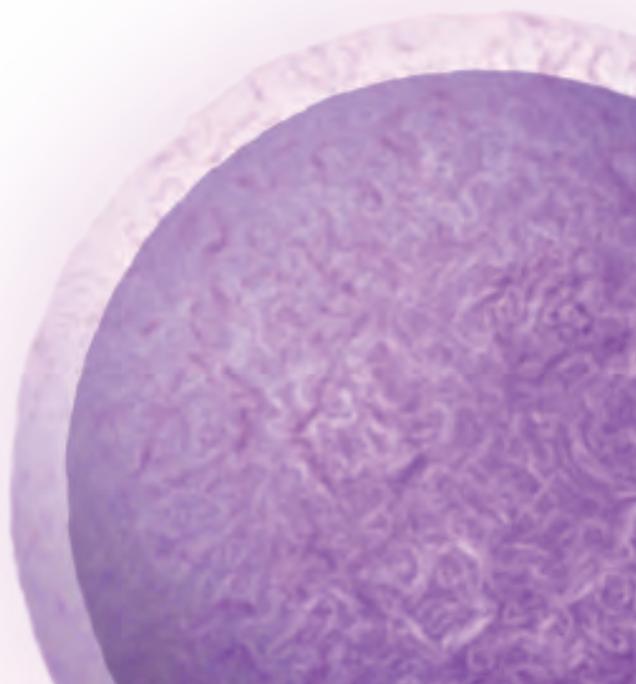


- Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilk S (1990). *Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M*. *Biochemical Pharmacology* 40(8):1725-32.
- Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM (1991). *Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin*. *Journal of Hypertension* 9(7):631-8.
- Wiedeman PE, Trevillyan JM (2003). *Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes*. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 4(4):412-20.
- Wilcox CS, Williams CM, Smith TB, Frederickson ED, Wingo C, Bucci CM (1988). *Diagnostic uses of angiotensin-converting enzyme-inhibitors in renovascular hypertension*. *American Journal of Hypertension* 1(4):S344-S9.
- Wilk S, Thurston LS (1990). *Inhibition of angiotensin III formation by thiol derivatives of acidic amino acids*. *Neuropeptides* 16(3):163-8.
- Wilk S, Wilk E, Magnusson RP (1998). *Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase*. *Journal of Biological Chemistry* 273(26):15961-70.
- Wilk S, Wilk E, Magnusson RP (2002). *Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407(2):176-83.
- Wilk S, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (2004). *Aspartyl aminopeptidase*. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press.1.
- Woolley CS, McEwen BS (1992). *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous-cycle in the adult-rat*. *Journal of Neuroscience* 12(7):2549-54.
- Wransby H, Kullander S, Liedholm P, Rannevik G, Sundstrom P, Thorell J (1981). *The success rate of in vitro fertilization of human oocytes in relation to the concentrations of different hormones in follicular fluid and peripheral plasma*. *Fertility and Sterility* 36(4):448-54.
- Yetunde I, Vasiliki M (2013). *Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome*. *Minerva ginecologica* 65(5):487-96.
- Yilmaz N, Engin-Ustun Y, Inal H, Gorkem U, Bardakci Y, Gulerman C (2013). *The impact of single embryo transfer policy on pregnancy outcomes after legislative change*. *Gynecological Endocrinology* 29(6):600-2.

- Yoshimoto T, Fischl M, Orlowski RC, Walter R (1978). *Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase: comparison of two peptidases with high specificity for proline residues*. *Journal of Biological Chemistry* 253(10):3708-16.
- Yoshioka S, Fujiwara H, Yamada S, Nakayama T, Higuchi T, Inoue T, Mori T, Maeda M (1998). *Membrane-bound carboxypeptidase-M is expressed on human ovarian follicles and corpora lutea of menstrual cycle and early pregnancy*. *Molecular human reproduction* 4(7):709-17.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S, Icmart WHO (2009). *The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009*. *Human Reproduction* 24(11):2683-7.
- Zhong Y, Li J, Wu H, Ying Y, Liu Y, Zhou C, Xu Y, Shen X, Qi Q (2012). *Surgical treatment for hydrosalpinx increases the expression of integrin alpha v beta 3 in the endometrium during the implantation window*. *Experimental and Therapeutic Medicine* 4(3):415-8.
- Zhu YX, Pintar JE (1998a). *Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta*. *Biology of Reproduction* 59(4):925-32.
- Zhu YX, Hsu MS, Pintar JE (1998b). *Developmental expression of the mu, kappa, and delta opioid receptor mRNAs in mouse*. *Journal of Neuroscience* 18(7):2538-49.
- Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, Andersen AN (2001). *Embryo quality and developmental potential is compromised by age*. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* 80(2):169-74.
- Zini S, FournieZaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, LlorensCortes C (1996). *Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21):11968-73.



VIII. ANEXOS



1. ANEXO: FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

DD/MM/AAAA - ZARAGOZA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA DEL LÍQUIDO FOLICULAR Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD

NÚMERO DE HISTORIA: /

El propósito de este Consentimiento Informado es el de aportar una clara explicación de la naturaleza de dicho estudio, además de dejar claro que su realización no conlleva la aplicación de ninguna técnica distinta a las utilizadas de forma habitual en un procedimiento como el que le vamos a realizar.

El presente ensayo clínico se realiza en colaboración con el Departamento de Fisiología de la Universidad del País Vasco. El **objetivo** de este estudio es el análisis de la bioquímica del líquido folicular obtenido tras la captación ovocitaria, con la finalidad de determinar la calidad del óvulo que se encuentra en dicho líquido, para de esta forma, mejorar los conocimientos actuales sobre la fisiología del ovocito y en un futuro contribuir a una mejora en los porcentajes de embarazo.

Señalar que la **participación** en este proyecto es estrictamente **voluntaria**. Sólo se accederá a la parte de la historia clínica cuyos datos sean relevantes para el estudio. La información que se recoja será **confidencial** y no se utilizará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Las muestras obtenidas serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas. Una vez analizadas, se procederá a su destrucción total. Todo ello en base al cumplimiento de lo establecido en la legislación vigente: Ley 29/2006, de garantías y uso racional de medicamento y productos sanitarios, y Real Decreto 561/93 - Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos y R.D. 994/99.

Desde ya le agradecemos su participación.

Una vez leído y comprendido lo anterior quedamos informados de:

- El objetivo del estudio.
- Sus futuros beneficios.
- La confidencialidad de los datos obtenidos.
- El carácter voluntario de la participación.
- La inclusión en este ensayo no conlleva compensación económica ni coste añadido.

Y, en su consecuencia,

CONSENTIMOS libre, expresa y voluntariamente al personal de la Unidad de Reproducción de Quirón Zaragoza a utilizar el líquido folicular obtenido tras la captación para su posterior análisis bioquímico y su final destrucción.

Ensayo Clínico aprobado por el Comité de Ética de Grupo Hospitalario Quirón Zaragoza.

Dña.	D.	Dr./Dra.
D.N.I	D.N.I	Nº Colegiado
Fdo.	Fdo.	Fdo.

Reproducción Asistida Quirón Zaragoza
rasistida.zar@quiron.es
Centro Acreditado.Código Id. 5001291

2. ANEXO: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS NUEVE PEPTIDASAS ANALIZADAS

Tabla 1. Actividad de las peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Control.

La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. G1 (n=10), G2 (n=12), G3 (n=16), G4 (n=18) y G5 (n=16).

ENZIMAS	GRUPO CONTROL (G.C.)				
	G1	G2	G3	G4	G5
APN	271,24 \pm 44,57	270,86 \pm 51,92	266,87 \pm 46,88	261,01 \pm 46,11	315,78 \pm 106,18
PSA	227,63 \pm 43,9	258,50 \pm 77,90	272,57 \pm 70,73	274,17 \pm 85,83	333,48 \pm 80,09
APB	101,76 \pm 31,21	90,19 \pm 23,84	97,19 \pm 29,21	93,75 \pm 19,52	120,37 \pm 37,47
DPPIV	100,30 \pm 17,00	93,00 \pm 29,66	98,32 \pm 24,17	91,37 \pm 15,63	95,39 \pm 31,33
APA	49,14 \pm 26,22	41,34 \pm 25,93	37,88 \pm 10,02	32,89 \pm 6,03	37,31 \pm 19,72
Cys-AP	33,79 \pm 3,94	30,86 \pm 7,25	29,01 \pm 7,31	28,64 \pm 5,51	33,02 \pm 10,70
PEP	15,14 \pm 5,34	15,98 \pm 5,17	13,17 \pm 4,74	17,34 \pm 7,84	16,40 \pm 6,09
Asp-AP	15,94 \pm 5,48	16,11 \pm 3,96	15,13 \pm 3,65	15,57 \pm 2,37	13,34 \pm 2,70
PGI	13,43 \pm 3,03	14,91 \pm 3,18	13,33 \pm 4,64	13,46 \pm 1,99	13,63 \pm 3,67

Tabla 2. Actividad de las peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Fértil: embarazo vs. no embarazo. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. Embarazo (n=18), No embarazo (n=7).

ENZIMAS	GRUPO FÉRTIL (FERT)	
	Embarazo	No embarazo
APN	268,43 \pm 45,76	285,57 \pm 35,83
PSA	229,36 \pm 48,43	310,25 \pm 72,46
APB	94,65 \pm 28,34	98,83 \pm 26,16
DPPIV	94,14 \pm 18,76	112,41 \pm 25,05
APA	45,69 \pm 20,10	32,08 \pm 5,24
Cys-AP	31,75 \pm 6,04	30,96 \pm 7,67
PEP	14,68 \pm 5,13	13,93 \pm 5,10
Asp-AP	16,13 \pm 4,97	15,39 \pm 2,74
PGI	13,11 \pm 4,02	15,42 \pm 4,03

Tabla 3. Actividad de las peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al Grupo Fértil e Infértil. La actividad enzimática está expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/ min) por L de muestra. Se representa la media \pm ES. FERT (n=38), SOP (n=8), END (n=10), FT (n=15) y ESCA (n=12).

ENZIMAS	FERT	GRUPO INFÉRIL (G.C.)			
		SOP	END	FT	ESCA
APN	269,28 \pm 46,69	282,11 \pm 42,07	259,06 \pm 47,39	237,51 \pm 47,89	301,06 \pm 65,77
PSA	256,30 \pm 68,11	325,56 \pm 89,72	330,86 \pm 125,30	217,33 \pm 57,55	274,36 \pm 76,13
APB	96,18 \pm 27,79	143,76 \pm 53,01	136,48 \pm 64,77	84,27 \pm 12,68	105,40 \pm 24,70
DPPIV	97,16 \pm 24,03	106,24 \pm 19,43	95,60 \pm 19,47	88,92 \pm 18,58	90,58 \pm 23,71
APA	41,94 \pm 20,71	31,22 \pm 6,50	34,70 \pm 13,46	41,62 \pm 17,37	45,67 \pm 21,40
Cys-AP	30,85 \pm 6,68	32,89 \pm 4,66	29,68 \pm 7,16	29,73 \pm 7,52	33,47 \pm 6,87
PEP	14,58 \pm 5,06	15,64 \pm 5,82	13,58 \pm 4,92	15,21 \pm 6,31	16,35 \pm 4,61
Asp-AP	15,65 \pm 4,20	17,13 \pm 3,43	14,64 \pm 4,09	15,20 \pm 2,86	15,74 \pm 3,30
PGI	13,86 \pm 3,81	13,98 \pm 5,07	12,57 \pm 4,82	13,99 \pm 3,47	14,35 \pm 3,83

3. ANEXO

Comunicaciones indexadas

Múgica J, **Roméu C**, Urries A, Sanz B, Pérez I, Casis L (2009). *Metabolismo peptídico en líquido folicular*. Revista del Laboratorio Clínico 2:46.

Roméu C, Urries A, Lierta M, Sánchez-Rubio J, Duque JA, Sanz B, Pérez I, Casis L (2009). *Niveles de actividad de los sistemas de control encefalínérgico en líquido folicular de mujeres fértiles de diferentes edades*. Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción 14(2):158.

Roméu C, Urries A, Lierta M, Sánchez-Rubio J, Duque JA, Sanz B, Pérez I, Casis L (2010). *Metabolismo de los derivados de la proopiomelanocortina en el líquido folicular de pacientes infértiles*. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana 27:257.

Roméu C, Urries A, Lierta M, Rubio JS, Sanz B, Pérez I, Casis L (2011). *Amino-peptidase activity in human follicular fluid*. Human Reproduction 26:1226-17.

Roméu C, Lierta M, Chueca A, Sobreviela M, Urries A, Sanz B, Pérez I, Casis L (2012). *Variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular según la edad de la mujer*. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana 29:150-1.

Roméu C, Lierta M, Chueca A, de Bonrostro C, Giménez I, Sobreviela M, Urries A, Urizar I, Estomba H, Casis L (2013). *Variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular de mujeres patológicas*. Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción 18(2):192.

Roméu C, Lierta M, Chueca A, de Bonrostro C, Giménez I, Urries A, Pérez I, Casis L (2014). *Metabolismo peptídico en el líquido folicular: correlación clínica*. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. Pendiente de publicación.

Participaciones en congresos

3^{er} Congreso Nacional del Laboratorio Clínico

Valencia, 14-16 octubre 2009

5^o Congreso Nacional de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

Valencia, 25-27 noviembre 2009

28^o Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad

Valencia, 19-21 mayo 2010

27th Annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology

Estocolmo (Suecia), 3-6 julio 2011

29^o Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad

Granada, 16-18 mayo 2012

7^o Congreso Nacional de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

Sevilla, 20-22 noviembre 2013

30^o Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad

Barcelona, 29-31 mayo 2014



En nuestro país existe más de un 15% de parejas en edad reproductiva que padece problemas de fertilidad, el desarrollo y avance de los tratamientos de reproducción asistida está ayudando a que dichas parejas alcancen su sueño de ser padres. Actualmente, los indicadores pronósticos del éxito de un ciclo de fecundación in vitro son limitados. Por ello, se están estudiando nuevos parámetros predictivos tales como el metabolismo folicular o embrionario.

En el caso que nos ocupa y con el objetivo de encontrar un indicador fiable, nos centraremos en el estudio de la actividad de determinadas peptidasas como marcadores del metabolismo peptídico folicular. Así, a lo largo de esta Memoria se intentará ahondar en aspectos tan importantes como la gametogénesis femenina, los problemas de fertilidad y las técnicas de reproducción asistida. El análisis de la actividad enzimática de las peptidasas se ha llevado a cabo en líquidos foliculares procedentes tanto de mujeres fértiles como infértiles, obteniéndose resultados que podrían ser de utilidad clínica.

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea