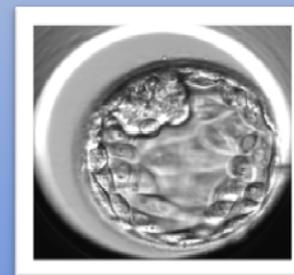
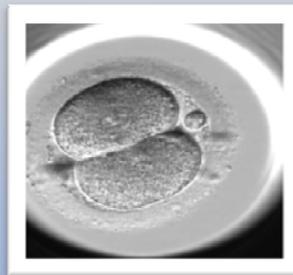
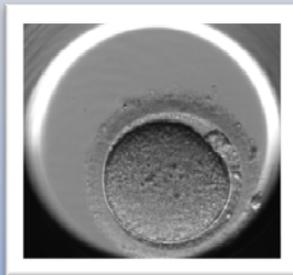


-TESIS DOCTORAL-

**ESTUDIO DEL METABOLISMO PEPTÍDICO
FOLICULAR Y SU RELACIÓN CON LA
FERTILIDAD**



**M^a VICTORIA RODRÍGUEZ GALLEGO
LEIOA, 2018**

***Dirigido por los Doctores:
Luis Casis Sáenz
Juana Hernández Hernández***



Facultad de Medicina y Enfermería
Departamento de Fisiología

Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea
Fisiologia Saita

TESIS DOCTORAL
ESTUDIO DEL METABOLISMO PEPTÍDICO
FOLICULAR Y SU RELACIÓN CON LA
FERTILIDAD

MEMORIA PRESENTADA POR:
M^a VICTORIA RODRÍGUEZ GALLEGO

DIRIGIDA POR LOS DOCTORES:
LUIS CASIS SÁENZ
JUANA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi director el Dr. Luis Casis, que aparte de ser un gran profesor, se ha convertido en un gran amigo. Su ayuda incondicional y su amistad han hecho que este proyecto fuera posible, a pesar de momentos de cansancio y dificultad. Gracias por apoyarme en todo momento y por enseñarme tanto. Y cómo no, agradecer al Dr. Asier Valdivia, a la Dra. Begoña Sanz y a la técnico de laboratorio Arantxa Pérez, sin cuya ayuda no hubiera podido llevar a cabo las pruebas técnicas. Al Dr. Enrique Ramalle, por hacer que la estadística no fuera algo tedioso, por hacerme entenderla cómo nunca, gracias por tu tiempo y tu paciencia.

Mi agradecimiento hacia mi codirectora Juana Hernández, va más allá de prestarse para que esta Tesis pudiera llevarse a cabo. Estos años trabajando junto a ella me han enseñado muchísimo, siempre será un ejemplo de mujer luchadora, estudiosa, trabajadora sin igual y excelente persona para mí. Mi amor hacia el mundo de la reproducción ha sido en parte gracias a ti, me has contagiado tu pasión por esta profesión.

También quiero agradecer a Javier Arizaleta, porque a pesar de estar en tus últimos tiempos de prejubilación, me ayudaste con la recogida de muestras y os convertisteis tú y Juana en una familia para mí, aquí en Logroño, gracias por cuidarme tan bien.

A mis chicas de la clínica, Ainara, Rosa, Gemma y Andrea, por su apoyo y ayuda; y por vuestra paciencia.

A mis amigas, Mari Carmen y Cristina, por animarme a llevar adelante este proyecto, por sus consejos, y por esos cafés que tanto echo de menos.

Mi familia siempre ha sido muy importante para mí, a pesar de llevar años lejos de casa, siempre los he tenido apoyándome en los buenos y en los malos momentos; gracias mamá por ser una luchadora y enseñarme a ser agradecida con la vida, gracias papá por educarme en el esfuerzo y trabajo; y en especial gracias a ti Laura por estar siempre ahí, empujándome a darme una vuelta de tuerca más, por animarme con este proyecto y ponerme las pilas cuándo me relajaba en exceso.

A Julio Morales, le debo mucho también, lo conozco desde que soy residente, siempre me ha apoyado en todo y se ha convertido en un gran amigo; también gracias a él conocí a Luis y pude escribir esta Tesis.

Y por último, por supuesto, gracias a mi compañero de vida, gracias Mario. Por compartir conmigo tu vida, por ser paciente y comprensivo, pero sobre todo por confiar y creer siempre en mí. Gracias por tu amor incondicional.

**"El futuro pertenece a quienes
creen en la belleza de sus sueños"**

E. Roosevelt

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE ó ECA – Enzima convertidora
angiotensina

ANOVA – Análisis de la varianza

AMH – Hormona antimulleriana

AMP - Adenosin monofosfato

APC - Células presentadoras de
antígenos

ASRM – Sociedad Americana de
Medicina Reproductiva

β -hCG - Subunidad beta de la
hormona gonadotropina coriónica
humana

DTT - Ditiotreitól

EC – Comisión enzimática

EDTA - Ácido

etilendiaminotetraacético

EFG – Factor de crecimiento
epidérmico

EOD ó ESCA – Esterilidad de
origen desconocido o sin causa
aparente

EST ó SET – Transferencia
selectiva de embrión único

ESHRE – Sociedad Europea de
Reproducción Humana y

Embriología

FIV – Fecundación in vitro

FNT-alfa – Factor de necrosis
tumoral alfa

FSH - Hormona foliculoestimulante

FSHr – Hormona foliculoestimulante
recombinante

GnRH – Hormona liberadora de
gonadotropinas

hCG - Gonadotropina coriónica
humana

HTA – Hipertensión arterial

IA – Inseminación intrauterina

IAC – Inseminación intrauterina de
cónyuge

ICSI – Inyección intracitoplasmática

IUI – Inseminación intrauterina

IL-1, IL-6 e IL-8 - Interleuquinas

LF - Líquido folicular

LH - Hormona luteinizante

LI - Inhibidor de la luteinización

MHC - Complejo mayor de
histocompatibilidad OMI - Inhibidor
de la maduración del ovocito

NC-IUBMB - Comité Nacional-Unión
Internacional de Biología Molecular

NICE – Instituto Nacional Salud del
Reino Unido

OMS – Organización Mundial de la
Salud

REM – Recuento de
espermatozoides móviles

RFA – Recuento de folículos
antrales

RN – Recién nacido

SEF - Sociedad Española de
Fertilidad

SHO – Síndrome de
hiperestimulación ovárica

SOP ó PCOS – Síndrome de ovario
poliquístico

SRA – Sistema renina-angiotensina

TRA – Técnica de reproducción
asistida

UP – Unidad actividad peptidasa

VEGF – Factor de crecimiento
endotelial vascular

VG - vesícula germ

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	7
1. APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	9
1.1.- ANATOMÍA	9
1.2.- GAMETOGÉNESIS FEMENINA.....	11
1.2.1.- LA OVOGÉNESIS	11
1.2.1.1 Ovario Fetal.....	11
1.2.1.2 Ovario Neonatal/Infancia	13
1.2.1.3 Ovario Adulto.....	13
1.2.2- LA FOLICULOGÉNESIS - ESTADÍO DE FORMACIÓN DEL FOLÍCULO	13
1.3. OVULACIÓN	16
2. ESTERILIDAD E INFERTILIDAD	17
2.1 DEFINICIÓN Y CAUSAS	17
2.1.1 ENDOMETRIOSIS	19
2.1.2. BAJA RESERVA OVÁRICA (FACTOR EDAD MATERNA)	20
2.1.3. OTRAS CAUSAS.....	21
2.2. ESTUDIO DE LA PAREJA EN REPRODUCCIÓN.....	24
2.3. TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	25
2.3.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA).....	25
2.3.2. FECUNDACIÓN IN VITRO E INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (FIV/ICSI) ..	26
2.3.3. FACTORES PRONÓSTICOS DEL ÉXITO DEL TRATAMIENTO	27
2.3.4. COMPLICACIONES EN TRA	28
2.3.4.1. Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO).....	28
2.3.4.2. Embarazo Múltiple.....	28
2.3.4.3. Embarazo Ectópico	29
2.3.4.4. Maternidad añosa.....	30
3. LAS PEPTIDASAS	31
3.1. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA	32
3.2.FUNCIÓN DE LAS PEPTIDASAS	33
3.3. LAS PEPTIDASAS EN LA FISIOLOGÍA Y EN LA PATOLOGÍA.....	36
3.4. PAPEL DE LAS PEPTIDASAS EN LA FERTILIDAD	38
3.4.1. REGULACIÓN DEL CICLO SEXUAL: MODELO DE LIBERACIÓN GONADOTRÓPICA	38
3.4.1.1 Sistemas de comunicación celular y fertilidad	41
3.4.2 FERTILIDAD MASCULINA	42
3.4.3 FERTILIDAD FEMENINA	43
3.5. PEPTIDASAS QUE ANALIZAREMOS EN ESTE TRABAJO	43
3.5.1. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS	46
APN (Aminopeptidasa neutra, CD13 – EC 3.4.11.2).....	46
PSA (Aminopeptidasa sensible a puromicina – EC 3.4.11.14)	49
APB (Aminopeptidasa B – EC 3.4.11.6).....	51
DPPIV (Dipeptidil Peptidasa IV – EC 3.4.14.5)	52
APA (Glutamil aminopeptidasa – EC 3.4.11.7)	54
Cys-AP (Cistil-aminopeptidasa – EC 3.4.11.3)	56
PEP (Prolil Endopeptidasa- Prolil Oligopeptidasa - EC 3.4.21.26)	57
Asp-AP (Aspartil aminopeptidasa – EC 3.4.11.21)	58
NEP (Endopeptidasa neutra - EC 3.4.24.11)	59
OBJETIVOS	61
MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. MATERIAL.....	69
1.1. APARATOS	69
1.2. SOLUCIONES:	70

1.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS.....	70
2. METODOLOGÍA	71
2.1 BASES DE DATOS.....	71
2.2. TIPO DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN	72
2.3 CONSENTIMIENTOS Y AUTORIZACIONES	73
2.3. GRUPOS DEL ESTUDIO	77
2.4. METODOLOGÍA DEL TRATAMIENTO DE FIV	77
2.5. MUESTRAS DE LÍQUIDO FOLICULAR.....	80
2.6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PEPTIDÁSICA EN LÍQUIDO FOLICULAR	81
2.6.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD	81
2.6.2. ENSAYO ENZIMÁTICO	81
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	85
RESULTADOS	87
1. RESULTADOS CLÍNICOS	89
1.1. VARIABLES DE LABORATORIO	89
1.2. VARIABLES DE ESTIMULACIÓN	93
2. RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES PEPTIDÁSICAS	95
2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF.....	96
2.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN PRESENCIA O NO DE OVOCITO.....	97
2.2.1. ACTIVIDAD PEP SEGÚN LA PRESENCIA O NO DE OVOCITO	98
2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES EXTRAÍDOS ...	99
2.3.1. ACTIVIDAD PEP EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES	101
2.3.2. ACTIVIDAD APA EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES.....	103
2.3.1. ACTIVIDAD Cys-AP EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES	105
2.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN LA EDAD DE LA PACIENTE	107
2.4.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PSA EN LF SEGÚN EDAD	108
2.4.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NEP EN LF SEGÚN EDAD.....	109
2.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO	110
2.5.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PSA SEGÚN PATOLOGÍA.....	111
2.5.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE APB SEGÚN PATOLOGÍA.	112
2.5.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ASP-AP SEGÚN PATOLOGÍA.	113
2.5.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NEP SEGÚN PATOLOGÍA.	114
2.5.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DPPIV SEGÚN PATOLOGÍA.	115
2.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN SI EL OVOCITO OBTENIDO CONSIGUIÓ O NO FECUNDARSE	116
2.6.1. ACTIVIDAD Cys-AP SEGÚN FECUNDACIÓN	118
2.7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF Y RESULTADO FIV (EMBARAZO)	119
2.7.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PSA Y RESULTADO DE FIV	120
2.7.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE APN Y RESULTADO DE FIV.....	121
DISCUSIÓN	123
1. SOBRE LOS RESULTADOS CLÍNICOS OBTENIDOS	125
VARIABLES DE LABORATORIO	126
VARIABLES DE ÉXITO EN TRA (FECUNDACIÓN Y GESTACIÓN).....	127
VARIABLES DE ESTIMULACIÓN	130
2. SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OBSERVADA.	131
3. SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OBSERVADA EN LOS DISTINTOS LIQUIDOS FOLICULARES EXTRAÍDOS.	143
4. SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN RELACIÓN CON LA EDAD DE LA MUJER.	147
5. SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN RELACIÓN CON LA PATOLOGÍA.	151
6. SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN RELACIÓN CON EL ÉXITO REPRODUCTIVO. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS.	154
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA.....	161

ANEXOS.....	193
ANEXO I.....	194
ANEXO II.....	195
ANEXO III.....	196
ANEXO IV.....	197
ANEXO V.....	198
ANEXO VI.....	199
ANEXO VII.....	199
CONTRIBUCIONES A CONGRESOS.....	200

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

1.1.- ANATOMÍA

La producción del óvulo pone en funcionamiento una serie de órganos sexuales que conforman el sistema reproductor femenino.

Los órganos sexuales se clasifican en externos e internos.

Los genitales externos están formados por la vulva, constituida por labios menores y mayores y clítoris; la separación de los labios permiten visualizar el vestíbulo y el meato uretra. En el vestíbulo encontramos conductos de varias glándulas (de Skene y de bartolino) y cómo separación con la vagina existe una membrana cutáneo-mucosa llamada himen.

Los genitales internos están constituidos por vagina, útero, ovarios y trompas de Falopio; relacionadas con el resto de vísceras de la pelvis menor.

La vagina es un conducto musculo-membranoso de unos 10-12 cm, situado entre vejiga y recto; sus funciones son múltiples, entre ellas ser el receptáculo del pene en la relación sexual, dónde se depositará el semen y se realizará la primera selección de espermatozoides. En el fondo de la vagina encontramos el cérvix uterino, cuyo canal interno produce secreciones que constituyen una barrera entre vagina y útero.

El útero es un órgano muscular hueco, compuesto por cuerpo y cuello uterino comunicado mediante un estrechamiento que constituye el istmo uterino. Su función principal es recibir al cigoto para su implantación y nutrición. El cuerpo uterino tiene forma aplanada y triangular, y en sus dos extremos laterales superiores se

abren las trompas de Falopio. Está formado por tres capas, el endometrio que es la capa mucosa interna, el miometrio que es la de músculo liso y el perimetrio o cubierta peritoneal. El endometrio experimenta cambios cíclicos, cuya finalidad es crear un ambiente adecuado para la posible implantación embrionaria, en caso contrario se producirá su descamación en el momento de la menstruación. El útero está fijado a la pelvis gracias a numerosas estructuras peritoneales, ligamentosas, fibrosas y fibroglandulares; por donde transcurren sus vasos, linfáticos y nervios.

Las Trompas de Falopio, que miden alrededor de 12 cm, comunican la cavidad uterina con la peritoneal; la dividimos en tres zonas, la intersticial que se introduce en los cuernos uterinos, la ístmica y la porción ampular que termina en las fimbrias, dónde se produce el contacto entre trompa y ovario. Estas estructuras son las encargadas de captar y transportar al ovocito desde el ovario al útero, además es dónde se produce la fecundación de éste.

El ovario es un órgano bilateral situados en las fosas ováricas, su polo superior está en contacto con la trompa, mientras que en su polo inferior se encuentra fijado al útero por el ligamento útero ovárico. El ovario consta de tres partes: corteza, médula y el hilio ovárico. Éste último contiene nervios, vasos y células hiliares. La porción más externa del ovario se denomina túnica albugínea; los ovocitos se encuentran en la parte interna de la corteza, incrustadas en el estroma, formado por tejido conjuntivo y células intersticiales, que son capaces de responder a la LH o hCG produciendo andrógenos. Son los encargados de producir los gametos femeninos y también la secreción de hormonas sexuales que se encargan del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, regulación del embarazo, cambios cíclicos del endometrio...

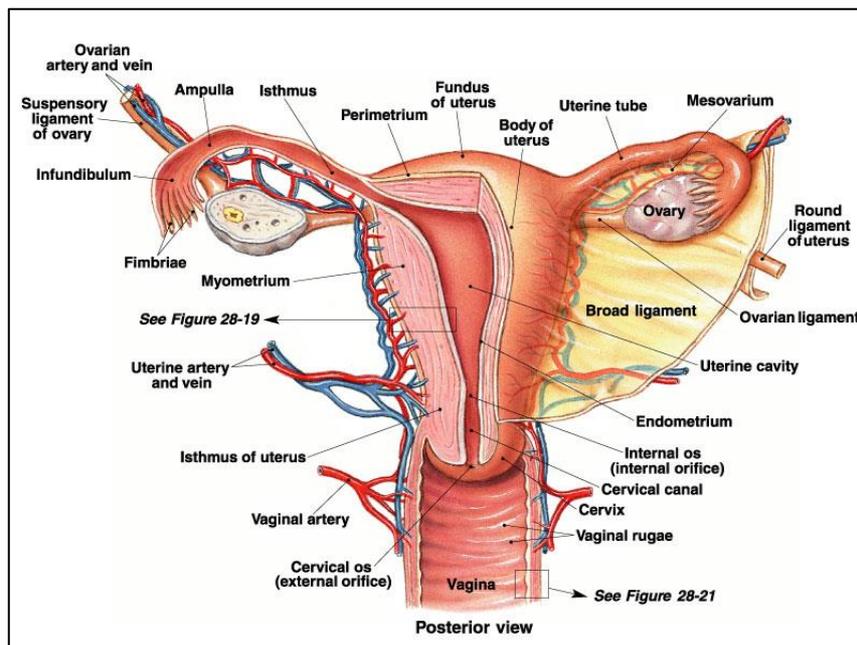


FIGURA 1. Aparato reproductor femenino. Image received from: <http://healthfavo.com/female-reproductive-system.html>

1.2.- GAMETOGÉNESIS FEMENINA

Es el proceso que sufren las células germinales hasta formarse un gameto femenino haploide, mediante meiosis, con sus cambios morfológicos y funcionales.

1.2.1.- LA OVOGÉNESIS

1.2.1.1 OVARIO FETAL

Durante la vida fetal el ovario pasará por diferentes fases de desarrollo:

ESTADÍO DE GÓNADA INDIFERENCIADA.

Las células germinativas migran del saco vitelino (que rodea el intestino posterior) a las gónadas entre la 4^a y 6^a semana de gestación; durante esta migración proliferan, multiplicándose por mitosis hasta un total de 10.000 células germinativas primordiales. Hacia la 6^a semana la gónada indiferenciada estará compuesta de

células germinativas y otras de apoyo, derivadas del epitelio celómico y del mesénquima de la cresta gonadal.

ESTADÍO DE DIFERENCIACIÓN

Si la gónada indiferenciada está destinada a convertirse en testículo sucederá alrededor de la 6^a-9^a semana; la falta de evolución es una prueba implícita de la existencia de un ovario primitivo, aunque por el momento inactivo. La diferenciación de los genitales externos e internos femeninos (a diferencia del varón) precede a la maduración gonadal.

ESTADÍO DE MULTIPLICACIÓN DE OVOGONIAS Y FORMACIÓN DEL OVOCITO

A partir de semana 6-8 se observa la rápida multiplicación mitótica de las células germinativas en el ovario, alcanzando los 6-7 millones de ovogonias entre la semana 16-20 de gestación (Baker, 1963; Gondos, Bhiraless y Hobel, 1971). A partir de este momento el número de ovogonias irá descendiendo hasta 50 años después agotar las reservas.

A partir de la semana 11-12 las ovogonias comienzan su transformación a ovocitos primarios, 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 diploteno, en un estadio especial, el de vesícula germinal (VG) (Arteaga y García, 2013). Durante la segunda mitad de la gestación se producirán una pérdida masiva de ovocitos, tanto por su regresión durante la miosis cómo por la degeneración de las ovogonias que no son envueltas por células de la granulosa.

1.2.1.2 OVARIO NEONATAL/INFANCIA

El contenido total de células germinativas al nacer es de 1-2 millones. Casi todos sus ovocitos están integrados en folículos primordiales. Las concentraciones de gonadotropinas son reducidas, aun así el ovario no permanece inactivo puesto que se observa con frecuencia folículos que crecen alcanzando el estadio antral. El proceso de atresia, junto con la contribución de restos foliculares al estroma se asocia al crecimiento progresivo de los ovarios.

1.2.1.3 OVARIO ADULTO

Al inicio de la pubertad la masa de células germinativas se ha reducido hasta 300.000-500.000; seleccionándose alrededor de 400-500 para la ovulación durante la edad adulta.

1.2.2- LA FOLICULOGÉNESIS - ESTADÍO DE FORMACIÓN DEL FOLÍCULO

A partir de las semanas 18-20 la corteza es perforada por canales vasculares, dividiendo la masa celular cortical en segmentos; las células perivasculares que arrastran los vasos sanguíneos rodean a los ovocitos formando una unidad que es el Folículo primordial (ovocito detenido en profase, envuelto por una capa de células fusiformes de pregranulosa y rodeada de membrana basal). Por lo que poco después del nacimiento todos los ovocitos estarán incluidos en folículos. Se cree que una sustancia llamada inhibidor de la maduración del ovocito (OMI) es secretada por las células de la granulosa que rodean al ovocito primario y conserva detenido su proceso meiótico (Channing *et al.*, 1980; Tsafiriri, Dekel y Bar-Ami, 1982; Tsafiriri y Pomerantz, 1986; Rabinovici y Jaffe, 1990; Scott y Hodgen, 1990).

La formación del folículo primario estará marcada por la

transformación de la capa pregranulosa a una capa cúbica de células de la granulosa, desconociéndose el factor desencadenante; de hecho, pueden existir varias vías de señalización responsables de este proceso (Bonilla-Musoles y Pellicer, 2008; Oktem y Urman, 2010). La proliferación de éstas células provocará un aumento del tamaño del folículo, originando un espacio entre ellas y el ovocito dónde se secretarán mucopolisacáridos que formarán la zona pelúcida (cubierta que rodea a los ovocitos). La capa de células de la granulosa más cercana a la zona pelúcida, llamada corona radiata, emitirán unas prolongaciones citoplasmáticas, manteniendo así contacto estrecho con el ovocito y haciendo llegar sustancias como el OMI.

Durante la primera fase del ciclo femenino, por la acción de la hormona foliculoestimulante, unos 20-25 folículos primarios se convertirán en folículos secundarios, aumentando el número de capas de células de la granulosa y la mayoría de ellos desarrollarán unas cavidades rellenas de líquido (cuerpos de Call Exner), que serán los precursores del líquido folicular (Bonilla-Musoles y Pellicer, 2008). Estas cavidades confluirán formando el antro folicular, característico del folículo antral. Durante este estadio diferenciamos las capas de tejido envolvente en teca externa (fibrosa e inervada) y la teca interna (servirá de apoyo nutricional mediante su vascularización para el desarrollo ovocitario y folicular).

En este momento comienza el fenómeno de dominancia folicular, de todos los folículos antrales uno comienza a despuntar, secretando sustancias que convierte al resto en subordinados y los impide crecer; y por otro lado los estrógenos e inhibina producidos por todos los folículos actuarán a nivel hipotálamo-hipofisario inhibiendo la síntesis de FSH. De esta forma únicamente el folículo

dominante será capaz de seguir creciendo, puesto que será el que posea más receptores para esta hormona (Moore y Persaud, 1999). El folículo dominante evolucionará hacia folículo de Graaf o pre-ovulatorio maduro y el resto se atresiarán.

Antes de producirse la ovulación, por el aumento de la hormona LH, el citoplasma de las células del cumulus oophorus se hincharán y se despolimerizará el ácido hialurónico del cemento intercelular, de esta forma el óvulo se liberará y nadará libremente por el líquido folicular o se encontrará tenuemente unido.

El líquido folicular (LF), base del presente estudio, está formado por sustancias procedentes de vasos localizados por fuera de la lámina basal, por productos de secreción de las propias células foliculares, produciendo todas ellas efectos a nivel ovocitario y en las células circundantes. Por lo que el LF representa un complejo compartimento funcional, en él se integran señales endocrinas, inmunológica y mitogénicas, haciendo que cada folículo sea único. El microambiente que presente cada folículo determinará si éste es seleccionado para ovular, transformándose en cuerpo lúteo o bien para entrar en atresia (Angelucci *et al.*, 2006; Harata *et al.*, 2006; Schweigert *et al.*, 2006).

En los últimos 50 años encontramos en el campo de la reproducción asistida múltiples estudios que pretenden establecer una relación entre composición de líquido folicular y resultados reproductivos (Shalgi *et al.*, 1973; Edwards, 1974; Lindner *et al.*, 1988; Molina, 1990; Gonzalès *et al.*, 1992; Moschos, Chan y Mantzoros, 2002; Smitz *et al.*, 2007; Estes *et al.*, 2009; Salerno, Di Iorio y Nazzaro, 2011; Roméu *et al.*, 2014, 2018a). Nuestro trabajo de investigación intenta analizar la actividad de enzimas de degradación de péptidos bioactivos en el líquido folicular humano,

intentado relacionarlo con su posible papel reproductivo.

1.3. OVULACIÓN

Cómo se ha explicado anteriormente, de todos los folículos que se preparan, sólo uno o excepcionalmente alguno más, llegará a fase de folículo maduro; el resto involucionarán en estadios más precoces. Aproximadamente a mitad del ciclo se produce una elevación de los niveles de LH en sangre que producirá la ovulación a las 12-24h del pico máximo (Balasch *et al.*, 1995).

El pico de LH inicia la continuación de la meiosis (que no se completará hasta que le espermatozoide haya penetrado en el ovocito), inicia la luteinización de las células de la granulosa, la expansión del cúmulo y la síntesis de prostaglandinas. Esto se produce por el aumento del AMP cíclico en el folículo, debido al aumento de la LH, superando este la acción inhibidora del OMI y del inhibidor de la luteinización (LI). Por otro lado, la LH, FSH, progesterona y prostaglandinas estimularán la actividad de enzimas proteolíticos que digerirán el colágeno de la pared folicular hasta constituir el estigma ovárico o punto de ruptura folicular (Botella Llusia, 1995). Las prostaglandinas también contraerán las células de músculo liso del ovario, contribuyendo a la extrusión del ovocito-masa celular del cúmulo.

Antes de la ruptura folicular, las células de la granulosa aumentan de tamaño y adoptan un aspecto vacuolado asociado a la acumulación de luteína (pigmento amarillo); inmediatamente después de la ruptura folicular la cavidad se colapsa y se rellena de sangre. Ésta estructura glandular, llamada cuerpo lúteo producirá un aumento de la secreción de progesterona, aunque también seguirá produciendo cierta cantidad de estrógeno. Ambas hormonas son

necesarias para permitir la transformación endometrial necesaria para la posible implantación del blastocisto (Moore y Persaud, 1999).

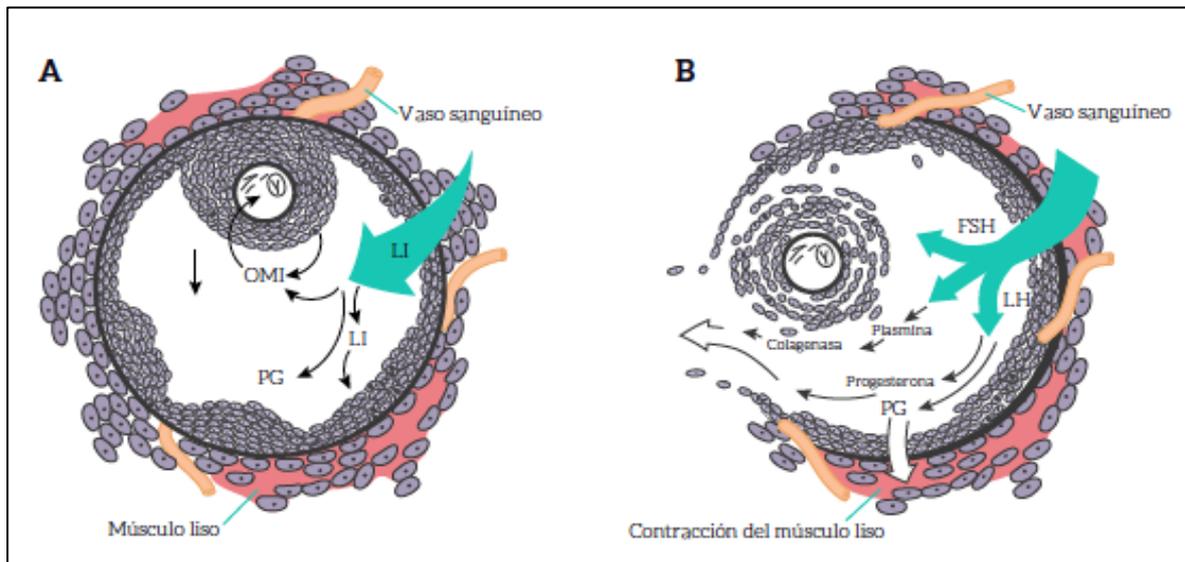


FIGURA 2. Mecanismos de la ovulación. A.- Inhibición de la ovulación mediante LI y OMI. B.- Expulsión del complejo oocito-cúmulo (COC) del folículo, gracias a la acción de prostaglandinas y enzimas proteolíticas en respuesta al pico de LH (adaptado de Speroff y Fritz, 2006).

2. ESTERILIDAD E INFERTILIDAD

2.1 DEFINICIÓN Y CAUSAS

La ESHRE define esterilidad como la incapacidad de la pareja para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito. Se considera esterilidad primaria cuando nunca se ha conseguido embarazo sin tratamiento y esterilidad secundaria si tras una gestación conseguida sin tratamiento, transcurren más de 12 meses sin conseguir un nuevo embarazo (Kazlauskas *et al.*, 2009).

Por otro lado, entendemos por infertilidad la incapacidad de conseguir un recién nacido vivo, éste es el caso en que se consigue una gestación que posteriormente se aborta. En países desarrollados los problemas de esterilidad afectan aproximadamente a un 10-15% de las parejas en edad reproductiva (Matorras *et al.*, 2018). Cada año

aumentan estas cifras, constatando el hecho de que las mujeres cada vez retrasan más la maternidad, aumentando de esta manera los problemas reproductivos (Minaretzis *et al.*, 1998; Bonilla-Musoles y Pellicer, 2008). 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 que afectan a la mujer se las puede dividir dependiendo de la localización del problema (Kazlauskas *et al.*, 2009):

1. Alteraciones tubáricas (aproximadamente el 40%) Son defectos anatómicos en las trompas, que impiden el normal funcionamiento de las mismas.
2. Alteraciones ováricas (otro 40%). Se dividen en orgánicas (agenesia, endometriosis...) y funcionales (disfunción ovárica, alteraciones de la fase lútea...)
3. Alteraciones anatómicas del aparato reproductor (10%). Es un factor importante en la génesis de abortos (adherencias, miomas...)
4. Alteraciones de la migración espermática. Puede verse alterada por diferentes situaciones dependiendo de su localización; vaginales (vaginitis, tabiques...) y cervicales (procesos infecciosos, alteraciones funcionales en la composición del moco cervical por disfunción ovulatoria).
5. Alteraciones sistémicas. Se pueden relacionar con procesos

orgánicos o funcionales; orgánicos: que afectan a la neurohipófisis o a las glándulas suprarrenales y las funcionales cómo son las relacionados con enfermedades sistémicas graves, alteraciones tiroideas, obesidad, adelgazamiento extremo, abuso de drogas y tóxicos.

En esta memoria hemos tenido en cuenta sobre todo tres tipos de infertilidades: la baja reserva por edad materna avanzada, la endometriosis y la esterilidad de origen desconocido, que son las que más nos encontramos en nuestras consultas en los últimos años.

2.1.1 ENDOMETRIOSIS

La endometriosis se define como tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. El dolor crónico y la esterilidad son las dos mayores expresiones de esta enfermedad (Pérez-Millán *et al.*, 2009).

La encontramos en mujeres en edad reproductiva alrededor del 2.5% a 3.3%, de todas las etnias y grupos sociales. En estudio de fertilidad lo diagnosticamos en aproximadamente el 20-68% de las mujeres (Fernández y Alborzoz, 2010).

El compromiso de la fertilidad en la mujer en los estadios avanzados se entiende por la distorsión anatómica, la formación de adherencias y la destrucción de órganos y estructuras pélvicas; sin embargo en los estadios iniciales se postulan etiologías multifactoriales. La participación de mediadores inflamatorios en el fluido peritoneal (FNT-alfa, EFG, VEGF e IL-1, IL-6 e IL-8) así como la expresión de marcadores moleculares endometriales que comprometerán negativamente la calidad del ovocito, su captura por la trompa, la interacción con el espermatozoide, fecundación, desarrollo embrionario y en ocasiones la implantación (Fernández y Alborzoz, 2010).

Se postula sobre la menor calidad ovocitaria, debido a un ambiente folicular adverso, repercutiendo de esta forma en una menor tasa de fecundación y del desarrollo embrionario posterior, provocando una menor tasa de implantación (Simón *et al.*, 1994; Garrido *et al.*, 2000; Pellicer *et al.*, 2001).

Existen teorías sobre desórdenes funcionales en el endometrio eutópico de las endometriosis, lo que puede explicar el fallo de implantación por contractilidad uterina anormal, interfiriendo así en la adhesión y penetración del embrión en el endometrio decidualizado (Bulletti *et al.*, 2002, 2005, 2010). Aunque también se encuentran otros resultados en los que comparan las tasas de embarazo con otras patologías, refiriendo tasas de embarazo similares (Martínez-Salazar *et al.*, 2007; Harb *et al.*, 2013); y otros en los que exponen una tasa de implantación similar a las pacientes con endometriosis que reciben ovocitos donados con receptoras sin endometriomas (Alborzi *et al.*, 2006; Sallam *et al.*, 2006).

2.1.2. BAJA RESERVA OVÁRICA (FACTOR EDAD MATERNA)

La baja reserva ovárica es un factor limitante importante en los tratamientos de fertilidad. Podemos encontrarla en mujeres jóvenes que asocian algún tipo de patología (anomalías genéticas, inmunológicas...) o bien, más frecuentemente en las mujeres de edad avanzada, en las que aparte de observar una reducción en la cantidad de ovocitos también presentar una disminución en la calidad de éstos.

La mayor parte de estas pacientes tendrán que recurrir a técnicas de reproducción asistida para conseguir embarazo, aunque las tasas en este grupo son bajas y se asocian a alto riesgo de aborto. 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; Barattini *et al.*, 2018).

La disminución de la reserva ovárica comienza a ser notoria a partir de los 35 años y muy acentuada a partir de los 40; se cree que este fenómeno se acompaña con un descenso en la calidad del ovocito (Faddy *et al.*, 1992). En nuestro estudio analizamos el grupo de baja reserva en mujeres mayores de 39 años.

2.1.3. OTRAS CAUSAS

Existen múltiples causas de esterilidad, y probablemente, aún desconozcamos una parte de ellas. Se resumen a continuación otras causas frecuentes, aunque no han sido analizadas en nuestro trabajo.

En 2013, en el registro de la SEF (Sociedad Española de Fertilidad), encontramos un 16% de esterilidad de causa desconocida, o lo que es lo mismo, parejas en las que no se ha encontrado ningún problema reproductivo en el estudio de fertilidad.

En estas parejas, podremos encontrar las causas de su esterilidad a medida que les realicemos los diferentes tratamientos reproductivos, serán los ciclos de estimulación y las técnicas de reproducción asistida las que nos revelen dichos problemas cómo la baja respuestas, el fallo de fecundación o la mala calidad embrionaria, entre ellos (Siristatidis y Bhattacharya, 2007; Kamath y Bhattacharya, 2012).

La prevalencia de esta alteración está constantemente a debate, ya que en el estudio básico no se diagnostican múltiples causas que pueden generar una subfertilidad asociada (alteraciones leves en la función tubárica, alteraciones a nivel espermático,

imposibilidad del estudio del ovocito de la mujer...). Por estos motivos existen autores que creen que el término EOD (esterilidad de origen desconocido) debería desaparecer, puesto que depende de la cantidad y calidad de pruebas que se les realicen a las parejas (Gleicher y Barad, 2006).

El manejo de estas parejas se debe basar en la accesibilidad a diferentes recursos, la edad de la paciente y la duración de la infertilidad (Ray *et al.*, 2012). Según múltiples estudios, la guía NICE recomienda tratamiento de estimulación con IIU (inseminación intrauterina) con un grado de recomendación A.

Se cree que alrededor del 15-20% de las causas de esterilidad femenina se debe a la oligo/anovulación. Clasificamos estos trastornos según la OMS en:

Grupo 1: fallo hipotálamo-hipofisario (10%)

Grupo 2: disfunción hipotálamo-hipofisaria (85%). El síndrome de ovario poliquístico es su máximo exponente, y la hiperprolactinemia también se incluye en éste grupo.

Grupo 3: fallo ovárico (4-5%)

Según un consenso entre la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) y la ASRM (American Society of Reproductive Medicine) se definió el SOP (síndrome de ovario poliquístico) cómo al menos dos de estos tres criterios (siempre con la exclusión del Cushing, la hiperplasia suprarrenal congénita, la hiperprolactinemia y los tumores secretores de andrógenos).

- Oligo/anovulación
- Signos analíticos (LH e insulina basal elevadas) y/o clínicos (hirsutismo, acné, distribución androide de la grasa) de hiperandrogenismo
- Ovarios poliquísticos en ecografía (agrandados con > 12

folículos de 2-9mm de forma difusa en uno o ambos ovarios).

Estas pacientes, debido a su trastorno de base, tienen un aumento del riesgo cardiovascular, diabetes mellitus, HTA (hipertensión arterial), perfil lipídico alterado y carcinoma endometrial; cómo mayor riesgo de aborto espontáneo y diabetes gestacional (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop group, 2004). En estas pacientes es importante el diagnóstico temprano, sobre todo en las que se asocia una resistencia a la insulina para así evitar futuras complicaciones. Se debe recomendar pérdida de peso en aquellas que asocien obesidad, puesto que en más del 50% se restaurará la función ovulatoria (Clark *et al.*, 2000). Dentro de los tratamientos de estimulación, se valorarán, dependiendo de las características de la paciente, qué forma de inducir la ovulación es la mejor, asociando o no sensibilizantes a la insulina.

Otro factor asociado a un porcentaje no desdeñable de problemas de fertilidad es el factor tuboperitoneal, que se cree responsable de aproximadamente un 30% de las causas de esterilidad. Sus principales causas son la enfermedad inflamatoria pélvica, la cirugía pélvica o abdominal, peritonitis y la endometriosis. La histerosalpingografía es la técnica a día de hoy, de elección para su diagnóstico. Ésta nos informará sobre la permeabilidad de las trompas cómo sobre anomalías estructurales o congénitas de la cavidad endometrial; pudiendo así realizar los tratamientos necesarios para restablecer o mejorar la fertilidad de la mujer.

Aunque en éste trabajo no lo estudiamos, sí que ha sido protagonista en múltiples estudios sobre peptidasas; se trata del factor masculino. Aproximadamente un 33% de los problemas de esterilidad se deben a éste causa. Su evaluación es sencilla, mediante un seminograma, aunque valores por debajo de los de

referencia no indican necesariamente esterilidad. Los valores anormales siempre han de confirmarse; y nos ayudarán a decidir que tratamiento es el óptimo para esa pareja.

2.2. ESTUDIO DE LA PAREJA EN REPRODUCCIÓN

El momento en el que realizar la primera valoración dentro de un estudio de fertilidad varía; habitualmente se iniciará tras un año de relaciones sin protección y sin conseguir gestación; aunque existen una serie de circunstancias que pueden hacer adelantar el estudio cómo son mujeres mayores de 35 años, antecedentes de abortos de repetición, cirugías pélvicas o procesos tuboováricos, enfermedades genéticas, procesos de esterilización previos, ciclos menstruales irregulares o amenorreas o varones con riesgo de subfertilidad.

En este estudio debemos valorar a ambos miembros de la pareja, iniciando el estudio por una anamnesis completa e historia detallada. La investigación inicial se basa en tres pilares:

- Confirmar la ovulación: ciclos menstruales de 24-35 días, nos indican ovulación 97% (grado recomendación B); una determinación hormonal en tercer día de ciclo, el recuento de folículos antrales en fase folicular precoz y la determinación de la hormona antimulleriana nos orientan sobre la reserva ovárica de la mujer, permitiéndonos predecir su respuesta a una estimulación ovárica.
- Confirmar proporción suficiente de espermatozoides normales y funcionantes mediante un seminograma, guiándonos por los valores de referencia de la OMS 2010. Solicitando nueva valoración ante resultado patológico tras unas semanas; excepto en casos graves (azoospermia) que se solicitará de

inmediato. La capacitación espermática (REM = Recuento de Espermatozoides Móviles) nos ayudará a elegir la técnica de reproducción asistida más conveniente.

- Confirmar la permeabilidad tubárica: la histerosalpingografía es la técnica de elección para evaluarla; se solicitará en un segundo tiempo tras resultados de seminograma en caso de sospecha de patología seminal.

Los resultados de estas pruebas nos llevarán a la solicitud de pruebas más específicas en caso de encontrar resultados patológicos o bien decidir que técnica de reproducción es la más adecuada para la pareja.

2.3. TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Tras el estudio de pareja estéril debemos tener claras las indicaciones para los diferentes tipos de técnicas; siempre evaluando cada pareja de manera individualizada, pero planteando los límites y requisitos de cada técnica.

2.3.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)

Esta técnica consiste en depositar espermatozoides dentro de la cavidad uterina de la mujer en su periodo ovulatorio. Es un tratamiento sencillo, con escasos riesgos y con coste económico bastante inferior a una FIV. Existen una serie de factores que empeoran el pronóstico cómo son la edad de la mujer (> 40 años), mayor tiempo de esterilidad y calidad seminal (REM > 5 M mejora los resultados, aunque el margen de recomendación se mueve entre los 3-5M). Se recomienda realizar estimulación ovárica controlada con gonadotropinas, seleccionando el tipo dependiendo de las características de la mujer; induciendo la ovulación con hCG con al menos un folículo de 18mm (nunca más de 3-4 >16) y realizando la

inseminación entre las 33-40 h.

En cuanto a resultados se obtiene la mayor tasa de gestaciones en los primeros 4 ciclos (Matorras y Hernández, 2007). Diversos autores indican que los ciclos de IAC (inseminación artificial de cónyuge) tienen mayor coste-eficacia en los casos de disfunción ovulatoria o factor masculino leve (Goverde *et al.*, 2000). Las tasas varían del 5-70%, aceptando cómo tasa por ciclo el 10-20%.

2.3.2. FECUNDACIÓN IN VITRO E INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (FIV/ICSI)

La técnica de reproducción consiste en la obtención de los gametos y su preparación para la posterior fecundación del ovocito en condiciones de cultivo in vitro, y finalmente su transferencia a la cavidad uterina. La forma en la que fecundemos los ovocitos nos dará el nombre de la técnica. La ICSI tiene unas indicaciones determinadas cómo son alteraciones seminales severas (oligozoospermia, astenozoospermia, fallo fecundación tras FIV, muestras criopreservadas de pacientes oncológicos, espermatozoides obtenidos de testículo...)

Es importante hacer una buena indicación de la técnica de reproducción para así poder conseguir unos buenos resultados; las indicaciones han ido aumentando con el tiempo: factor tubárico, fallo de inseminaciones, factor masculino (REM < 3M), esterilidad de origen desconocido, fallo ovárico o baja reserva y cómo preservación de fertilidad.

En una primera fase debemos estimular los ovarios de la paciente con gonadotropinas, intentando conseguir una óptima respuesta (ni híper ni hiporrespuesta), cuando estos se encuentren en tamaño correcto para la extracción del ovocito (normalmente entre 17-20mm) realizaremos la punción ovocitaria a las 36 horas de la

descarga con hCG. La punción es transvaginal, con la ayuda de una sonda vaginal ecográfica con visión directa y una guía donde colocaremos una aguja de 19G puncionaremos y aspiraremos (presión de vacío aproximada de 150mmHg) cada uno de los folículos. Tras obtener los ovocitos el embriólogo decidirá la técnica de fecundación y posteriormente se dejarán los embriones obtenidos a cultivo. La tendencia actual es transferir los embriones en estadio de blastocisto (día +5 de desarrollo embrionario), para una mejor selección embrionaria y un incremento en las tasas de embarazo, aunque las transferencias pueden hacerse 2-3 días después de la fecundación.

2.3.3. FACTORES PRONÓSTICOS DEL ÉXITO DEL TRATAMIENTO

En la actualidad se consideran como indicadores de éxito en un ciclo de FIV la edad materna, la reserva folicular, la capacidad reproductiva anterior, la respuesta a una estimulación ovárica y el número y la calidad de los embriones obtenidos (Ardoy *et al.*, 2008; López, 2008). Poder determinar más factores que pronostiquen el éxito en un ciclo de FIV sería muy interesante, sobre todo si encontráramos un indicador fácil, repetitivo y fiable; éste es el objetivo de investigación que tratamos de confirmar en esta tesis, que es el buscar una relación entre el metabolismo folicular y la calidad ovocitaria. Determinar si la bioquímica de los líquidos foliculares presenta cambios en un mismo individuo y si esto se relaciona con el éxito en el tratamiento de reproducción, nos daría una herramienta sencilla y fiable.

2.3.4. COMPLICACIONES EN TRA

2.3.4.1. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (SHO)

Se produce durante la fase lútea, producido tras la administración de la hCG tras una respuesta alta a la estimulación ovárica y caracterizado por aumento del volumen ovárico, acumulación de líquido (principalmente en pelvis y abdomen) y desequilibrio hídrico. Fisiopatológicamente se produce un aumento de la permeabilidad vascular, provocando el escape masivo de líquidos y proteínas hacia el espacio extravascular, acumulándose en forma de ascitis, derrame pleural... provocando a su vez hemoconcentración, reducción en la perfusión renal, incremento del gasto cardiaco y riesgo de tromboembolismo. Actualmente su frecuencia ha disminuido, gracias a las estrategias de prevención, encontrando una incidencia actual del 10%, siendo la forma grave sólo del 0,19% (Registro SEF, 2015).

Para su prevención es clave saber identificar los factores de riesgo (AMH –hormona antimulleriana-, SOP, RFA –recuento de folículos antrales...) y diseñar cada estimulación de manera individualizada. El uso de antagonistas durante la estimulación, la inducción con agonistas de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y la vitrificación son las medidas preventivas más importantes. El tratamiento en los casos graves requerirán un manejo multidisciplinar y la culdocentesis temprana serán las medidas más eficaces para reducir la gravedad en su evolución.

2.3.4.2. EMBARAZO MÚLTIPLE

Se ha observado un aumento de su incidencia en las últimas décadas, siendo la principal causa las técnicas de reproducción asistida. Las causas de esta elevada incidencia son la baja eficiencia

de las TRA (técnicas de reproducción asistida), la insuficiente información de sus riesgos, el coste económico de las técnicas... Actualmente según el registro de la SEF nos encontramos ante un 19-23% de tasa de gestación múltiple en los tratamientos de FIV/ICSI (Registro SEF, 2015). Las medidas a nuestro alcance para reducir esta complicación empieza por instaurar paulatinamente en todos los programas de FIV, la transferencia de un único embrión seleccionado (SET); el cultivo de blastocisto y el desarrollo de biomarcadores que nos permitan seleccionar al embrión con mejor potencial implantatorio (Nicolás *et al.*, 2017).

2.3.4.3. EMBARAZO ECTÓPICO

Se trata de un embarazo localizado en cualquier lugar fuera de los límites de la cavidad endometrial, siendo su localización más frecuente la ampular. Su incidencia ha aumentado en las últimas décadas, siendo una parte responsable las TRA; también se encuentra relacionado el hábito tabáquico, la enfermedad inflamatoria pélvica y la edad materna avanzada...

En las TRA podemos reducir riesgos teniendo en cuenta varios factores que se han descrito cómo predisponentes. El volumen ovárico durante la estimulación, los niveles elevados de estrógenos o las elevaciones precoces de progesterona se han asociado a alteraciones tubáricas que pueden facilitar la migración del embrión hacia ellas (Marcus y Brinsden, 1995; Jia-rong *et al.*, 2009). La técnica de la transferencia embrionaria también se ha estudiado y relacionado con el aumento de incidencia del embarazo ectópico; un volumen elevado de medio de cultivo, un exceso en la manipulación cervical o traumatismo directo contra el fondo uterino, un mayor número de embriones o su transferencia en el tercio superior de la

cavidad eleva el riesgo de generar un extrauterino. (Nazari *et al.*, 1993).

El diagnóstico precoz es esencial para evitar complicaciones graves y de esta forma poder utilizar tratamientos más conservadores. El tratamiento médico con metotrexato, en los casos seleccionados, es una de las opciones más utilizadas, con un alto porcentaje de resolución. Cuando sea preciso el tratamiento quirúrgico, optaremos por la laparoscopia, siendo la recuperación más rápida y obteniendo mejores resultados perinatales posteriores; en caso de extrema urgencia, la vía laparotómica será la primera opción. En la mayoría de los casos se optará por realizar una salpinguectomía, puesto que la opción conservadora (salpingostomía) asocia una mayor tasa de recidiva e implica fracaso terapéutico por la persistencia de tejido trofoblástico.

2.3.4.4. MATERNIDAD AÑOSA

En las últimas décadas se ha visto un incremento en la edad media de la mujer en el parto; las TRA han contribuido en el aumento de embarazo en las mujeres mayores de 40 años. La edad avanzada de la madre se ha asociado con resultados perinatales y maternos adversos, algunas de estas complicaciones están relacionadas por sí solas con el envejecimiento, mientras que otras pueden coexistir de forma independiente. Está claro que la fertilidad decrece a partir de los 35 años y que esta asocia una mala calidad ovocitaria junto con una disminución de la reserva ovárica y un ambiente hormonal alterado; además de esto, a mayor edad se asocian más antecedentes médicos y quirúrgicos que pueden afectar a la fertilidad mediante varios mecanismos. En los embarazos de mujeres de edad avanzada encontramos más riesgo de aborto espontáneo, embarazo

ectópico, anomalías cromosómicas, malformaciones congénitas y complicaciones obstétricas (mayor riesgo de preeclampsia, diabetes gestacional alteraciones placentarias, mortalidad fetal y perinatal, embarazo múltiple y tasa de cesáreas). Por todo ello, es necesaria la consulta preconcepcional y un buen control gestacional, identificando e intentando minimizar los posibles factores de riesgo y tratando precozmente las complicaciones gestacionales.

3. LAS PEPTIDASAS

El papel de los biopéptidos relacionados con la fertilidad es un campo que actualmente se está estudiando, si bien prácticamente todos los estudios que se encuentran se basan en su papel en la fertilidad masculina. Estos péptidos bioactivos están relacionados en multitud de situaciones fisiopatológicas, entre ellas las relacionadas con la fertilidad, como veremos durante la introducción.

Para estudiar las alteraciones peptidérgicas se suele analizar la actividad de las enzimas que las controlan (peptidasas). Éstas presentan una especificidad de sustrato relativamente amplia, quedando descartado el concepto “una peptidasa, un sustrato” (Schwartz, 1983; Kenny, 1986). Encontramos peptidasas en gran cantidad de tejidos y fluidos, por lo que se creen esta involucradas en el metabolismo de gran de una gran cantidad de biopéptidos, fundamentales en la comunicación intercelular del organismo (Fujiwara *et al.*, 1999). La localización celular del enzima nos puede dar la idea de su función, y el conocimiento de su función nos ha llevado actualmente a su uso como marcadores tumorales y dianas terapéuticas, entre otras.

3.1. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

Según el Comité NC-IUBMB (Comité Nacional-Unión Internacional de Biología Molecular) el término “peptidasa” hace referencia a toda aquella enzima que rompa enlaces peptídicos. En función de la situación del enlace que hidrolicen las clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas.

La función de las exopeptidasa es hidrolizar el último enlace peptídico, o de los últimos 2 o 3 aminoácidos de la cadena. Se denominarán aminopeptidasa, dipeptidil-peptidasa o tripeptidil-peptidasa cuándo su actuación tenga lugar en el extremo amino terminal; en el caso de que la hidrólisis suceda en el extremo carboxiterminal se denominarán carboxipeptidasa o peptidil-dipeptidasa. El término dipeptidasa se refiere a aquellas exopeptidasas específicas que hidrolizan el enlace peptídico de los dipéptidos. Por último, en los casos de enlaces isopeptídicos, formados por grupos diferentes al amino o carboxilo, llamaremos omega-peptidasas a los enzimas que eliminen los residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por estos enlaces.

Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena, y las clasificaremos según su mecanismo catalítico. Dentro de este grupo encontramos la aspartil-endopeptidasa, la cystil-endopeptidasa, la metaloendopeptidasa, la serilendopeptidasa, la treonil-endopeptidasa, y en un último grupo se engloban aquellas peptidasas que aún no han sido clasificadas (“unclassified-endopeptidasas”).

Las bases del sistema de clasificación de las peptidasas, según las secuencias y estructuras se establecieron en los años 90; surgiendo la base de datos MEROPS, que desde el 96 es la fuente referencial en Internet de los datos de todas las peptidasas. Su

clasificación jerárquica está construida sobre los siguientes conceptos (Barret *et al.*, 2004)(Tabla 1):

Tipo Catalítico: naturaleza química de los grupos de catálisis que hemos mencionado anteriormente, de los que tomarían la letra mayúscula inicial de la clasificación (A, C, M, S, T, U).

Clan: agrupará una o varias familias, que tendrán origen común. Tomará una segunda letra mayúscula, que no se reutilizará en caso de que desaparezca el clan en posteriores reorganización de la clasificación. No todas las familias pueden clasificarse en clanes.

Familia: agrupadas por homología con el miembro más representativo del grupo, en base a la unidad peptidásica. Aporta un número secuencial a la nomenclatura, que tampoco se reutilizará.

Peptidasa: tiene un número identificador único, con dos partes separadas por un punto.

Dentro de las diversas clasificaciones que existen, actualmente estarían aceptadas las aportadas por la *Enzyme Comission* (EC); en las que las peptidasas se encontrarían dentro del grupo E.C. 3.4, que hace referencia a las hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos.

3.2.FUNCIÓN DE LAS PEPTIDASAS

Para el funcionamiento coordinado de cualquier organismo la comunicación celular es indispensable; ésta se realiza mediante tres sistemas (hormonal, nervioso y mediadores celulares), siendo los péptidos bioactivos las “moléculas mensajeras” que se emplean para ello. Encontramos este tipo de moléculas en todos los reinos de seres vivos; también se caracterizan por sus secuencias cortas de aminoácidos que podemos encontrar libres o encriptadas en

proteínas. Serán estos los que necesiten la hidrólisis enzimática para su liberación (Sumitomo *et al.*, 2005; Nascimento-Silva *et al.*, 2008). Por lo que para la comunicación celular serán de vital importancia los sistemas peptídicos que forman los biopéptidos con los enzimas y receptores involucrados en su acción conjunta. (Turner, 1986, 1987; Angelisova *et al.*, 1999; Sjostrom *et al.*, 2000; Mina-Osorio, 2008).

Las “convertasas” se encargan de hidrolizar los péptidos bioactivos que regulan. Este control es un fenómeno complejo, flexible y aplicable al control de muy diversas funciones fisiológica y en tipos celulares muy distintos (Hallberg *et al.*, 2005).

La conversión de péptidos bioactivos es la más conocida de las funciones biológicas de las peptidasas; su actividad hidrolítica permite modular las funciones de los mensajeros peptídicos, produciendo formas activas e inactivas (Figura 3) (Antczak *et al.*, 2001; Proost *et al.*, 2007).

Clásicamente las responsables de esta conversión se creía eran las peptidasas de superficie o ectopeptidasas, éstas regulan las funciones de los mensajeros peptídicos ya que presentan su centro catalítico dirigido hacia el exterior de la célula (Turner, 1986, 1987; Taylor, 1993). Pero posteriormente se describió que tanto las formas unidas a membrana como las solubles intracelulares podían ser excretadas al exterior y de esta forma participar en la conversión de péptidos bioactivos (Balogh *et al.*, 1998; Shrimpton *et al.*, 2002). De hecho, los enzimas que han sido analizados en esta memoria están presentes en la fracción soluble del líquido folicular, siendo su función la de regular la actividad de péptidos bioactivos en el antro folicular y cuya tarea podría ser crucial en el proceso reproductivo femenino.

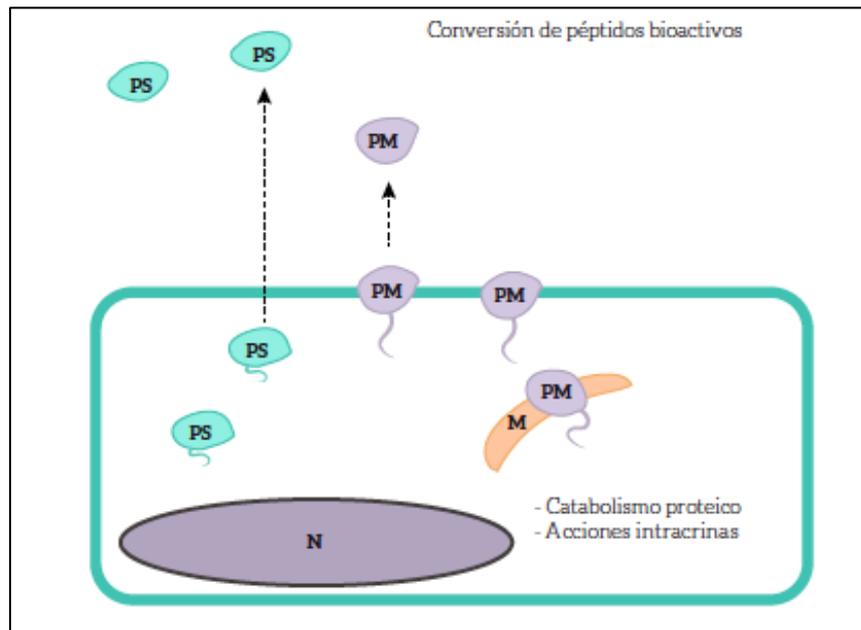


FIGURA 3.- Representación gráfica de las diferentes localizaciones de las peptidasas y sus funciones en estos lugares. (PM) peptidasa anclada a la membrana; (PS) peptidasa soluble, tanto citosólica como secretada al espacio extracelular; (N) núcleo y (M) membrana citoplasmática (Blanco, 2010).

Hasta hace unos años se creía que la última etapa del catabolismo proteico era la única función intracelular de las peptidasas (Mantle, 1992; O’Cuinn, 1998). Y salvo que las peptidasas citosólicas fueran excretadas al exterior de la célula no tomarían parte de la regulación metabólica de los péptidos bioactivos, puesto que su acción ocurre en la superficie celular. Ha sido en la última década cuando se ha descrito que además de la función endocrina, paracrina y autocrina, estos mensajeros peptídicos pueden tener también funciones intracrina (es decir, dentro de la propia célula).

Según han descritos distintos autores, muchos péptidos podrían actuar mediante su unión a receptores intracelulares, en las mismas células donde han sido sintetizados; y regulando por acción intracrina funciones como el crecimiento celular (Re, 2002, 2003; Re y Cook, 2006). Y por esto se ha propuesto que aparte de su actuación en la última etapa del catabolismo proteico, las peptidasas

intracelulares son también responsables de realizar funciones de regulación intracrina (Ferro *et al.*, 2004; Linardi *et al.*, 2004).

La actividad catalítica de las peptidasas forma parte de los procesos que producen la degradación celular; se ha descrito su importancia en la rotura folicular durante la ovulación, en el desarrollo de nuevos tejido, en la inflamación y en procesos neoplásicos. También se han descrito algunas que ejercen su función como moléculas de adhesión, vital en el reconocimiento celular y necesario en fenómenos como la migración celular (Rieman *et al.*, 1999; Antcza *et al.*, 2001; Pro y Dang, 2004; Carl-McGrath *et al.*, 2006). Otras realizan funciones receptoras, en nuestro trabajo estudiamos alguna ectopeptidasa que contienen dominios intracitoplasmáticos con pocos aminoácidos que pueden dar señales intracelulares al interaccionar con determinadas moléculas, condicionando funciones tales como la migración o el crecimiento celular (Riemann *et al.*, 1999; Antczak *et al.*, 2001; Nanus, 2003; Sumitomo *et al.*, 2005).

3.3. LAS PEPTIDASAS EN LA FISIOLOGÍA Y EN LA PATOLOGÍA

Diferentes funciones fisiológicas y la génesis y evolución de diferentes procesos patológicos están condicionadas por las peptidasas, que cumplen su tarea fundamental en la comunicación intercelular.

Se han descrito en funciones cómo la memoria, el comportamiento y la nocicepción, a nivel del sistema nervioso (Hui, 2007). También conocemos su efecto a nivel cardiovascular y función renal, por la regulación que ejercen determinadas peptidasas en las vías metabólicas del sistema renina-angiotensina (SRA) (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008; Carrera *et al.*, 2009).

También conocemos determinados cambios en la expresión y función de las peptidasas en las 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; Hannula *et al.*, 2013). El empleo de peptidasas como marcadores tumorales, es ampliamente conocido (Murakami *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Havre *et al.*, 2008; Larrinaga *et al.*, 2010, 2011a, 2011b, 2012; Blanco *et al.*, 2014).

La disregulación de diversas peptidasas, entre ellas APA Y APN han sido relacionadas no sólo con la enfermedad de Alzheimer sino también con disfunciones de la memoria (Kehoe *et al.*, 2017).

De APN también conocemos su rol en el desarrollo del cáncer (en procesos como invasión celular, proliferación, apoptosis...); su expresión incrementada en diferentes tipos de cánceres, especialmente los fenotipos de crecimiento rápido y agresivo, han sugerido APN como un potencial blanco terapéutico (Wickström *et al.*, 2017).

APA y otras aminopeptidasas están siendo estudiadas en el patologías cómo la preeclampsia (Mitsui *et al.*, 2004).

Por otro lado, en terapia farmacológica se utilizan actualmente inhibidores de algunas peptidasas, por ejemplo los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina (ACE) cómo el captopril, enalapril y lisinopril que empleamos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Wilcox *et al.*, 1988). Otro ejemplo serían las gliptinas, que inhiben la acción de la enzima DPPIV y se utilizan en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (Wiedeman y Trevillyan, 2003; Drucker y Nauck, 2006).

También encontramos estudios en los que se estudia el empleo

de otros inhibidores, cómo los de la PEP para el tratamiento de la demencia senil, los de la NEP y APN en el tratamiento del dolor, entre otros (García-Horsman *et al.* 2007; Noble y Roques, 2007).

Inhibidores de la DPPIV se están utilizando para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II y encontramos estudios sobre sus posibles beneficios en el metabolismo óseo (Green *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2017).

En las próximas páginas haremos referencia a alguna de las peptidasas anteriormente citadas, llevando a cabo una descripción detallada y amplia de alguna de sus funciones, y su posible vinculación con la fertilidad.

3.4. PAPEL DE LAS PEPTIDASAS EN LA FERTILIDAD

Durante el ciclo sexual se generan cambios hormonales, y a lo largo de él se producen alteraciones en las actividades de los enzimas proteolíticos.

En estas últimas décadas aparecen múltiples estudios que relacionan el papel de las peptidasas con las hormonas sexuales. Se han observado la existencia de enzimas que hidrolizan la GnRH en todas las zonas cerebrales, no sólo en el eje hipotálamo-hipofisario. El seguimiento de la actividad proteolítica durante el ciclo sexual, ha permitido observar cambios cíclicos en estas actividades, sugiriendo que pudieran 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

Actualmente, a pesar de las investigaciones realizadas, no se conoce totalmente el mecanismo por el cual se produce la liberación

cíclica hormonal.

En el control de la secreción hormonal intervienen un gran número de neuropéptidos, tanto a nivel hipofisario e hipotalámico como en otras regiones como la amígdala o la corteza. Así, hay numerosos trabajos que relacionan la actividad reproductiva con biopéptidos tales como la angiotensina II, el neuropéptido Y, la colecistoquinina y los péptidos opioides.

Se observó en ratas que el descenso brusco del tono opioide del hipotálamo se produce durante el pico preovulatorio de la LH (proestro); observando que este evento es esencial en el mecanismo neural que provoca la secreción de LH, ya que provocando un descenso del tono opioide adelantamos el pico hormonal (Sarkar y Yen, 1985). Al parecer entre el reloj neural y las neuronas de GnRH se encuentra el sistema opioide, lo que hace plantear que sea el reloj neural el que restrinja el tono opioide (Kalra, 1992). Otros autores proponen que son los estrógenos los que intervienen en la secreción de gonadotropinas, modulando la síntesis y/o actividad de enzimas responsables de la degradación o síntesis de péptidos (Fink, 1988). También se ha descrito que durante el ciclo estral (periodo entre ovulaciones) el estradiol hace fluctuar la densidad sináptica en el hipocampo (Woolley y McEwen, 1992).

Uno de los péptidos involucrados en el control de la liberación cíclica hormonal son las encefalinas (endopéptidos opiáceos). Se han estudiado las actividades de tres enzimas degradadoras de encefalinas: la tyr-aminopeptidasa (soluble), la aminopeptidasa A (APA) y la APN (ambas unidas a membrana); mostrando cómo su actividad soluble cambiaba a lo largo del ciclo. Se observaron niveles de mayor actividad a nivel hipotalámico durante la tarde del proestro, de igual modo, se observó que la actividad de APN también

presentaba variaciones a lo largo de todo el ciclo, observándose sus mayores niveles en la tarde del proestro a nivel de hipotálamo, hipófisis y amígdala. Todo esto es coincidente con el descenso en el tono opioide, pudiendo estar implicadas por ello en la regulación del ciclo sexual (de Gandarias *et al.*, 1996; Fernández, 1996).

Sobre el mecanismo de liberación gonadotrópica del eje hipotálamo-hipofisario, complemento del reloj neural de Kalra (1992), nuestro grupo propuso que durante la fase de estro (periodo entre ovulaciones de los mamíferos) las encefalinas actuarían inhibiendo la liberación de GnRH y catecolaminas, produciendo una inhibición global; lográndose gracias a una menor degradación del péptido a nivel intracelular y sináptico. Al contrario que durante el proestro (momento en el que se produce el pico preovulatorio de la LH), en el que el incremento de la actividad enzimática degradado produciría una desinhibición encefalinérgica) (Figura 4).

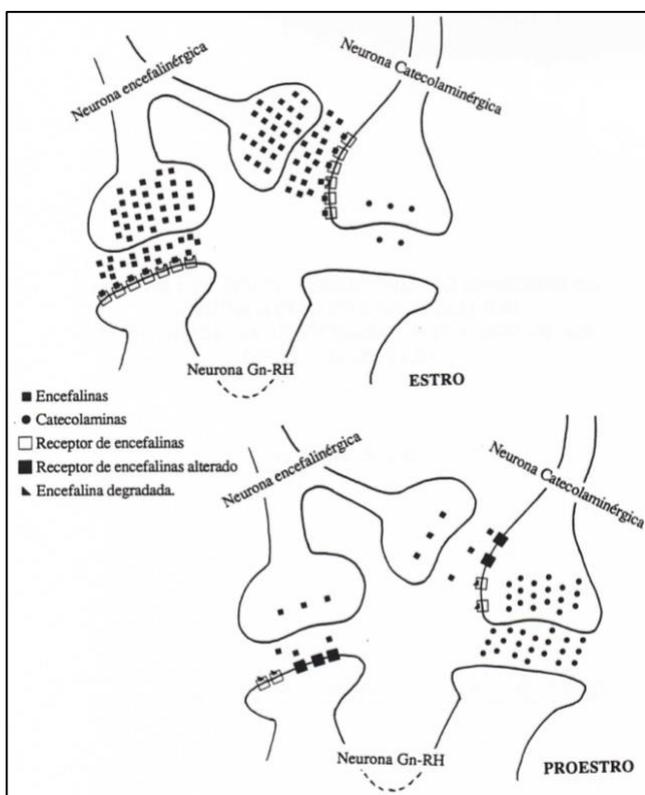


FIGURA 4. Durante la fase de estro habría un predominio de acción opioide (PIPS), que inhibiría la liberación de GnRH y podría inhibir a la vez la liberación de catecolaminas. Durante el proestro, ante la caída de los niveles de encefalinas, se estimularía la producción de catecolaminas (PEPS) y se desinhibiría la liberación de GnRH (de Gandarias *et al.*, 1994a).

3.4.1.1 SISTEMAS DE COMUNICACIÓN CELULAR Y FERTILIDAD

Los cambios en las células ováricas y endometriales durante el ciclo sexual, cambios en cuanto a crecimiento, diferenciación y regresión celular hacen del órgano reproductor femenino un buen modelo para el estudio de la regulación peptidérgica (Fujiwara *et al.*, 1999). Conocer estos sistemas de comunicación celular nos puede ayudar a optimizar los tratamientos de reproducción asistida, de esta forma podríamos conseguir el microambiente óptimo para el cultivo de gametos y embriones.

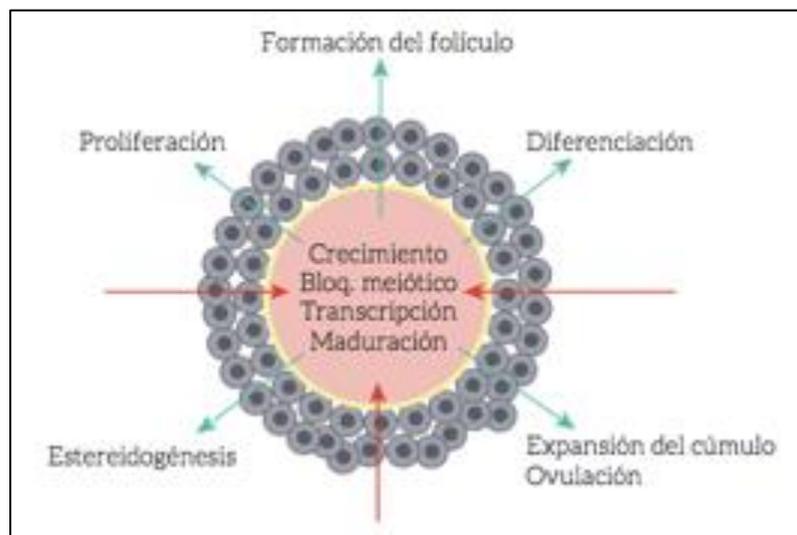


FIGURA 5. Comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa. Se observa la influencia de las células de la granulosa en el desarrollo ovocitario así como los procesos controlados por el ovocito que se llevan a cabo en las células de la granulosa (adaptado de Eppig, 2001).

El opioide es uno de los sistemas de comunicación celular más estudiados (péptidos opioides endógenos -EOP-, receptores celulares y el enzimas que los regulan -peptidasas) Éste interviene en la función reproductora, pudiéndolo encontrara en órganos y tejidos del aparato genital masculino y femenino. El sistema Renina-Angiotensina es otro modelo de regulación fisiológica importante,

está presente en el ovario de múltiples especies, entre ellas la humana (Nemeth *et al.*, 1994), de hecho, se ha propuesto que interviene en procesos como la esteroidogénesis, la ovulación, el síndrome de ovario poliquístico y el síndrome de hiperestimulación ovárica (Harata *et al.*, 2006).

3.4.2 FERTILIDAD MASCULINA

En la membrana de los espermatozoides se han descrito los tres tipos de receptores opioides (Agirregoitia *et al.*, 2006; Albrizio *et al.*, 2006), indicando que los péptidos opioides endógenos tienen una acción directa sobre las células espermática, y por tanto, sobre la capacidad reproductiva del hombre. Encefalinas y endorfinas (péptidos opioides) se encuentran presentes en fluido seminal, en una concentración 6-12 veces superior que en sangre (Sharp y Pekary, 1981).

En los últimos tiempos se ha descrito la implicación de varias peptidasas en diferentes fracciones del semen y su implicación en la motilidad espermática. APN y NEP han sido detectadas en distintas fracciones del líquido seminal. APN se encuentra ampliamente distribuida mientras que a NEP la encontramos en áreas muy concretas de las células espermáticas. Esto ha permitido ampliar nuestros conocimientos sobre la implicación del sistema opioide en el líquido seminal y su implicación en el control de la motilidad, permitiéndonos utilizarlo como herramienta para el diagnóstico y tratamiento en la infertilidad masculina (Subirán *et al.*, 2008).

Nuestro grupo ha estudiado las actividades peptidérgicas en relación con la fragmentación del DNA espermático, concluyendo que de alguna forma tanto el metabolismo opioide como el del sistema renina angiotensina están implicados en la respuesta celular a la fragmentación (Aparicio, 2018; Aparicio *et al.*, 2018a, 2018b).

3.4.3 FERTILIDAD FEMENINA

Las hormonas gonadotrópicas FSH y LH modulan la expresión de los precursores de péptidos opioides en ovario. Se han hallado receptores de péptidos opioides en varias partes del sistema reproductor femenino, como en la placenta humana (Belisle *et al.*, 1988). 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.*, 2012).

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 (Subiran *et al.*, 2011; Agirregoitia *et al.*, 2012). De hecho, se considera que un gran número de péptidos bioactivos están relacionados con la función y la diferenciación de las células ováricas.

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 QUE ANALIZAREMOS EN ESTE TRABAJO

En la siguiente tabla se muestra la clasificación jerárquica de las peptidasas que analizamos en este trabajo, pudiendo observar el nombre completo de la enzima cómo su acrónimo.

TIPO	CLAN	FAMILIA	NºEC	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

		M13	3.4.24.11	NEP (*), Neprilisina, Endopeptidasa neutra, Endopeptidasa 24.11, Peptidasa neutra del borde en cepillo de riñón, Enkefalinas (erróneo), Endopeptidasa 2, Antígeno CALLA, Endopeptidasa, Metaloendopeptidasa de membrana Proteínasa neutra del borde en cepillo de riñón, Endopeptidasa - 2, Glicoproteína CALLA, CALLA, Metaloendopeptidasa neutra, Metaloendopeptidasa de membrana, Endopeptidasa neutra 24.11, CD10
	MH	M18	3.4.11.21	Asp-AP , Aspartil aminopeptidasa
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

TABLA 1.- Aparecen mencionadas las nueve peptidasas que analizaremos en este trabajo.

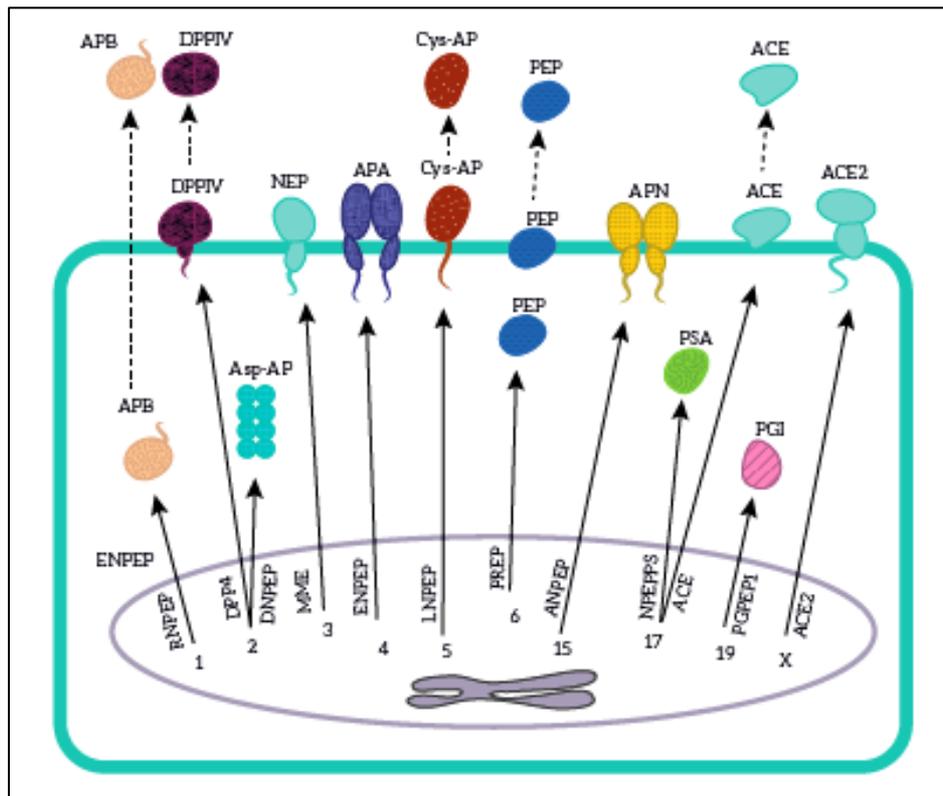


FIGURA 6. Representación gráfica de las peptidasas con su localización celular (soluble en citoplasma, de membrana o extracelular) y el cromosoma en el que se encuentra el gen que las codifica (Blanco, 2010).

3.5.1. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LAS AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS

APN (AMINOPEPTIDASA NEUTRA, CD13 – EC 3.4.11.2)

También conocido como CD13, se trata de una ectopeptidasa de membrana dependiente de Zn^{2+} , que principalmente degrada proteínas y péptidos con un aminoácido neutro N-terminal; pertenece a la familia M1 de las aminopeptidasas. Es principalmente una aminopeptidasa de membrana tipo II (McLellan *et al.*, 1988; Riemann *et al.*, 1999); presentándose altamente glicosilada y con su centro activo orientado hacia el exterior de la célula.

Se la describe como una homodímero con dos subunidades unidas no covalentemente con un peso molecular aproximada de 150 kDa (Sjostrom *et al.*, 2000). Su forma soluble la encontramos en fluidos corporales cómo el plasma sanguíneo, la orina, el líquido seminal y el LF (Jung *et al.*, 1984; Erbeznic y Hersh, 1997; Antczak *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Ramon, 2011; Roméu *et al.*, 2011, 2018a; Subiran *et al.*, 2011; Romeu, 2014; Rodríguez *et al.*, 2018). Seguimos sin conocer el mecanismo por el cual esta aminopeptidasas es liberada de la membrana plasmática.

Su hidrólisis libera el aminoácido del extremo amino terminal de péptidos que tiene entre 3 y 16 residuos de aminoácidos. Actúa sobre varios aminoácidos, siendo su mayor acción sobre la alanina.

Cuando existe un residuo hidrofóbico seguido de prolina, la hidrólisis que provoca deja intacto al dipéptido resultante, hidrolizando múltiples dipéptidos, excepto los que contiene residuos aspartil, glutamil, histidil, glicil, prolil o valil en el extremo N-terminal (O'Cuinn, 1998).

En el brazo largo del cromosoma 15 encontramos el gen que codifica este enzima (ANPEP), ocupando 35 kb (Look *et al.*, 1989), variando su expresión durante el crecimiento y diferenciación celular (Sjostrom *et al.*, 2000).

Su actividad óptima se observa con pH 7 y se activa por la

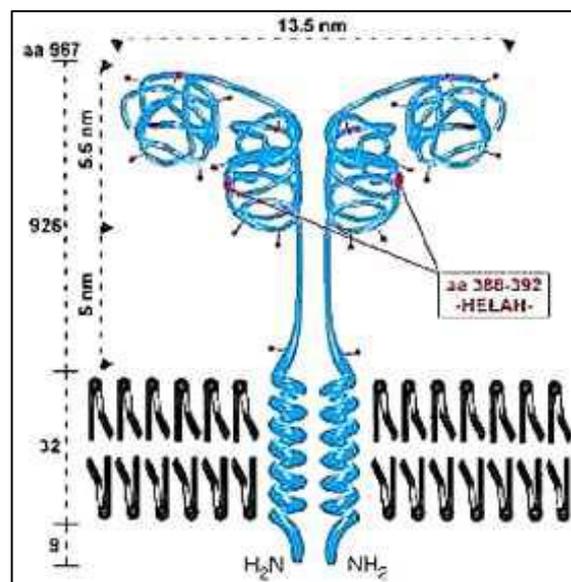


FIGURA 7. Estructura tridimensional APN.

presencia de DTT (ditiotreitól). Su inhibición es provocada por agentes metaloquelantes, agentes tiol-reactivos, bestatina y la amastatina (O'Cuinn, 1998; Riemann *et al.*, 1999; Sjostrom *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2004).

La encontramos ampliamente distribuida en las membranas celulares del borde en cepillo del intestino delgado, hígado, riñón y placenta. En el sistema inmunológico, la APN se encuentra como marcador de superficie (CD13) en monocitos/macrófagos, células presentadoras de antígenos (APC), linfocitos T y B, y granulocitos. También esta enzima, participa en la degradación de citoquinas y antígenos presentados en la superficie celular por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, regulando indirectamente funciones del sistema inmune. La APN también participa en la transducción de señales en monocitos y en los linfocitos T (Scornik y Botbol, 2001; Luan y Xu, 2007; Mina-Osorio, 2008; Wickström *et al.*, 2011).

Su mayor interés surgió cuando se descubrió que participaba en la hidrólisis e inactivación de encefalinas cerebrales (Gros, Giros y Schwartz, 1985b; Matsas *et al.*, 1985). Así como en la regulación de la actividad de péptidos como las anteriormente citadas encefalinas, las angiotensinas, bradiquininas, citoquinas y quimosinas, entre otras (Gros *et al.* 1985; Matsas *et al.*, 1985).

Encontramos el papel biológico de este enzima ampliamente descrito. Se emplea como marcador histológico y/o de pronóstico en algunos tipos de cáncer (Bogenrieder *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 2001; Hashida *et al.*, 2002), su papel regulando indirectamente funciones del sistema inmune (Riemann *et al.*, 1999), así como su implicación en la angiogénesis (Bhagwat *et al.*, 2001). Está implicada en el control de la presión arterial y las respuestas analgésicas;

encontrándose su actividad sobreexpresada en procesos patológicos cómo el cáncer, la inflamación..., convirtiéndola en un blanco para el diseño de agentes terapéuticos para el tratamiento de la presión arterial, el manejo del dolor, el desarrollo de antivirales... (Pascual *et al.*, 2015).

Se ha descrito su rol en la regulación de múltiples funciones espermáticas; viéndose cómo afecta su actividad incrementada a la motilidad espermática, su viabilidad, a la reacción acrosómica... (Khatun *et al.*, 2017).

Últimamente encontramos varios trabajos que intentan relacionar la actividad de varias peptidasas relacionadas con el SRA, entre ellas la APN, en relación con su actividad y la enfermedad de Alzheimer, dónde se han encontrado niveles de actividad alterados (Kehoe *et al.*, 2017).

PSA (AMINOPEPTIDASA SENSIBLE A PUROMICINA – EC 3.4.11.14)

Se trata de una sialogliproteína dependiente de Zn^{2+} , pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas al igual que la APN; y aunque también se activa en presencia de Co^{2+} , el complejo que forma es menos estable. Se trata de una metaloproteína de cadena simple de 100kDa aproximadamente.

Su hidrólisis libera preferentemente alanina del extremo N-terminal de muchos oligopéptidos, que contengan menos de 13 aminoácidos; también puede hidrolizar leucina, arginina, tirosina, fenilalanina y metionina, entre otros, con elevada afinidad (Taylor, 1993). Por el contrario, su acción no afecta a los péptidos con prolina en última o antepenúltima posición (Dando *et al.*, 1997). Encefalinas, endorfinas y dinorfinas se encuentran entre los sustratos de este enzima (Gros *et al.*, 1985; McLellan *et al.*, 1988). Su máxima

actividad se da a pH 7,5 y se activa por compuestos como tiol e iones calcio (Dando y Barrett, 2004). Se inhibe por EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), fenantrolina, amastatina, bestatina y puromicina (Mantle *et al.*, 1983; Dando *et al.*, 1997); siendo la sensibilidad por esta última, así como su activación por tioles los hecho que diferencian PSA del resto de metalopeptidasas (Mantle, 1992).

Encontramos el gen que codifica la PSA (denominado NPEPPS) en el cromosoma 17 (17q21), ocupando 40kb, presenta 23 exones y 22 intrones (Thompson *et al.*, 1999).

Este enzima es principalmente citosólica (Tobler *et al.*, 1997), por lo que como clásicamente se creía no podría realizar su acción como enzima degradadora de péptidos bioactivos; aunque hay autores que proponen que PSA participaría en eventos proteolíticos esenciales para el crecimiento y la viabilidad celular (Constam *et al.*, 1995). Sobre esto, Stoltze *et al.* (2000), consideran que las exopeptidasas y oligopeptidasas del citosol actúan a nivel de la degradación de oligopéptidos, incluyendo algunos péptidos antigénicos que resultan del turnover proteico celular. No obstante, PSA también ha sido detectada de forma soluble en cerebro bovino (Hersh y McKelvy, 1981) y también se ha descrito en líquido folicular (Roméu *et al.*, 2014, 2018a) por este motivo se cree puede estar involucrada en el proceso reproductivo (Osada *et al.*, 2001a, 2001b).

La encontramos mayoritariamente en cerebro, aunque 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).

Encontramos estudios en los que se busca su implicación en patología psiquiátrica como la psicosis, y de esa manera poder

encontrar un marcador de pronóstico (Fernández-Atucha *et al.*, 2015).

APB (AMINOPEPTIDASA B – EC 3.4.11.6)

Como las anteriores, esta aminopeptidasa pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas, presentando su unión a Zn²⁺, al igual que las otras (Suda *et al.*, 1976; Ocain y Rich, 1987). Dado que depende de ese ión, sus inhibidores serán los quelantes, así como, por inhibidores tales como la bestatina, los agentes tiolreactivos, la arfamenina A y B (Hopsu *et al.*, 1966; Cadel *et al.*, 1995; O’Cuinn, 1998; Foulon *et al.*, 2004). Este enzima de 72 kDa es estimulado por iones clorados, y el intervalo de pH en el que actúa es bastante amplio, aunque será alrededor del pH 7 cuando desarrolle su actividad óptima. Será esto, junto a su amplia ubicuidad, lo que ayuda a argumentar a favor de su adaptabilidad a diversos compartimentos y el amplio espectro en su papel en fenómenos fisiológicos. Hay autores que la relacionan con procesos reguladores de membrana plasmática y con fenómenos de maduración post-traducciona (Foulon *et al.*, 2004)

El gen que codifica este enzima (RNPEP), de 24 kb, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 y posee numerosos exones (Aurich-Costa *et al.*, 1997); y el producto final se trata de una proteína monomérica cuyo extremo amino terminal puede actuar como péptido señal (Fukasawa *et al.*, 1996; Cadel *et al.*, 1997).

Su acción libera los aminoácidos lisina o arginina del extremo amino terminal, siempre y cuando el anterior no sea una prolina (Gainer *et al.*, 1984; Cadel *et al.*, 1995). Las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, A III y kalidinas son sus sustratos naturales (McLellan *et al.*, 1988; Foulon *et al.*, 2004).

La encontramos expresada en diferente medida, en múltiples tejidos de mamíferos (Foulon *et al.*, 1996). Ha sido detectada en cerebro, páncreas, cerebro, corazón, tejido testicular y líquido seminal, entre otros (Cadel *et al.*, 1997; Taupenot *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2007; Ramon, 2011; Aparicio, 2018; Aparicio *et al.*, 2018a). Sobre su localización subcelular, en sus inicios se describió cómo proteína citosoluble, y posteriormente se localizó en el retículo endoplasmático y cómo enzima de secreción en la matriz extracelular (Lauffart *et al.*, 1988; Tanioka *et al.*, 2003; Cadel *et al.*, 2004). Aunque también encontramos medida su actividad en la fracción de membrana (Varona *et al.*, 2007).

DPPIV (DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV – EC 3.4.14.5)

Esta exopeptidasa, empleada cómo marcador tumoral, pertenece a un grupo variado de seril-peptidasas y pertenece a la familia S9. Es del grupo de la familia prolil oligopeptidas, siendo su acción la hidrólisis de algunos oligopéptidos y polipéptidos liberando un dipéptido del extremo amino terminal, siempre que el antepenúltimo 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); y es incapaz de hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos (Polgár, 2002). Siempre y cuando tenga el grupo amino libre, la identidad del último aminoácido no es crítico para su acción (Yoshimoto *et al.*, 1978).

Se trata de una glicoproteína de membrana, con extremo amino terminal hacia citoplasma de 6 aminoácidos, con dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y con un centro activo en su gran dominio extracelular. Podemos encontrarlo de forma soluble cuando pierde su extremo amino terminal insertado en la membrana, de esta forma

lo encontramos en suero humano, líquido cefalorraquídeo, líquido seminal y otros fluidos (Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Carl-McGrath *et al.*, 2006; Ramon, 2011; Aparicio *et al.*, 2018a).

El gen DPPIV se encuentra en el cromosoma 2 (2q24.2), y que abarca 70kb, está compuesto por 26 exones: Sus diferentes niveles de expresión son por el hecho de que presente múltiples exones (Rawlings *et al.*, 1991), hasta el extremo de que los aminoácidos que codifican para el centro activo se encuentren en 2 exones diferentes. Se ha llegado a describir que tras su síntesis en el retículo endoplásmico, la DPPIV no migre hasta membrana plasmática, con su consiguiente degradación, cuando se ha encontrado la mutación de un solo aminoácido en su centro activo (Tsuji *et al.*, 1992).

Su actividad óptima es a pH 7,8, y posee un peso molecular de 110kDa aproximadamente en su forma glicosilada. La inhiben el 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).

La encontramos involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimosinas (Havre *et al.*, 2008); también descrita por su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune y tiene especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi *et al.*, 1990).

Se ha encontrado en diversos tejidos en diferentes proporciones; lo observamos en una elevada proporción en riñón, placenta e intestino delgado; siendo menor su concentración en lengua e hígado y aún menor en corazón, páncreas y cerebro. Se ha descrito actividad DPPIV en el epidídimo de algunos mamíferos (bovinos y ratas),

mientras que en testículo se ha encontrado actividad DPP8/9. Se encontró actividad DPP en los espermatozoides incrustados en el epitelio, junto antes de su liberación a la luz y en las espermátides que presentaban una tinción específica para DPPIX (Dubois *et al.*, 2009).

APA (GLUTAMIL AMINOPEPTIDASA – EC 3.4.11.7)

Esta aminopeptidasa, metalopeptidasa de 160 kDa, pertenece a la familia M1 y su denominación como aminopeptidasa ácida se refiere al hecho de que libera aminoácidos del extremo amino terminal. Esta ectopeptidasa hidroliza principalmente residuos glutamil, aunque también con menor especificidad residuos aspartil (Glenner *et al.*, 1962; Wang *et al.*, 2014). En un principio se creía que Asp-AP y APA eran el mismo enzima, pero posteriormente se descubrió que presentaban características propias, actualmente se clasifican en diferentes familias (Wilk y Thurston, 1990).

Esta metalopeptidasa es una proteína de membrana tipo II con un sitio de unión a Zn²⁺ orientado hacia el exterior celular. A pesar de ser una enzima de membrana, también se ha descrito su actividad enzimática en fracción soluble y en suero; siendo su liberación al medio extracelular a consecuencia de la hidrólisis de proteínas de membrana (Carrera *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2006).

El gen ENPEP, que codifica APA, lo encontramos ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, ocupando 100kb y posee 20 exones y numerosos intrones (Vazeux *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

Su actividad óptima se desarrolla alrededor de pH 7,2, y se cativa por la presencia de iones Ca²⁺. Sus inhibidores más importantes son los agentes quelantes (EDTA, EGTA y 1,10-fenantrolina), así como los metales divalentes (Zini *et al.*, 1996).

Encontramos a APA expresada en muchos tejidos, especialmente cerebro, borde de cepillo de las células del epitelio intestinal y renal, y en el endotelio vascular (Lodja y Gossrau, 1980; Marchio *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2006; De Mota *et al.*, 2008). También se ha relacionado con múltiples neoplasias, entre ellas, próstata, útero, riñón, células escamosas de cabeza y cuello y linfoma (Fujimura *et al.*, 2000; Ino *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2009).

El sustrato más conocido de APA es la Angiotensina II, convirtiéndola en Angiotensina III, importante regulador de la presión arterial (Marchio *et al.*, 2004; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007). APA regula el sistema renina angiotensina (SRA) intrarrenal y es uno de los péptidos efectores principales del SRA cerebral, ejerciendo un efecto tónico estimulante sobre el control de la presión arterial, gracias a lo cual se han establecido líneas de investigación en la búsqueda de fármacos antihipertensivos por bloqueo de esta peptidasa (Bodineau *et al.*, 2008).

Se han encontrado componentes del SRA en testículos, epidídimo, conductos deferentes, próstata y semen, aunque sus funciones son todavía inciertas. Existen pruebas sobre su participación en la contractilidad tubular, la espermatogénesis, capacitación, exocitosis acromal y fertilización (Leung y Sernia, 2003). También se está investigando su rol en la patogénesis de la preeclampsia (enfermedad hipertensiva del embarazo), buscando drogas que controlen la actividad vasoactiva de los péptidos sin atravesar la placenta (Mitsui *et al.*, 2004). Nuestro grupo investigador ha propuesto recientemente que el sistema renina angiotensina local espermático podría estar involucrado en las modificaciones que se producen (causa o efecto) en los casos de fragmentación

espermática (Aparicio, 2018; Aparicio *et al.*, 2018a).

CYS-AP (CISTIL-AMINOPEPTIDASA – EC 3.4.11.3)

Sialoglicoproteína de la familia M1 de las metalopeptidasas (al igual que la APN, PSA, APB y APA). Como proteína soluble ha sido descrita hace más de 50 años en el suero de la embarazadas; ha sido posteriormente cuando se descubrió su presencia como proteína de transmembrana tipo II, no solo en placenta, sino también en 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; Demaegdt *et al.*, 2004).

Su forma transmembrana se compone de un dominio citoplasmático, uno transmembrana pequeño y un dominio en la cara externa de la célula de mayor tamaño (Rogi *et al.*, 1996; Laustsen *et al.*, 1997). La Cys-AP en esta forma, se ha identificado como AT4, que une la angiotensina IV inhibiendo la actividad enzimática del receptor. La conversión en enzima sérico durante el embarazo se corresponde a su acción catalítica liberando el dominio carboxilo terminal (metaloproteasa) (Nomura *et al.*, 2005).

Presenta un amplio espectro de sustratos, tales como la oxitocina, vasopresina, somatostatina y angiotensina III, liberando una cisteína de sus extremos amino terminal (Sjoholm y Yman, 1967; Mitsui *et al.*, 2004). Es la única aminopeptidasa de membrana descrita como degradadora de oxitocina, por este motivo también se la llama oxitocinasa. Dependiendo de la identidad del siguiente aminoácido y de la longitud del péptido, también libera otros aminoácidos neutros y básicos (Nomura *et al.*, 2005).

El gen LNPEP que codifica este enzima se encuentra en el

cromosoma 5, y está constituido por 18 exones y 17 intrones. Su actividad resulta óptima a pH 7,4, y su peso molecular es de 160 kDa.

Es inhibida por agentes quelantes, como 1,10-fenantrolina, cationes divalentes, amastatina; y en menor medida por la bestatina y puromicina (Kandror *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2004).

Se conoce su papel en el mantenimiento de la homeostasis durante el embarazo (Rogi *et al.*, 1996), pero también se ha visto involucrada en múltiples procesos fisiopatológicos, cómo algunos procesos tumorales (Ito *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003). También está relacionada con el metabolismo de la insulina, ha sido descrito que dicha hormona regula los mecanismos de translocación de la Cys-AP (Sumitani *et al.*, 1997).

PEP (PROLIL ENDOPEPTIDASA- PROLIL OLIGOPEPTIDASA - EC 3.4.21.26)

Como la anterior, este enzima pertenece a la familia S9 del Clan SC. Principalmente es una peptidasa citosólica, que también se ha descrito como enzima de membrana y 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 Polgár, 2008).

Peptidasa monomérica de 75kDa, con una actividad óptima en torno a pH 7,5. Se puede incrementar su actividad con NaCl, potasio, fosfato e iones nitrato. Por el contrario es inhibida con Z-tio-prolina-tioprolinal (Gass y Khosla, 2007). El gen que la codifica, ubicado en brazo largo del cromosoma 6, se llama PREP (Goossens *et al.*, 1996a; Goossens *et al.*, 1996b).

Hidroliza los péptidos en el residuo prolina interno, de su extremo carboxilo unido al péptido (Gass y Khosla, 2007). Inicialmente se descubrió cómo enzima degradadora de la oxitocina en útero (Walter

et al., 1971), aunque en la actualidad conocemos su acción sobre otros péptidos bioactivos. En sustancias como la sustancia P, vasopresina, neurotensinas, angiotensinas I y II, dinorfinas, bradiquininas, TRH, hormona liberadora de hormona luteinizante y hormona liberadora de alfa-melanocitos; rompe específicamente la unión prolina (Welches *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007; Myohanen *et al.*, 2009). PEP no es capaz de hidrolizar moléculas de mayor tamaño, por lo que su especificidad también viene determinada por el peso molecular (Polgár, 2002).

La encontramos ampliamente distribuida por todo el organismo, localizándola principalmente en cerebro, músculo, testículo, riñón y glándula submaxilar (Goossens *et al.*, 1996a; Gass y Khosla, 2007; Myohanen *et al.*, 2009). Sus funciones tienen que ver con el metabolismo de las sustancias anteriormente citadas, y su acción puede 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.*, 2003). Es por este motivo que encontramos múltiples estudios en los últimos años donde se están utilizando inhibidores de PEP para el tratamiento del Alzheimer y el Parkinson, con prometedores resultados (Babkova *et al.*, 2017). En procesos reproductivos, la encontramos relacionada con la meiosis de los espermatoцитos, la diferenciación de las espermátidas y la motilidad espermática (Kimura *et al.*, 2002).

ASP-AP (ASPARTIL AMINOPEPTIDASA – EC 3.4.11.21)

Metalopeptidasa de la familia M18, con elevado peso molecular y en forma de oligómero, con 8 subunidades idénticas de 53 kDa cada una. La podríamos considerar como la principal peptidasa intracelular, puesto que constituye más del 0,1% de las proteínas

citosólicas solubles de varios tejidos. Aunque también encontramos descrita su actividad ligada a membrana (Ramírez-Expósito *et al.*, 2000; Varona *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2009).

Hidroliza el ácido glutámico o aspártico (preferentemente este último) del extremo amino terminal, preferentemente con aminoácidos neutros o hidrofóbicos en la siguiente posición. Única peptidasa de la familia M18 descrita en mamíferos, es codificada por el gen DNPEP que se localiza en el cromosoma 2. Su pH óptimo está alrededor de 7,5 (Wilk, 2004) y como en las otras metalopeptidasa, es inhibida por EDTA, 1,10-fenantrolina y DTT (Sanderink *et al.*, 1988; O'Cuinn, 1998); y activada por Ca²⁺.

Debido a su elevada concentración y amplia distribución, se sugiere que tiene un papel importante en el proceso final del metabolismo intracelular de péptidos y proteínas, de forma coordinada con el proteosoma y otras peptidasas (Wilk, Wilk y Magnusson, 1998, 2002). Aunque, basándonos en su intervención en el metabolismo de péptidos biológicamente activos como la Angiotensina II colescistoquinina-8 o neuropéptido-K, se cree que puede tener otras funciones más especializadas (Kelly *et al.*, 1983; Wilk *et al.*, 1998).

NEP (ENDOPEPTIDASA NEUTRA - EC 3.4.24.11)

Metalopeptidasa dependiente de Zn²⁺, representativa de la familia M13, se trata de un ectoenzima, de la familia de las proteínas de membrana II. Su acción se restringe a péptidos entre 40-50 aminoácidos de longitud, presentando una alta especificidad por el extremo N-terminal de los aminoácidos hidrofóbicos, especialmente leucina, metionina y fenilalanina (Kerr y Kenny, 1974).

Sus principales sustratos parecen ser la encefalinas,

taquicininas, sustancia P, endotelinas, bombesina y bradiquininas (McLellan *et al.*, 1988; Rogues y Beaumont, 1990).

El gen que se encarga de codificar NEP humana es el MME, localizado en el cromosoma 3 (q25.1-25.2). Gracias a su purificación y clonación se supo que esta proteína de membrana, posee un corto dominio citoplasmático, una región hidrofóbica transmembrana y su centro activo se encuentra en un largo dominio extracelular (Malfroy *et al.*, 1988). Normalmente aparece como un homodímero de membrana unido no covalentemente (Shimada *et al.*, 1996). Sus cadenas peptídicas, de 100kDa de peso cada uno, se encuentran ampliamente glicosiladas y posee cuatro residuos conservados de cisteína que parecen estar relacionados con el mantenimiento de la estructura y su actividad enzimática (Tam *et al.*, 1985). Además NEP es idéntica al cluster de diferenciación CD10 y a CALLA (marcador de linfocitos) (Letarte, 1988; Roques *et al.*, 1993).

La localizamos principalmente en los botones axonales de las neuronas, también en las dendritas neuronales, oligodendrocitos, astrocitos y células de Schwann (Matsas y Kenny, 1989; Marcel *et al.*, 1990; Kioussi *et al.*, 1992). Su distribución coincide con los receptores opioides (Waksman *et al.*, 1986).

Encontramos estudios recientes sobre la implicación de NEP y otras aminopeptidasas en la motilidad espermática. Así se ha encontrado un inhibidor endógeno de NEP en plasma seminal; por este motivo es de especial importancia entender su implicación en fertilidad y poder llegar a desarrollar fármacos que mejoren la fertilidad (Bosler *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

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 mediante el ensayo de su degradación por acción de diversas peptidasas específicas. Los primeros estudios analizaron el metabolismo de los neuropéptidos en diversos 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, llegaron 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, 1999a, 2000; Irazusta *et al.*, 2002, 2004; Agirregoitia *et al.*, 2003, 2012; Valdivia *et al.*, 2004; Subirán *et al.*, 2008, 2012; Pérez *et al.*, 2009; Blanco, 2010; Larrinaga *et al.*, 2011a, 2012; Ramon, 2011; Roméu *et al.*, 2011, 2012, 2013, 2014; Peralta, 2012; Muñoa *et al.*, 2015; Estomba *et al.*, 2016).

La gran mayoría de los trabajos que estudian la influencia de la

actividad peptidásica en la fertilidad humana publicados hasta la fecha 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; Subiran *et al.*, 2011; Muñoa *et al.*, 2015; Estomba *et al.*, 2016; Aparicio *et al.*, 2018a, 2018b). No obstante, existe un gran desconocimiento sobre el papel que juegan las peptidasas en el aparato reproductor femenino. Solo un estudio previo, realizado por la Dra. Carolina Romeu Périz (Roméu, 2014; Roméu *et al.*, 2018a), analizó los niveles enzimáticos en líquido folicular a diferentes edades de la mujer y con diversas patologías. En este trabajo trataremos de aportar más claridad a dicho punto, ya que describiremos y analizaremos la actividad peptídica en el líquido folicular de mujeres sometidas a fecundación *in vitro*, pero midiendo las actividades en tres líquidos foliculares diferentes y comparando con los resultados clínicos; ya que recientemente se ha descrito (López *et al.*, 2014), que la composición de los LF de distintas punciones en la misma paciente pueden tener metabolismos (niveles bioquímicos) diferentes. Además, encontramos autores (Revelli *et al.*, 2009) que plantean la necesidad de que cada folículo individual debe ser aspirado también individualmente con el fin de poder correlacionar el contenido folicular con la calidad ovocitaria, y todo ello a pesar de los problemas que ello puede causar tanto al Facultativo como a la paciente.

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.

Entonces, los objetivos específicos del presente trabajo serían:

- 1) Describir nuestros resultados clínicos y compararlo con los publicados en el Registro Nacional de la SEF.
- 2) Comprobar si existen diferencias en el metabolismo peptídico dependiendo del líquido folicular extraído (1^o, 2^o y 3^o).
- 3) Comprobar si la presencia o ausencia de ovocito en el líquido folicular podría estar relacionada con la actividad enzimática reguladora (o al revés).
- 4) Describir, y en su caso corroborar, si el metabolismo peptídico se modifica con la edad de manera similar (o no) dependiendo de la extracción.
- 5) Describir, y en su caso corroborar, si el metabolismo peptídico está alterado en los líquidos foliculares de mujeres afectas de endometriosis.
- 6) Describir si el metabolismo peptídico es diferente en el caso de que el ovocito consiga fecundarse del que no.
- 7) En el caso de conseguir gestación, describir si existen diferencias en el metabolismo peptídico entre los ovocitos fecundados.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

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

1.1. APARATOS

- * Centrífuga Mixtasel-BL, JP. Selecta S.A., Barcelona
- * Cabina de flujo laminar K-System L-124
- * Estereomicroscopio (Lupa) Nikon Eclipse E200
- * Incubador Heracell 150, Heraeus
- * Incubador Labotect C16
- * Refrigerífico Balay
- * Equipo de micromanipulación Nikon Eclipse TE 2000-S + Microinyector y micromanipulador Narishige.
- * Ultracongelador MDF-U5 186 S, -86 °C. Sanyo
- * Ultracentrífuga Centrikon T2190. Kontron
- * Estufa Hotcold S, 37 °C. Selecta
- * Espectrofluorímetro RF-540. Shimadzu
- * pH-metro Micro-pH 2002. Crison ó GLP21
- * Mezclador magnético termoestable Agimatic-s. Selecta
- * Homogeneizador Ultraturrax Miccra D1. ART
- * Rotor de ángulo fijo TFT 45.6. Kontron
- * Balanza de precisión R180D. Sartorius

1.2. SOLUCIONES:

* **Tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 7,4)** = 1000 ml H₂O + 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 H₂O + 27,6 g NaH₂PO₄ 0,2 M

Fosfato B 1000 ml H₂O + 28,4 g Na₂HPO₄ 0,2 M

* **Tampón Acetato 0,1 M (pH 4,2)** = 36,8 ml A + 13,2 ml B + 50 H₂O

Acetato A 1000 ml H₂O + 11,55 ml CH₃COOH 0,2 M

Acetato B 1000 ml H₂O + 27,22 g CH₃COONa 3H₂O 0,2 M

1.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- | | |
|--|--|
| * Cys-β-naftilamida | monobásico monohidrato |
| * pGlu-β-naftilamida | (Na ₂ HPO ₄) |
| * Glu-β-naftilamida | * Cloruro sódico (NaCl) |
| * H-Gly-Pro-β-naftilamida | * Ala-β-naftilamida |
| * Z-Gly-Pro-β-naftilamida | * Arg-β-naftilamida |
| * Ácido Etilen-diamino | * Asp-AP-β-naftilamida |
| tetracético (EDTA) | * Ácido piroglutámico- β- |
| * Cloruro de Manganeso | naftilamida |
| (MnCl ₂) | * Seroalbúmina |
| * Acetato sódico trihidratado | bovina(BSA) |
| (CH ₃ -COONa 3H ₂ O) | * Dimetil-sulfóxido (DMSO) |
| * Fosfato sódico dibásico | * DL-ditiotreitrol (DTT) |
| (NaH ₂ PO ₄) | * Cloruro cálcico (CaCl ₂) |
| * Fosfato sódico | * Puromicina |

* Tris (hidroximetil)
aminometano (Tris-base)

* Ácido acético (CH₃COOH)
* Ácido clorhídrico (HCl)

2. METODOLOGÍA

2.1 BASES DE DATOS

Para el correspondiente tratamiento de los resultados, se registraron todos los datos en varias tablas de Excel; en la Tabla 2, se pueden visualizar los datos utilizados en el análisis peptídico; en la Tabla 3 se recogieron datos clínicos sobre la estimulación, cuyos resultados serán expuestos en el apartado de resultados clínicos.

BASES DE DATOS													EMBARAZO	NO UTILIZADO	
Nº SPSS	Nº	Fecha	PATOLOGÍA	EDAD	LUIDOS FOLICULARES			FECUNDADOS			D+3-D+5			EMBARAZO	
					1	2	3	1	2	3	1	2	3		
2	1	3/12/14	-	38 años	0										
3	2	18/1/15	-	37 años	0	0	0								
13	3	10/2/15	-	35 años	0	MII	MII		NO	SI			BI	SI(2)	
15	4	11/2/15	-	34 años	0	0	0								
23	5	25/3/15	-	38 años	MII	0	MII	SI		SI	Mórula		BI	No	
26	6	16/4/15	-	33 años	0	MII	MII		SI	SI		A	B	No	
28	7	27/4/15	-	33 años	MII	MII	MII	SI	SI	NO	A	BI		SI(1)	pte@transfer
4	8	18/1/15	39	39 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI	A	A	B	No	
18	9	22/2/15	39	41 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI	Mórula	Mórula	BI	No	
21	10	12/3/15	39	40 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI		BI	A	SI(2)	
25	11	30/3/15	39	42 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI	BI	Mórula	BI	No	
1	12	3/12/14	donante	19 años	0	0	0								
5	13	19/1/15	donante	26 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI	A(2)	A(2)	A	SI(2)	
7	14	25/1/15	donante	32 años	0	0	0								
8	15	25/1/15	donante	30 años	0	0	0								
10	16	2/2/15	donante	30 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI		BI	BI	SI(2)	
12	17	8/2/15	donante	25 años	0					SI			A	No	
16	18	12/2/15	donante	23 años	MII	0		SI			D				
17	19	18/2/15	donante	27 años	0	0	0						BI	No	
19	20	25/2/15	donante	23 años	MII	MII	MII	SI	SI	SI	A	Mórula	BI	SI(3)	
20	21	4/3/15	donante	30 años	0	MII	MII		SI	SI		BI	BI	No	
22	22	22/3/15	donante	31 años	MII	0	0	SI			Mórula				
24	23	30/3/15	donante	24 años	MII	MII	0	SI	SI		A	BI		SI(1)	noGESTAC
27	24	25/4/15	donante	25 años	MII	MII	0	SI	SI		BL	Mórula		pte@transfe	
6	25	22/1/15	endometriosis	39 años	MII	MII	0	SI	SI		D	A		No	
9	26	27/1/15	endometriosis	31 años	MII	VG	0	SI			C			No	
11	27	5/2/15	endometriosis	34 años	MII	MII	MII	NO	SI	SI		BI		SI	
29	28	30/4/15	endometriosis	37 años	MII	0	MII	SI		SI(3PN)	BI			NO	
30	29	7/5/15	endometriosis	36 años	0	0	MII								

TABLA 2. Base de datos sobre pacientes y variables estudiadas en análisis peptídico.

Además del análisis del metabolismo peptídico, comentar que hemos analizado diversas variables clínico-farmacológicas, que se recogieron en la siguiente tabla.

						HETEROG	>39	DONANTES	ENDOMETRIOSIS
SPSS	Nº	FECHA	EDAD	MEDIC	ANTAG	D INIC	D TOTAL	DÍAS ESTIM	TRIGGER
2	1	3/12/14	38	menopur	orgalutran	225	1800	8	ovit
3	2	18/1/15	37	puregon	cetrotide	150	1500	10	decapept
13	3	10/2/15	35	gonal-f	orgalutran	225	1575	7	ovit
15	4	11/2/15	34	menopur	orgalutran	250	2500	10	ovit
23	5	25/3/15	38	menopur	cetrotide	300	3000	10	ovit
26	6	16/4/15	33	gonal-f	orgalutran	225	2250	10	ovit
28	7	27/4/15	33	puregon	cetrotide	225	2025	9	ovit
4	8	18/1/15	39	menopur	orgalutran	225	2475	11	ovit
18	9	22/2/15	41	menopur	orgalutran	300	1950	7	ovit
21	10	12/3/15	40	menopur	orgalutran	300	2700	8	ovit
25	11	30/3/15	42	gonal-f	orgalutran	225	2250	10	ovit
1	12	3/12/14	19	gonal-f	orgalutran	150	1800	12	decapept
5	13	19/1/15	26	gonal-f	orgalutran	200	1600	8	decapept
7	14	25/1/15	32	gonal-f	orgalutran	150	1350	9	ovit
8	15	25/1/15	30	gonal-f	cetrotide	200	1800	9	decapept
10	16	2/2/15	30	gonal-f	orgalutran	150	1350	9	ovit
12	17	8/2/15	25	gonal-f	orgalutran	200	2000	10	ovit
16	18	12/2/15	23	gonal-f	orgalutran	200	2400	12	ovit
17	19	18/2/15	27	gonal-f	orgalutran	150	1800	12	decapept
19	20	25/2/15	23	gonal-f	cetrotide	225	2025	9	decapept
20	21	4/3/15	30	gonal-f	orgalutran	200	2050	11	decapept
22	22	22/3/15	31	gonal-f	cetrotide	225	2025	9	decapept
24	23	30/3/15	24	gonal-f	cetrotide	150	1350	9	decapept
27	24	25/4/15	25	gonal-f	orgalutran	150	1500	10	decapept
6	25	22/1/15	39	menopur	orgalutran	300	2700	9	ovit
9	26	27/1/15	31	menopur	orgalutran	200	1800	9	ovit
11	27	5/2/15	34	gonal-f	orgalutran	150	1500	10	ovit
29	28	30/4/15	37	menopur	orgalutran	300	3300	11	ovit
30	29	7/5/15	36	gonal + luv	cetrotide	300	3000	10	ovit

TABLA 3. Base de datos sobre los tratamientos de las pacientes.

2.2. TIPO DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Estudio prospectivo y observacional, las muestras proceden de pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida en la Clínica Ginecológica Juana Hernández de Logroño, en un periodo incluido desde diciembre 2014 hasta Junio 2015. Se incluyeron pacientes sometidas a FIV/ICSI y donación de ovocitos, siendo la franja de edad de 19-44 años. Antes de incluirla en el estudio la paciente es informada sobre el proyecto mediante una explicación

verbal y un consentimiento informado, que debe ser aceptado y firmado antes de proceder a la recogida de la muestra.

2.3 CONSENTIMIENTOS Y AUTORIZACIONES

Siendo las muestras obtenidas de pacientes voluntarias, se les presentó un formulario de consentimiento informado, donde se les explicaba el estudio que iba a llevarse a cabo (documento 1).

Dadas las implicaciones éticas relativas a los derechos de los pacientes, el proyecto al cual está asociado este trabajo fue previamente aprobado por el Comité Ético de Grupo Hospitalario Quirón Zaragoza a fecha de 1 de junio de 2008. Con esta fecha comenzaron los estudios relacionados con el metabolismo peptídico en líquido folicular, en todos los casos a propuesta y bajo la dirección/supervisión del Prof. Luis Casis Sáenz (documento 2).

Presentamos los siguientes modelos a continuación:

- **Documento 1.- Consentimiento informado**
- **Documento 2.- Comité ética Grupo Hospitalario Quirón Zaragoza.**



Muro de la Mata 12, 1º D. 26001 Logroño. Tl. 941 273077 / 626 3033905

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

NOMBRE PACIENTE:.....
NÚMERO DE HISTORIA:.....

El propósito de este documento es entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda decidir libremente si desea participar en la investigación que se le ha explicado verbalmente, y que a continuación se describe en forma resumida. Además de dejarle claro que no se aplicará ninguna técnica distinta a la utilizada habitualmente en uno 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 analizar 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.

Para cumplir este objetivo, recolectaremos líquido folicular obtenido tras la punción ovocitaria y tras la obtención de los ovocitos correspondientes, para posteriormente realizar un análisis bioquímico de éste en el departamento de Fisiología de la Universidad del País Vasco.

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.



clínica
ginecológica
juana
hernández

Muro de la Mata 12, 1º D. 26001 Logroño. Tl. 941 273077 / 626 3033905

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 Clínica ginecológica Juana Hernández a utilizar el líquido folicular obtenido tras la captación para su posterior análisis bioquímico y su final destrucción.

En Logroño a

Dña.	D.	Dra.
DNI	DNI	N.Colegiado
Fdo.	Fdo.	Fdo.

DOCUMENTO 1. Consentimiento informado Clínica Juana Hernández



**Informe Comisión de Ética, Investigación, Formación y Ensayos Clínicos y
Comisión de Historia Clínica, Documentación e Información.**

Reunido este Comité a propuesta del investigador **Luis Casis Sáenz**, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, para tratar sobre el proyecto *Metabolismo Peptídico en Líquido Folicular Humano*, que se llevará a cabo en colaboración con la **Unidad de Reproducción Asistida Hospital Quirón Zaragoza**.

CONSIDERA:

- Que la investigación propuesta presenta una justificación adecuada en cuanto a sus objetivos y fines, siendo mínimos los riesgos y molestias adicionales para los posibles sujetos implicados.
- Que la investigación presentada propone unos objetivos claros, con métodos científicos adecuados.
- Que la capacidad del equipo investigador es adecuada al proyecto, como demuestra el CV del Investigador Principal.
- Que la donación voluntaria de las muestras conllevará la firma de los Consentimientos Informados correspondientes, con información clara, concisa y suficiente a los pacientes.

**ESTE COMITÉ ELEVA UN INFORME FAVORABLE A DICHO PROYECTO
DE INVESTIGACIÓN**

Zaragoza a 1 de Junio de 2008.

Presidente Comisión.



DOCUMENTO 2. Aprobación comité de ética Grupo Quirón Zaragoza

2.3. GRUPOS DEL ESTUDIO

Se analizaron los líquidos foliculares obtenidos al final del proyecto (un total de 82 líquidos), distinguiendo entre 4 grupos, tuvimos un número total de 29 pacientes.

GRUPO A (CONTROL): se trata de donantes de óvulos; son mujeres sin problemas reproductivos, con edades comprendidas entre los 19-32 años. (N=36)

GRUPO B (ENDOMETRIOSIS): formado por pacientes con problemas de fertilidad, diagnosticadas de endometriosis. (N=15)

GRUPO C (EDAD AVANZADA): formado por pacientes mayores de 39 años. (N=12)

GRUPO D (EOD): grupo heterogéneo formado por pacientes con problemas de fertilidad sin causa aparente o por el momento encontrada. (N=19)

2.4. METODOLOGÍA DEL TRATAMIENTO DE FIV

Estimulación ovárica controlada - se utilizaron protocolos con antagonistas de la GnRH en todas las paciente, administrándose FSHr (hormona folículo estimulante recombinante) desde el segundo o tercer día del ciclo, pudiendo reajustar dosis según la respuesta y añadiendo el antagonista en el 6^o o 7^o día de estimulación, dependiendo de la respuesta. El crecimiento folicular se controlaba ecográficamente cada dos o tres días, siendo la última medición el día en que la mayoría de los folículos miden entre 18-20 mm; momento en el cual se pauta la descarga ovulatoria mediante gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG) o con un agonista de la GnRH (dependiendo de la respuesta). En donantes utilizamos siempre agonista puesto que de esta forma reducimos a

cero el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica; asimismo, en caso de respuesta mayor a 12 folículos procedimos de igual forma al caso anterior.

Punción ovocitaria - Se realizó a las 36 horas de la administración de la hCG, y consiste en puncionar el ovario vía vaginal con control ecográfico y aspirando el líquido folicular. En el laboratorio, el embriólogo se encargó de aislar los óvulos del líquido folicular y depositarlo en su placa de incubación, para luego colocarlo en el incubador. El líquido folicular a estudio es criopreservado, almacenándolo hasta el momento del ensayo. En la fase lútea complementamos con progesterona micronizada.

Fecundación y clasificación embrionaria - Según las características reproductivas de la pareja se realizó FIV-convencional o ICSI, previa capacitación espermática.

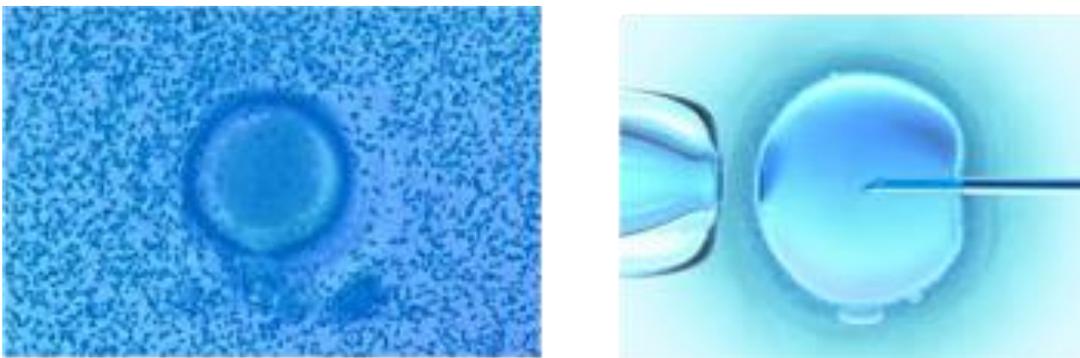


FIGURA 8. FIV-Convencional. ICSI.

Al día siguiente de la fecundación determinamos los óvulos que se fecundaron correctamente y en los días sucesivos se valoró su evolución y calidad.

Transferencia embrionaria - Dependiendo de la cantidad y calidad embrionaria se decide transferir el o los embriones en D+3 o D+5. Se transfirieron como máximo dos embriones en función de la edad materna, tipo y tiempo de esterilidad, calidad embrionaria y

fracasos anteriores. Los embriones restantes se vitrificaron. Mediante una cánula de transferencia introducida por el cérvix uterino y mediante control ecográfico se depositaron los embriones aproximadamente a una distancia de 1,5 centímetros del fondo del útero.

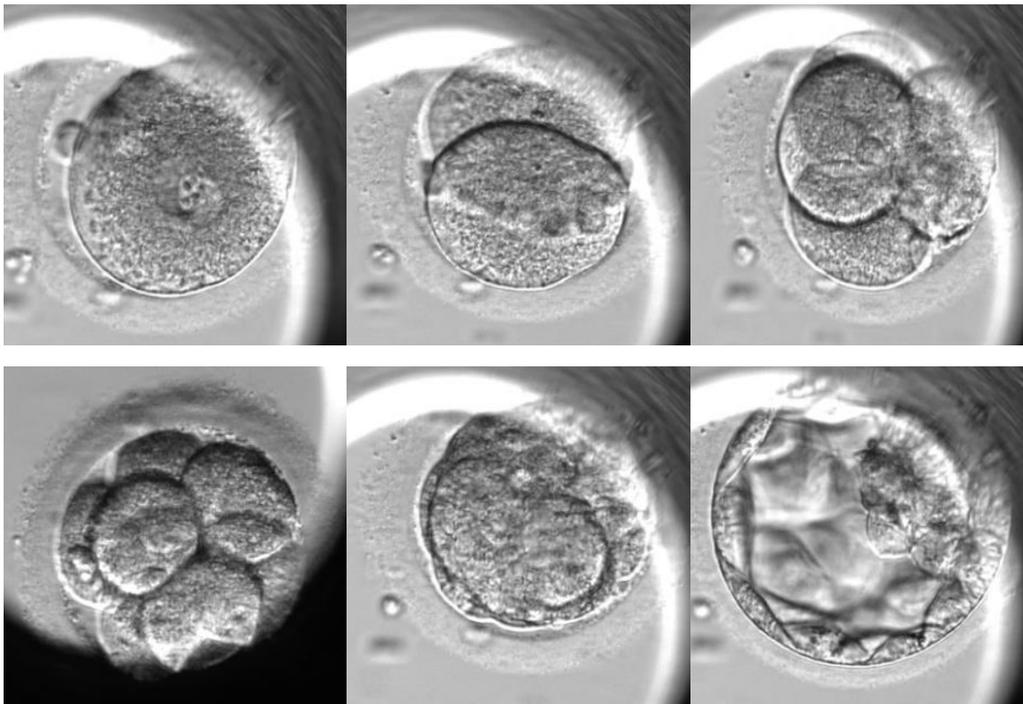


FIGURA 9. Desarrollo embrionario

Test de embarazo - A los 12-14 días de la transferencia se le realiza a la paciente una determinación de β -hCG (subunidad beta de la hormona gonadotrofina coriónica humana) sérica, verificando así la posible gestación.

2.5. MUESTRAS DE LÍQUIDO FOLICULAR

Durante la punción ovárica, se escogen 3 folículos aleatoriamente, aspirando cada uno de ellos independientemente y marcándolos debidamente. Éstos aspirados fueron transportados al laboratorio de embriología para comprobar la presencia de los óvulos en los líquidos foliculares. Los ovocitos recuperados son guardados en su incubadora correspondiente y los líquidos foliculares aislados y almacenados en un congelador (-80 °C) hasta la obtención del número total de pacientes.

Para su procesamiento los líquidos foliculares 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. Posteriormente retirando previamente el sobrenadante, se realizó la determinación de las actividades enzimáticas específicas sobre las muestras. En aquellos en los que hubo contaminación sanguínea fueron desechados del estudio y las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de incubarlas.

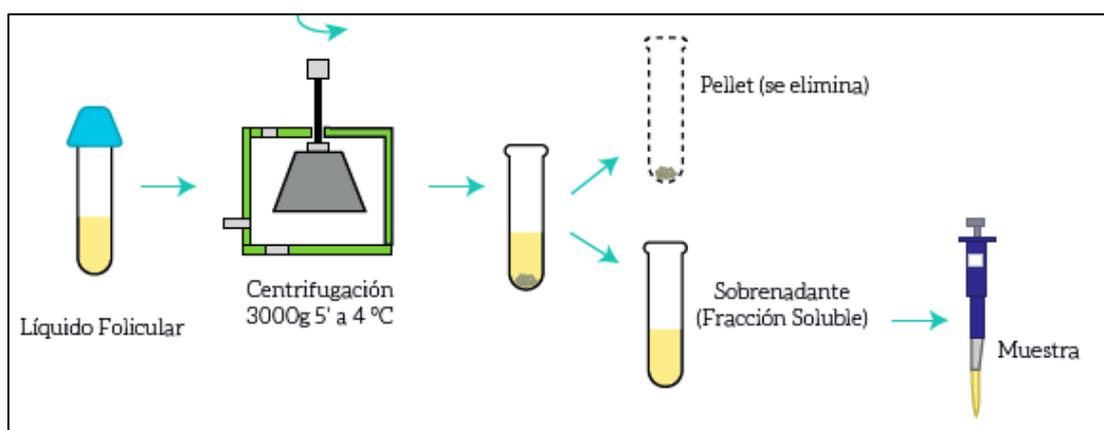


FIGURA 10. Esquema del procesado de muestra folicular (Romeu, 2014)

2.6. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PEPTIDÁSICA EN LÍQUIDO FOLICULAR

2.6.1. 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. 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.

2.6.2. ENSAYO ENZIMÁTICO

Para analizar la actividad peptidásica de Aminopeptidasa Sensible a Puromicina (PSA), Aminopeptidasa Neutra (APN), Aminopeptidasa Básica (APB), Aminopeptidasa Ácida (Glu-AP o APA), Cistina Aminopeptidasa (Cys-AP), Aspartil-aminopeptidasa

(Asp-AP), Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV) y Prolil Endopeptidasa (PEP) se usarán sustratos del tipo peptidil- β -naftilamida o aminoacil- β -naftilamida; concretamente, los sustratos utilizados fueron Ala- β -naftilamida; H-Gly-Pro- β -naftilamida; H-Glu- β -naftilamida; Arg- β -naftilamida; Asp- β -naftilamida y Z-Gly-Pro- β -naftilamina respectivamente. Para la determinación de la Endopeptidasa Neutra (NEP) se empleó un ensayo fluorométrico también, pero en este caso el sustrato fue el N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly (DAGNPG).

Como apreciamos en la figura 10, la presencia de aminopeptidasas hace que la aminoacil-beta-naftilamida se rompa, liberando aminoácidos libres y moléculas de beta-naftilamina. Ésta molécula es fluorescente cuando es excitada con luz de 345 nm, emitiendo parte de esta energía en una longitud de onda de 412 nm, siendo fácilmente medida por un espectrofluorímetro. Será en función de la concentración del enzima en la muestra, lo que determinará la cantidad de producto fluorescente liberado, por lo que podremos extrapolarlo a la concentración de la aminopeptidasa estudiada.

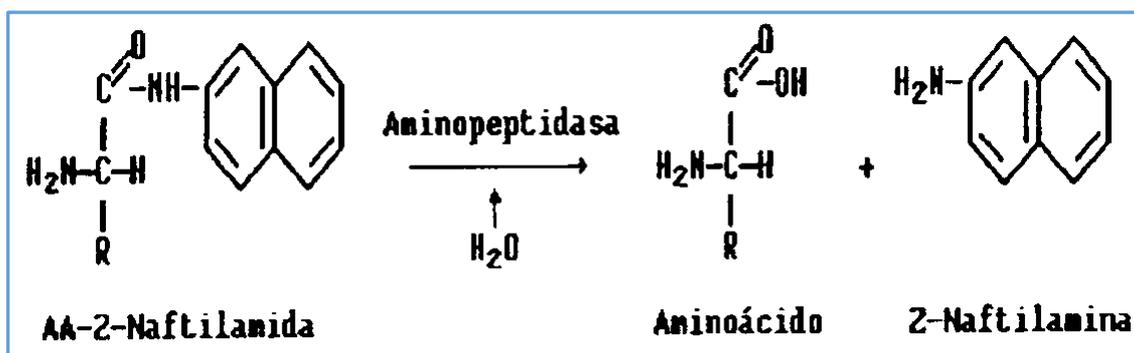


FIGURA 11 - Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, β -naftilamina, emite fluorescencia a 412nm cuando es excitado a 345nm.

Cómo hemos explicado en la introducción, la NEP es una peptidasa de membrana que degrada encefalinas por ruptura del enlace Gly³-Phe⁴. Para determinar su actividad, utilizaremos el sustrato artificial fluorogénico DAGNPG (N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly). En este caso se añadió 1 ml de sustrato a 10 µl de muestra, y será la presencia de NEP la que produzca la ruptura del enlace nitro-fenil en la secuencia peptídica (Figura 11). Será entonces cuando el péptido N-Dansyl-D-Ala-Gly (DAG) es liberado, produciéndose un aumento de la fluorescencia cuando es excitado con una longitud de onda de 342nm, emitiendo a una longitud de 562nm.

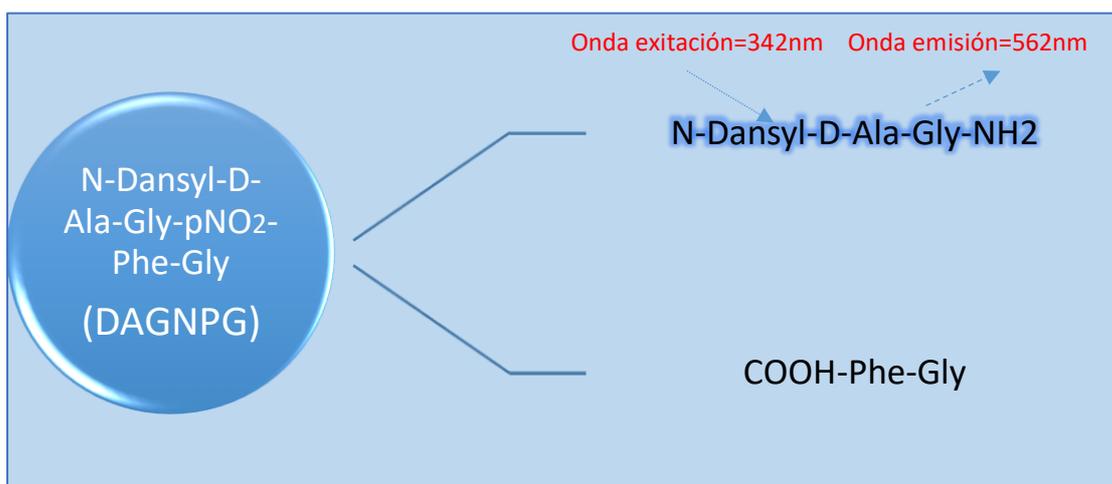


FIGURA 12. Esquema de la hidrólisis del sustrato de NEP en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, Dansyl-D-Ala-Gly, emite fluorescencia a 562 nm cuando es excitado a 342 nm.

Dicha propiedad permite que el dansil liberado pueda ser medido muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está controlado por la concentración del enzima en la muestra, de manera que el DAG detectado fluorimétricamente puede ser extrapolado a concentración endopeptidasa neutra en el tejido estudiado.

La reacción se inicia al añadir 1 ml de sustrato artificial

fluorogénico (Tabla 4) sobre la muestra (10 µl de muestra en cada caso) y una vez mezclada, se deja que la reacción transcurra durante 30 min a 37°C (Hotcold S). La reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de tampón acetato 0,1 M a pH 4,2. La actividad enzimática de las peptidasas se determina por métodos espectrofluorimétricos, para lo que empleamos un fluorímetro RF-540 de Shimadzu.

En todos los casos se incluirán controles con extracto enzimático y sustrato, en presencia de ácido acético a fin de que no sea posible la reacción. Los valores se determinarán empleando como blanco tubos que contengan tampón Tris-HCl.

(I)	Sustrato	mM	pH	DTT (mM)	EDTA (mM)	CaCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	Purocina (µM)
PEP	Z-Gly-Pro-β-NA	0,125	7,4	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	-	-	-
NEP	N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO ₂ -Phe-Gly	0,125	7,4	-	-	-

TABLA 4. 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, Sassi y Roques, 1984; Alba *et al.*, 1989; Mantle *et al.*, 1990; Silveira *et al.*, 2001).

Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se calculó la media y el error estándar. Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente se transformaron 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 serán 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) (UP/ L muestra). En los casos en que no se obtuvieron resultados fluorométricos, las muestras fueron desechadas y no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis descriptivos de todas las variables por separado, mediante tablas de frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables cualitativas, y mediante los estadísticos media y desviación estándar en el caso de variables cuantitativas continuas. Queremos agradecer aquí la colaboración de D. Enrique Ramalle Gomara, Jefe de Sección de Información Sanitaria del Servicio de Epidemiología y Prevención Sanitaria de la Rioja.

Para las variables cuantitativas se empleó la comparación de medias mediante la t de Student-Fisher para grupos independientes, excepto cuando la prueba de Shapiro-Wilk para la comprobación del supuesto de normalidad daba un resultado estadísticamente significativo. En este caso se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitey. En la comparación de más de dos medias para evaluar si existían diferencias en las actividades peptídicas en las diferentes

extracciones se empleó el análisis de la varianza para medidas repetidas, con un ajuste de Sidak para comparaciones múltiples.

Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales, considerando como nivel de confianza el 95%. Los cálculos se hicieron con ayuda de los programas SPSS 21.0 y R Commander 3.3.3.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. RESULTADOS CLÍNICOS

En este apartado comparamos diferentes parámetros clínicos, en la primera parte recogemos las diferencias entre las tres extracciones que se realizaron por paciente, en nuestro trabajo; la obtención de ovocito comparando diferentes parámetros y por último los datos de la estimulación en los diferentes grupos de estudio.

Se analizan una serie de variables cómo son la tasa de fecundación y la tasa de embarazo dependiendo de los diferentes grupos; se analizan también los días de estimulación, la edad de cada grupo, la dosis de gonadotropinas y otros parámetros.

1.1. VARIABLES DE LABORATORIO

De un total de 29 pacientes, se obtuvieron resultados en 82 líquidos foliculares, con la distribución siguiente: 13 donantes (36LF), 5 endometriosis (15LF), 7 EOD (19LF) y 4 mayores de 39 años (12LF).

Comparando extracciones, obtuvimos un porcentaje de ovocitos muy similar en las tres extracciones. El número de ovocitos obtenidos en la primera extracción fueron de 17 (de 29 LF), mientras que en la segunda y tercera fueron 15 ovocitos (de 27 y 26 LF), respectivamente (Gráfica 1).

Cómo vemos representado en la gráfica 2, los porcentajes de LF con ovocito fueron muy similares en las tres extracciones, siendo su porcentaje por extracciones del 58% en la primera, 55% en la

segunda y 57% en la tercera extracción (Gráfica 2). En total se obtuvieron ovocitos en el 57,3% del total de LF.



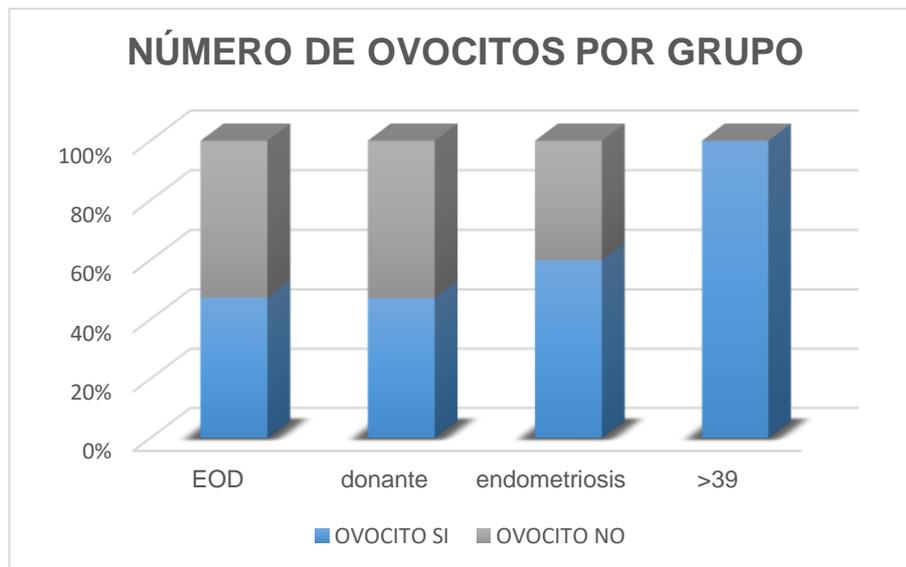
GRÁFICA 1.- Representación del número de ovocitos por extracción.



GRÁFICA 2.- Representación del porcentaje de ovocitos por LF en las diferentes extracciones.

En la gráfica 3 y tabla 5 podemos observar el porcentaje de ovocitos que se obtuvieron dependiendo de los grupos del estudio. En el grupo heterogéneo de EOD obtuvimos ovocitos en el 47% de

los LF, al igual que en el grupo de donantes, en el de endometriosis fue del 60% mientras que en el de mayores de 39 años obtuvimos ovocitos en todos los líquidos foliculares.

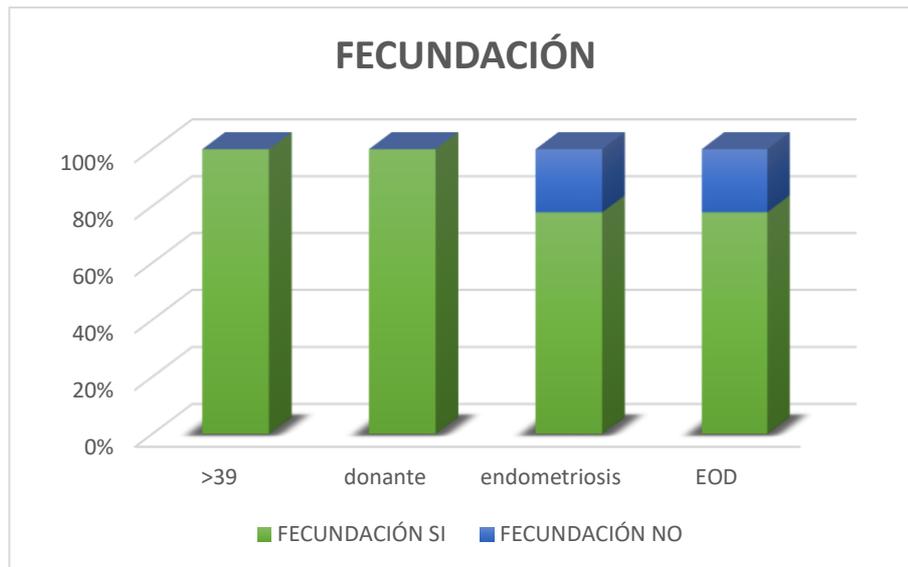


GRÁFICA 3.- Representación del porcentaje de ovocitos en líquido folicular por grupo de estudio.

	NºLF sin ovocito	NºLF con ovocitos	TOTAL LF	%LF con Ovocito
EOD	10	9	19	47%
donante	19	17	36	47%
endometriosis	6	19	15	60%
>39	0	12	12	100%
TOTAL	35	47	82	57%

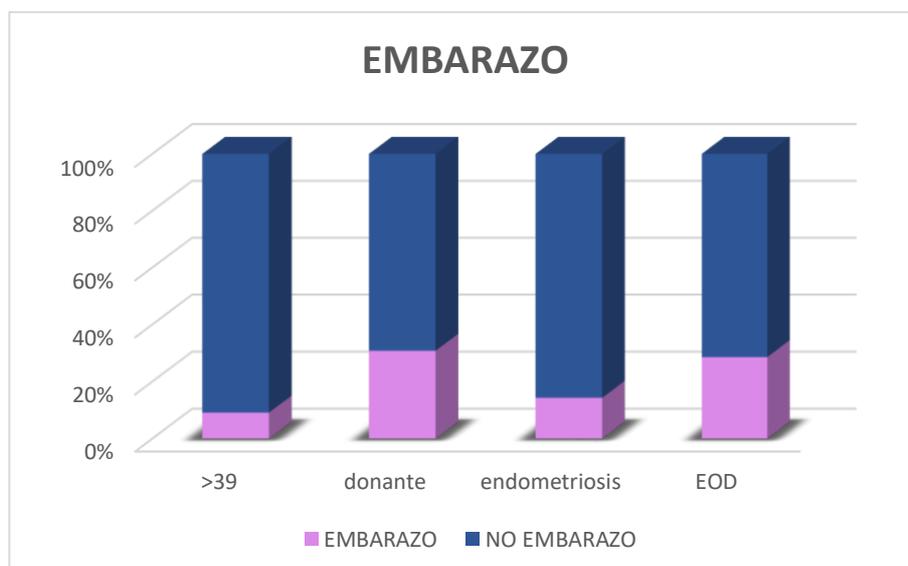
TABLA 5.- Número y porcentaje de ovocitos en líquido folicular de los grupos de estudio.

De los ovocitos obtenidos tuvimos un porcentaje de fecundación del 91,5%, siendo del 100% en mayores de 39 años y donantes; y del 78% en el grupo de endometriosis y EOD (Gráfica 4).



GRÁFICA 4.- Representación del porcentaje de ovocitos que fueron fecundados en cada grupo del estudio.

De los ovocitos fecundados, se obtuvieron embriones que fueron transferidos y la tasa de embarazo por embrión transferido fue del 20% en el total de nuestras pacientes. Por grupos se obtuvo una tasa de gestación del 14,3% en endometriosis, 8,3% de tasa de embarazo en las mayores de 39 años, 26,67% en las donantes y 33,3% en el grupo EOD (Gráfica 5).



GRÁFICA 5.- Representación del porcentaje de embarazo por grupo de estudio.

	Ovo SI	Fec SI	%Fecun	N Embarazos	%embarazo
>39	12	12	100%	1	8,33%
donante	17	17	100%	4	26,67%*
endometriosis	9	7	77,78%	1	14,29%
EOD	9	7	77,78%	2	33,3%*
TOTAL	48	43	91,49%	8	20%

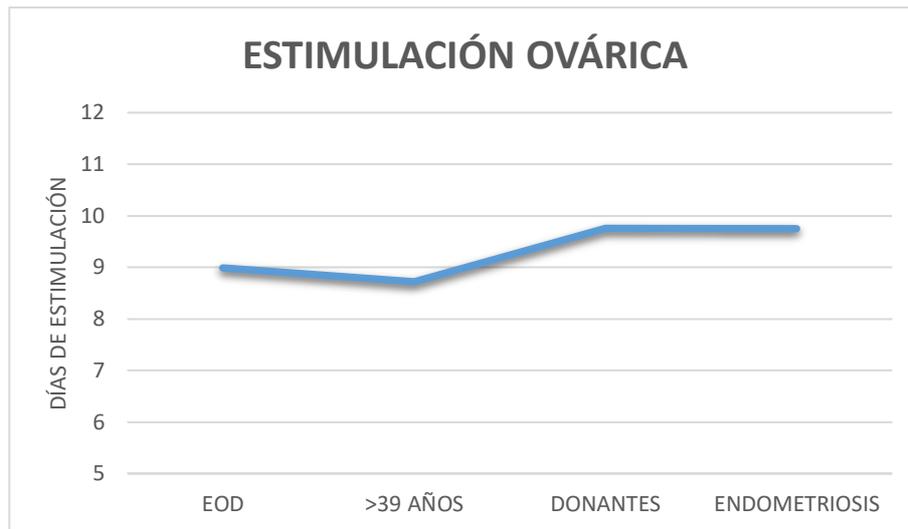
TABLA 6.- Número y porcentaje de fecundación y embarazo por grupo de estudio.

*No hemos tenido en cuenta dos embriones en donantes y uno en EOD que no fueron transferidos.

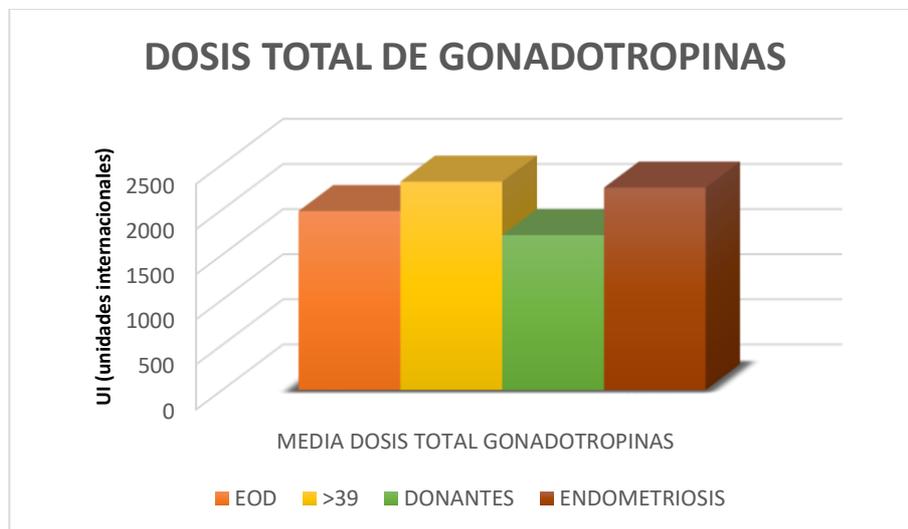
1.2. VARIABLES DE ESTIMULACIÓN

La estimulación ovárica fue similar en todas las pacientes, todos consistieron en ciclos de antagonistas, con dosis variables de gonadotropinas según el perfil de pacientes.

La media de días de estimulación en el total de pacientes fue de 9,41 días, con 7 días mínimo y 12 máximo. Se utilizó una dosis total media de 1925UI de gonadotropinas, el valor mínimo fue 1350UI en una donante y máximo de 3300UI en una paciente con endometriosis. A continuación podemos observar la gráfica N^o6 de media de días de estimulación en los diferentes grupos y la de dosis total utilizada de gonadotropinas.



GRÁFICA 6.- Representación de la media de días de estimulación por grupo de estudio.



GRÁFICA 7.- Representación de la media de dosis total de gonadotropinas utilizada por grupo de estudio.

En el grupo EOD la dosis media de inicio de gonadotropinas fue de 220UI, con una media de 9 días de estimulación y dosis total de unas 2000UI. La edad media de este grupo fue de 35 años y la medicación utilizada fue FSHr en 4 casos y HMG en los otros 3.

En el grupo de mujeres mayores de 39 años la dosis media de inicio de gonadotropinas fue de 257UI, con una media de 9 días de estimulación y dosis total de unas 2310UI. La edad media de este

grupo fue de 40,7 años y la medicación utilizada fue HMG en 3 de los cuatro casos y 1 de FSHr.

En el grupo endometriosis la dosis media de inicio de gonadotropinas fue de 230,7UI, con una media de 9,7 días de estimulación y dosis total de unas 2243UI. La edad media de este grupo fue de 35,1 años y la medicación utilizada fue HMG en 3 de los cuatro casos y 2 de FSHr.

En el grupo de donantes la dosis media de inicio de gonadotropinas fue de 175UI, con una media de 9,7 días de estimulación y dosis total de unas 1717UI. La edad media de este grupo fue de 26 años y la medicación utilizada fue de FSHr en todos los casos.

2. RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES PEPTIDÁSICAS

Cómo hemos explicado en Material y Métodos, para determinar la actividad enzimática de las diferentes peptidasas estudiadas en esta tesis se realizaron ensayos fluorimétricos.

Demostrar la presencia de APN, PSA, APB, APA, Asp-A, Cys-AP, DPPIV, PEP y NEP era uno de los objetivos, y otro era describir su actividad, comparando en diferentes extracciones foliculares de la misma paciente y valorar si su actividad varía en función de la presencia o no de ovocito.

También se analizó y comparó la actividad enzimática de los enzimas anteriormente citados en LF de pacientes con diferentes patologías (endometriosis, mayores de 39 años y EOD).

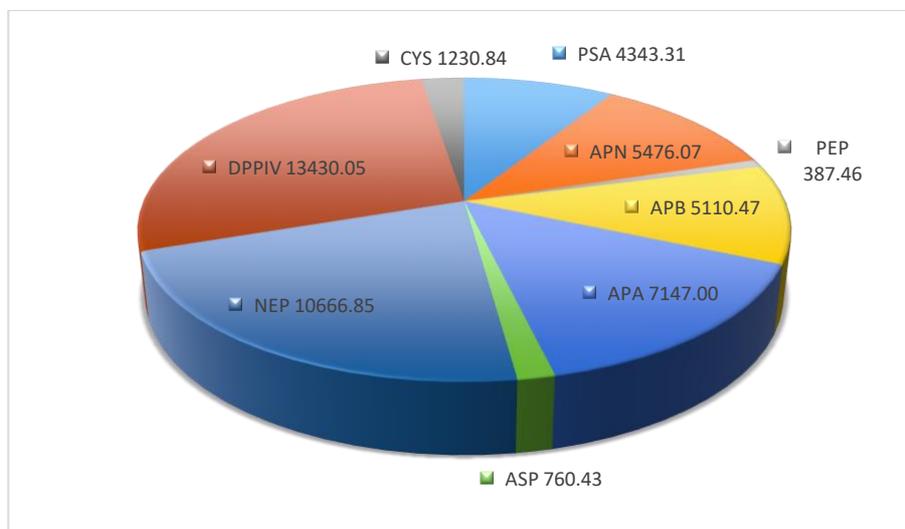
Finalmente se buscó si la actividad enzimática era diferente en los líquidos de ovocitos que consiguieron fecundarse y en los que se consiguió gestación.

2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF

El grupo donantes que actúa como grupo control se compuso de 36 LF; la edad media de este grupo fueron los 26 años; y ninguna de ellas presentaba ningún problema reproductivo.

Detectamos actividad para los 9 enzimas estudiados en todos los líquidos, siendo los enzimas de mayor actividad DPPIV, NEP, APA, APN, APB y PSA.

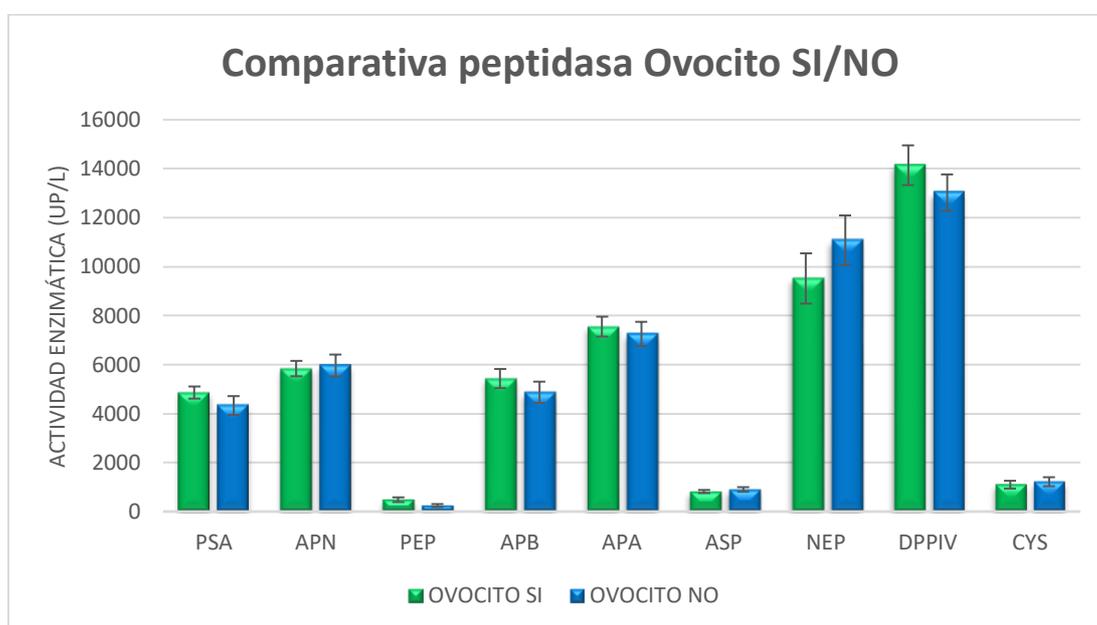
En este grupo, las actividades enzimáticas de NEP y DPPIV son claramente superiores al resto; y APB y APN son prácticamente idénticas. Como se presentará más adelante, DPPIV es la que presenta más actividad en todos los grupos, en cambio con las otras peptidasas encontramos diferencias que se comentarán en los siguientes apartados.



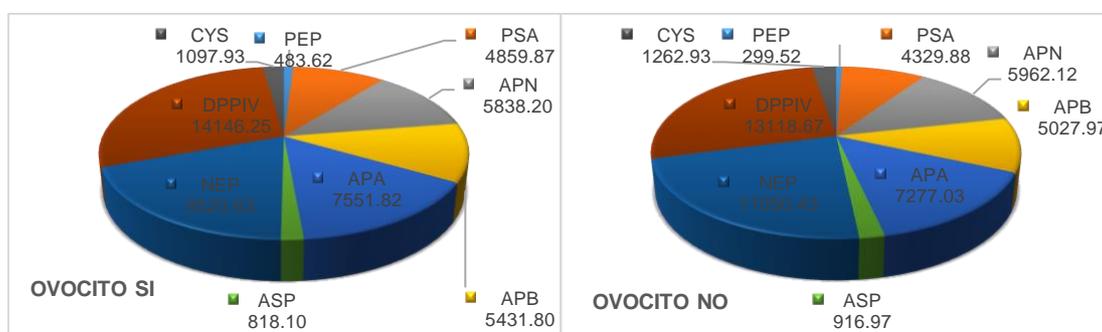
GRÁFICA 8.- Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del LF de mujeres pertenecientes al grupo de donantes. Se representa la media de cada enzima (N=36), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

2.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN PRESENCIA O NO DE OVOCITO

En las siguientes figuras se representan las actividades enzimáticas de las nueve peptidasas estudiadas según la presencia o no de ovocito. Como se puede observar, la actividad de cada peptidasa fue muy similar en todos los LF, tanto los que tenían ovocitos como los que no. Nuevamente, la actividad enzimática más elevada la registró DPPIV, seguida de NEP, en ambos grupos.



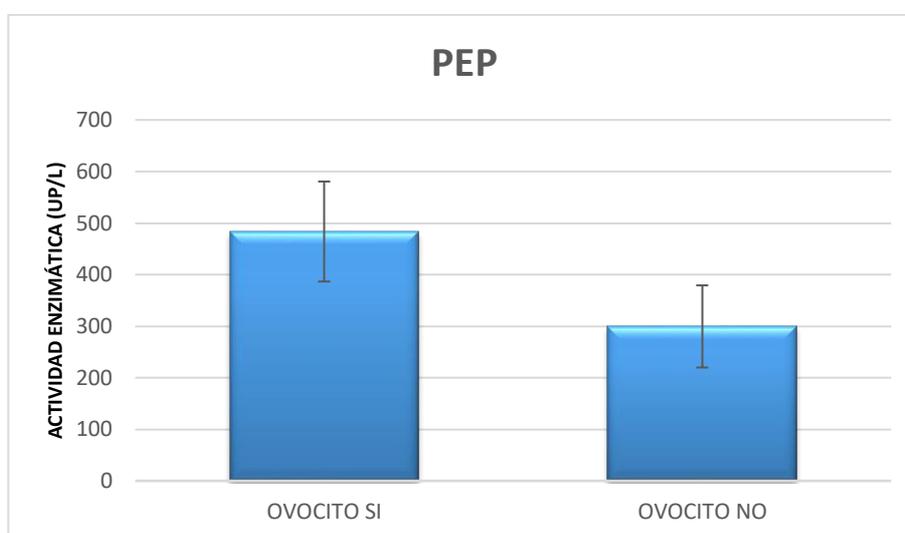
GRÁFICA 9 .- Comparativa de actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del LF según la obtención o no de ovocito.



GRÁFICA 10.- Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del LF dependiendo de la obtención o no de ovocito. Se representa la media de cada enzima (ANEXO I), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

2.2.1. ACTIVIDAD PEP SEGÚN LA PRESENCIA O NO DE OVOCITO

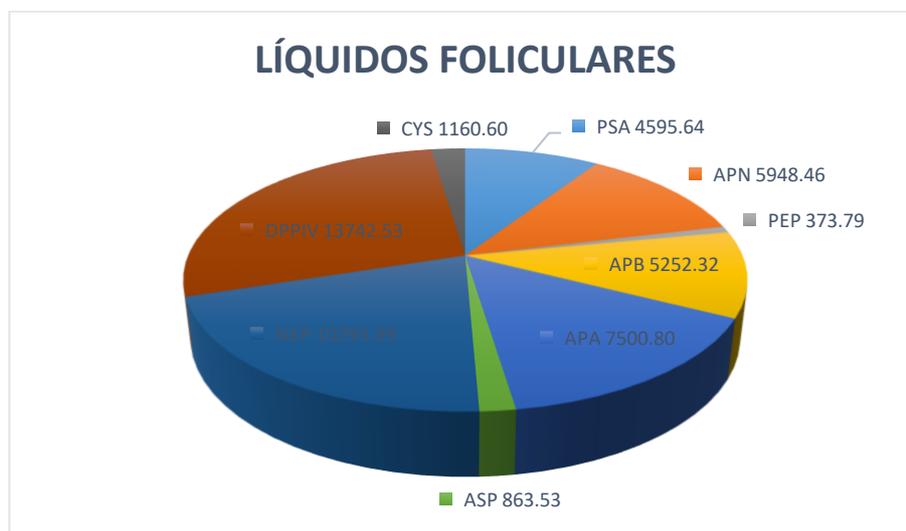
Únicamente se observó una diferencia de actividad según presencia o no de ovocito en la PEP (Gráfica 11). Se observó aproximadamente el doble de actividad en aquellos líquidos en los que se obtuvo ovocito de los que no, aunque la significación estadística no llegó a $p < 0,05$ (fue de 0,073).



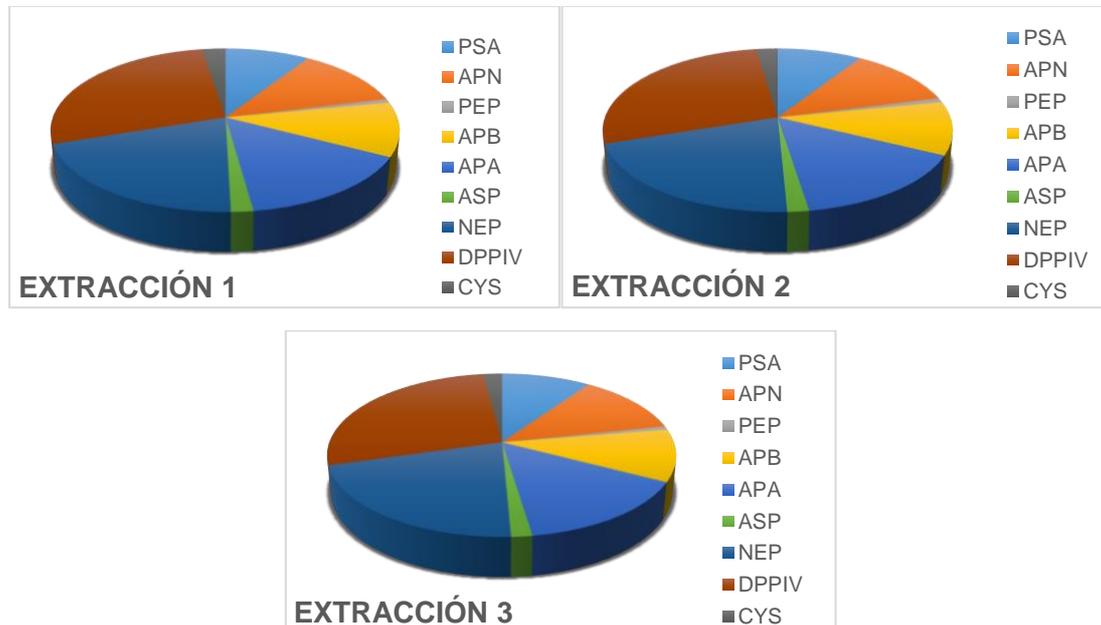
GRÁFICA 11.- Actividad enzimática de PEP en la fracción soluble de LF de todas las pacientes, teniendo en cuenta la presencia o no de ovocito. Actividad enzimática expresada en UP. Se representa la media de los dos grupos (Ovocito SI - N=16; Ovocito NO – N=21). Se analizó estadísticamente con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, siendo $p < 0,05$ nuestro valor de significación estadística.

2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES EXTRAÍDOS

En los siguientes gráficos se muestran las actividades enzimáticas de las nueve peptidasas estudiadas en el total de líquidos foliculares (N=82), así como en los diferentes líquidos extraídos a cada paciente. Recordemos que a cada paciente se le realizaron 3 extracciones de líquido folicular y realizamos un análisis de la actividad enzimática en cada una de ellas. El análisis estadístico fue un ANOVA de medidas repetidas, para buscar si existían diferencias entre la 1^a, 2^a y 3^a extracción; para ello solo pudieron tenerse en cuenta aquellas pacientes en las que el análisis enzimático fue válido para las 3 extracciones (Las N en las diferentes peptidasas fueron las siguientes: PSA=18, APN=22, PEP=8, APB=22, APA=24, ASP=20, NEP=21, DPPIV=26 y CYS=18).



GRÁFICA 12.- Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del total de LF. Se representa la media de cada enzima (ANEXO I), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).



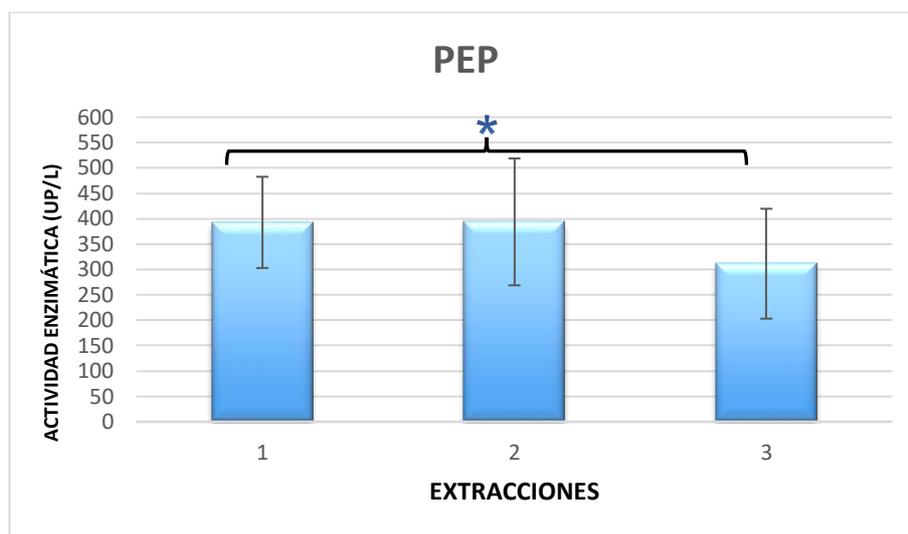
GRÁFICA 13.- Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del LF de las tres extracciones. Se representa la media de cada enzima según la extracción (ANEXO II), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

Cómo observamos en las gráficas las actividades enzimáticas en las diferentes extracciones son muy similares; siendo nuevamente DPPIV y NEP las que se observan con mayor actividad en todos los líquidos foliculares; y PEP la de menor actividad.

Paradójicamente, al hacer la estadística encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las actividades enzimáticas de PEP, APA y CYS entre la primera y tercera extracción.

2.3.1. ACTIVIDAD PEP EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES

En la siguiente gráfica se reflejan las actividades enzimáticas de PEP en las 3 extracciones. Se detectó una disminución en la actividad enzimática de la tercera extracción con respecto a la primera, que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$); aunque bioquímicamente hablando estas diferencias no se consideran importantes.



GRÁFICA 14.- Actividad de PEP en la fracción soluble del LF en la 1^a, 2^a y 3^a extracción. Se representa la media de cada enzima (N=8), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA para muestras repetidas, representándose los valores con significación estadística, * $p < 0,05$.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con el análisis estadístico (Tabla7), en el cuál apreciamos las diferencias de actividad peptidásica de PEP halladas entre las extracciones 1 y 3 de LF.

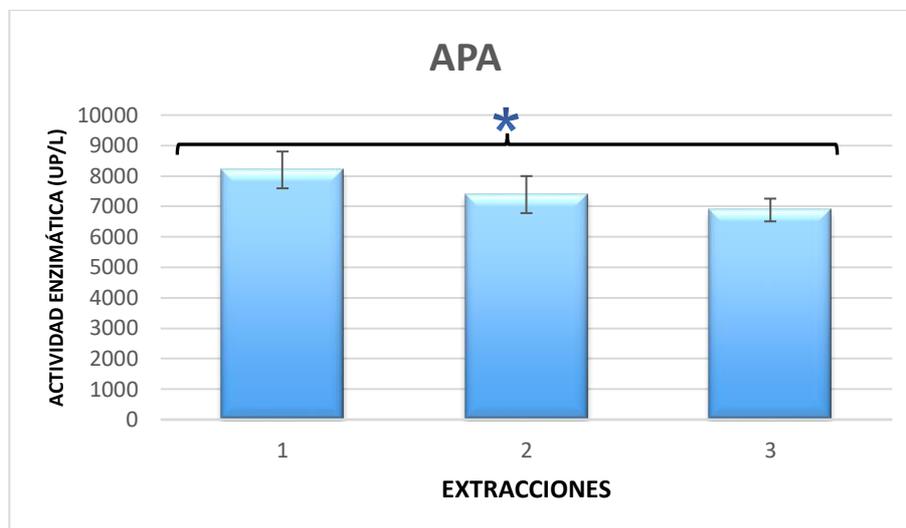
ANOVA PARA MUESTRAS REPETIDAS – PEPTIDASA PEP-

(I)factor1	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^b	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^b		
				Límite inferior	Límite superior	
1	2	26,399	69,405	,977	-189,826	242,623
	3	86,946*	23,348	,022	14,207	159,685
2	1	-26,399	69,405	,977	-242,623	189,826
	3	60,548	68,951	,794	-154,262	275,357
3	1	-86,946*	23,348	,022	-159,685	-14,207
	2	-60,548	68,951	,794	-275,357	154,262

TABLA 7.- ANOVA para muestras repetidas en el análisis de la actividad en LF de PEP en las extracciones 1^a, 2^a y 3^a. Subrayadas en amarillo las que tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

2.3.2. ACTIVIDAD APA EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES

En la siguiente gráfica se reflejan las actividades enzimáticas de APA en las 3 extracciones. Se detectó una disminución en la actividad enzimática de la tercera extracción con respecto a la primera, que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$); aunque bioquímicamente hablando estas diferencias no se consideran importantes, al igual que en PEP.



GRÁFICA 15.- Actividad de APA en la fracción soluble del LF en la 1^a, 2^a y 3^a extracción. Se representa la media de cada enzima (N=24), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA para muestras repetidas, representándose los valores con significación estadística, * $p < 0,05$.

En la tabla 8 se muestra el análisis estadístico, ANOVA para muestras repetidas, en la que observamos las diferencias halladas entre la 1^a y 3^a extracción de APA.

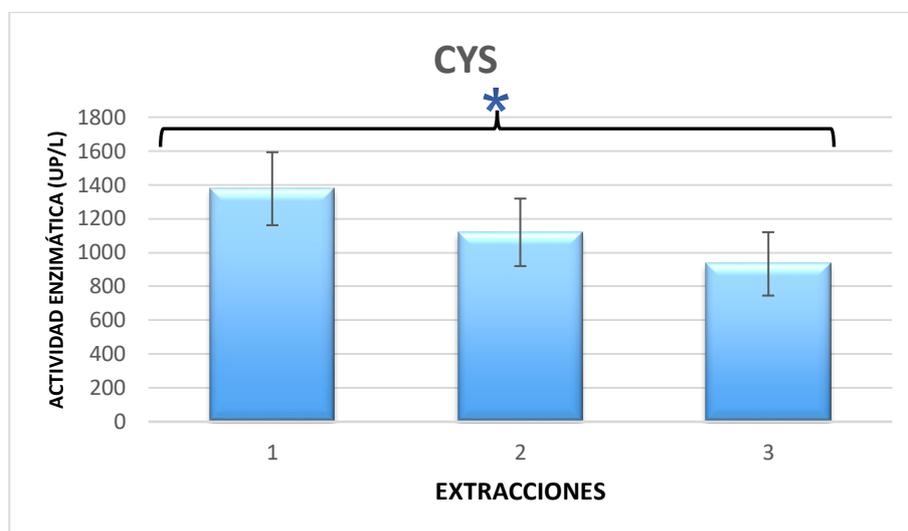
ANOVA PARA MUESTRAS REPETIDAS – PEPTIDASA APA-

(I)factor1	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^b	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^b		
				Límite inferior	Límite superior	
1	2	982,533	648,978	,372	-688,195	2653,261
	3	1714,474*	549,362	,014	300,198	3128,750
2	1	-982,533	648,978	,372	-2653,261	688,195
	3	731,941	605,733	,560	-827,457	2291,339
3	1	-1714,474*	549,362	,014	-3128,750	-300,198
	2	-731,941	605,733	,560	-2291,339	827,457

TABLA 8.- ANOVA para muestras repetidas en el análisis de la actividad en LF de APA en las extracciones 1^a, 2^a y 3^a. Subrayadas en amarillo las que tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

2.3.1. ACTIVIDAD CYS-AP EN LOS DIFERENTES LÍQUIDOS FOLICULARES

En la siguiente gráfica se reflejan las actividades enzimáticas de CYS en las 3 extracciones. Se detectó una disminución en la actividad enzimática de la tercera extracción con respecto a la primera, que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$); aunque bioquímicamente hablando estas diferencias no se consideran importantes, al igual que en PEP y APA.



GRÁFICA 16.- Actividad de CYS en la fracción soluble del LF en la 1^a, 2^a y 3^a extracción. Se representa la media de cada enzima (N=18), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA para muestras repetidas, representándose los valores con significación estadística, * $p < 0,05$.

Los resultados estadísticos se muestran en la siguiente tabla (N^o9), observándose las diferencias entre la 1^a y 3^a extracción.

ANOVA PARA MUESTRAS REPETIDAS – PEPTIDASA Cys-

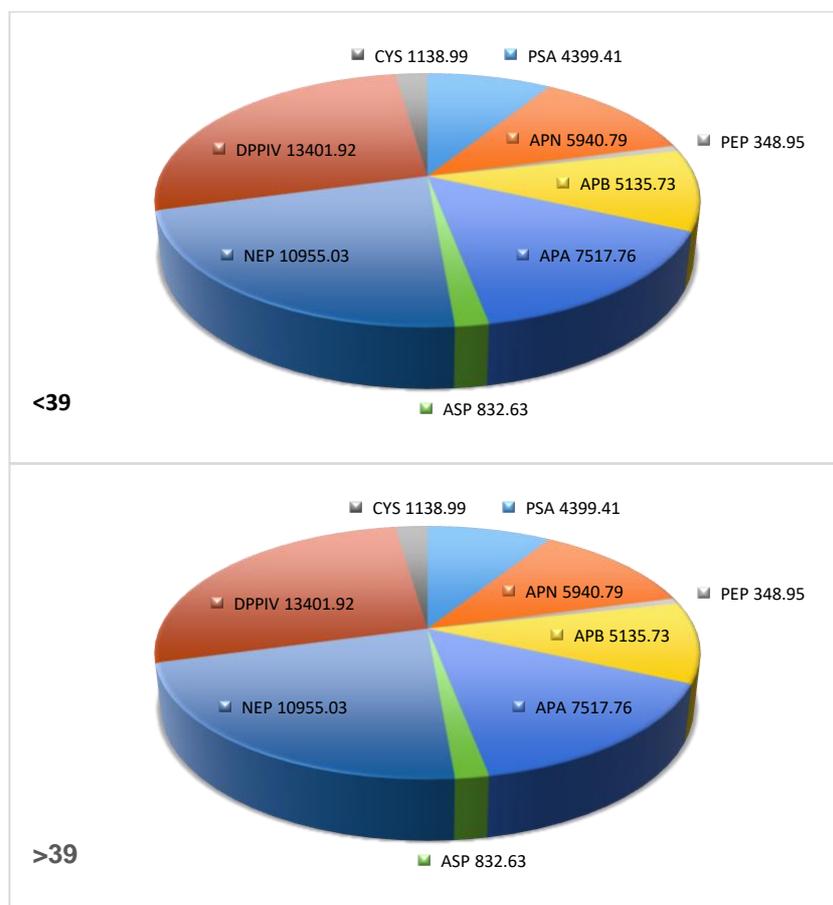
(I)factor1		Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. ^b	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^b	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	310,665	139,936	,116	-59,721	681,051
	3	397,411*	126,658	,018	62,170	732,651
2	1	-310,665	139,936	,116	-681,051	59,721
	3	86,746	137,501	,900	-277,193	450,684
3	1	-397,411*	126,658	,018	-732,651	-62,170
	2	-86,746	137,501	,900	-450,684	277,193

TABLA 9.- ANOVA para muestras repetidas en el análisis de la actividad en LF de APA en las extracciones 1^a, 2^a y 3^a. Subrayadas en amarillo las que tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

2.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN LA EDAD DE LA PACIENTE

En este apartado analizamos la actividad peptídica según si la paciente tenía más o menos de 39 años en el momento de la punción folicular.

En el siguiente gráfico se puede observar que las actividades a nivel global se mantienen estables, siendo la de mayor actividad la DPPiV y la NEP y la de menor la PEP. En este análisis se ha encontrado relación entre la actividad enzimática de dos enzimas, PSA y NEP, y la edad de las pacientes, que se detalla en los apartados siguientes.

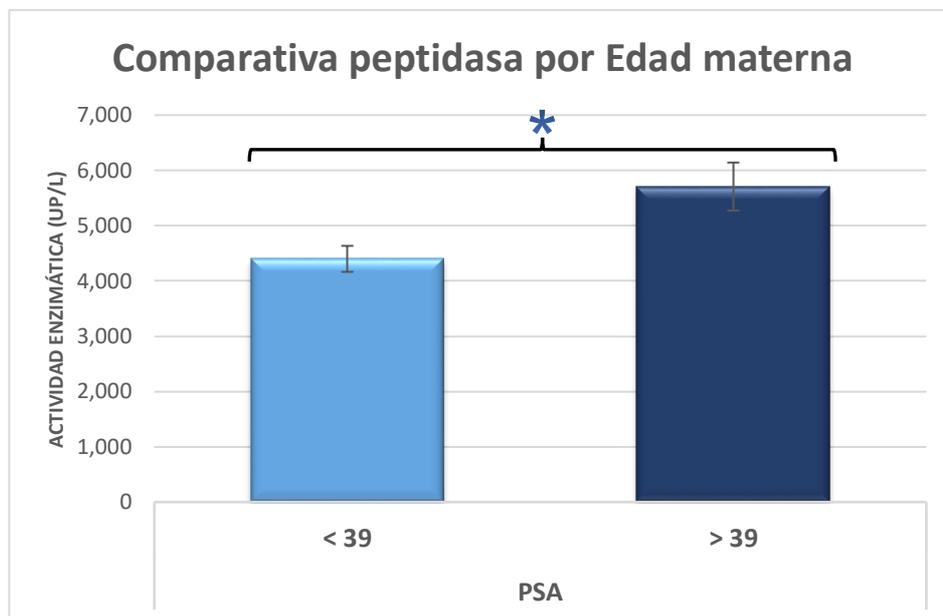


GRÁFICA 17.- Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del total de LF. Se representa la media de cada enzima (ANEXO III), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

2.4.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PSA EN LF SEGÚN EDAD

Como muestra la gráfica 18, en el grupo de mayores de 39 años se constató un aumento de la actividad de PSA, que fue estadísticamente significativo.

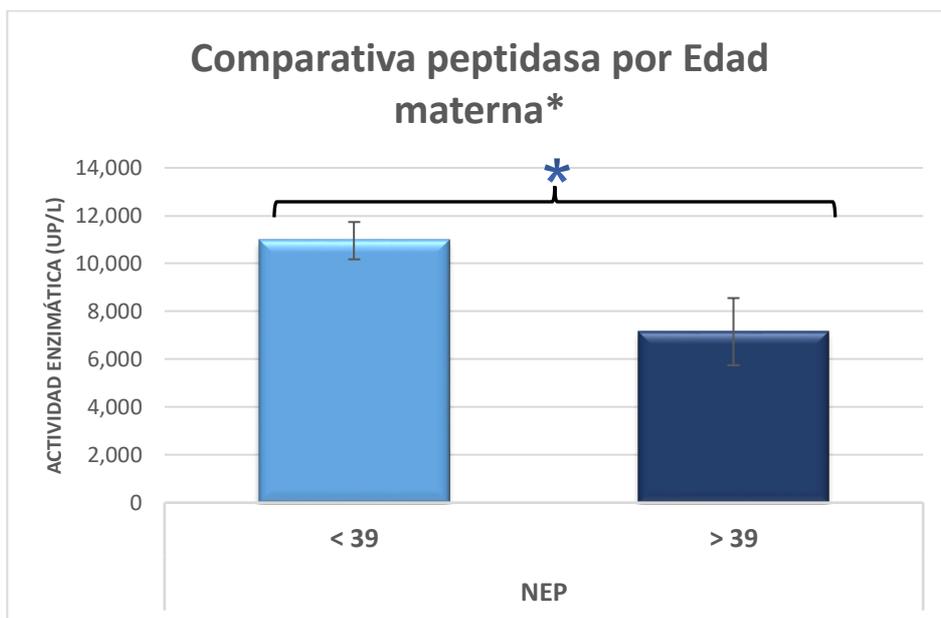
La media de actividad fue 1,3 veces superior en las pacientes mayores de 39 años.



GRÁFICA 18.- Actividad de PSA en la fracción soluble del LF en pacientes < y > de 39 años. Se representa la media del enzima (N=51 y 9, respectivamente), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una prueba no paramétrica con U de Mann-Whitney, representando los valores con significación estadística $p < 0,05^*$.

2.4.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NEP EN LF SEGÚN EDAD

Como muestra la gráfica 19, en el grupo de mayores de 39 años se constató una disminución de la actividad de NEP, que fue estadísticamente significativo. La media de actividad fue 1,5 veces inferior en las pacientes mayores de 39 años.



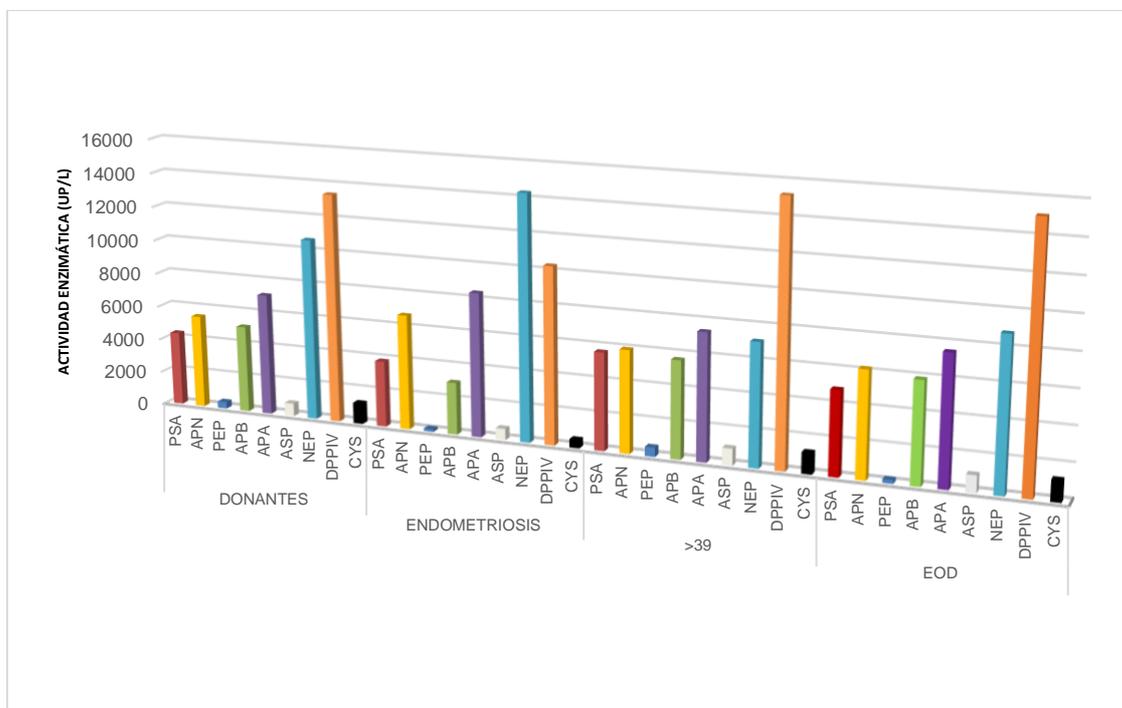
GRÁFICA 19.- Actividad de NEP en la fracción soluble del LF en pacientes < y > de 39 años. Se representa la media del enzima (N=57 y 12, respectivamente), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una prueba no paramétrica con U de Mann-Whitney, representando los valores con significación estadística $p < 0,05^*$.

2.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN GRUPO DE ESTUDIO

Se midieron las actividades enzimáticas de las 9 peptidasas en líquido folicular de 4 grupos de pacientes: donantes, endometriosis, EOD y > 39 años.

En el gráfico siguiente que recoge los cuatro grupos, puede observarse que en todos ellos excepto en el de endometriosis, la peptidasa con mayor actividad fue DPPIV, mientras que en Endometriosis fue la NEP. La de menor actividad, como se ha reflejado en los apartados anteriores, fue PEP.

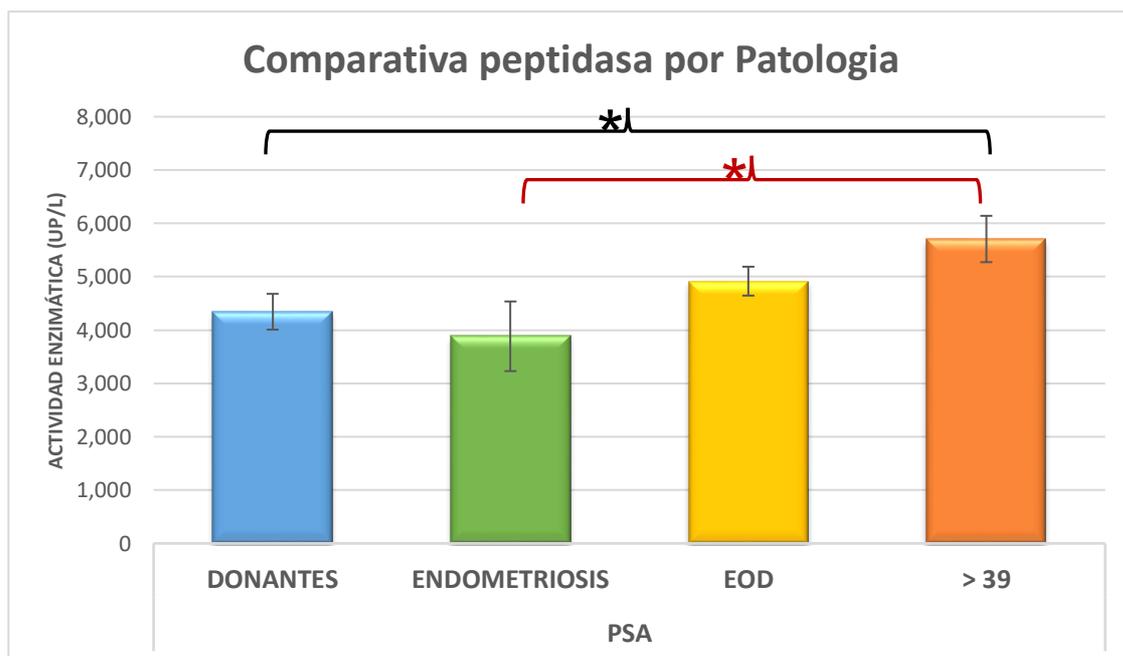
En los siguientes apartados se describen aquellas peptidasas en las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.



GRÁFICA 20.- Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble del LF en los diferentes grupos de estudio. Se representa la media de cada enzima (ANEXO IV), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

2.5.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PSA SEGÚN PATOLOGÍA.

Al analizar la actividad de PSA entre los diferentes grupos encontramos que entre los grupos de endometriosis y mayores de 39 años había un aumento significativo de la actividad. Se observó 1,5 veces mayor actividad en las mayores frente al grupo de endometriosis, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Al igual que al comparar nuestro grupo control que eran las donantes con las de mayor edad, en las que también se constató 1,3 veces menor actividad de esta enzima en las donantes frente al de mayores de 39 años, también con significación estadística.



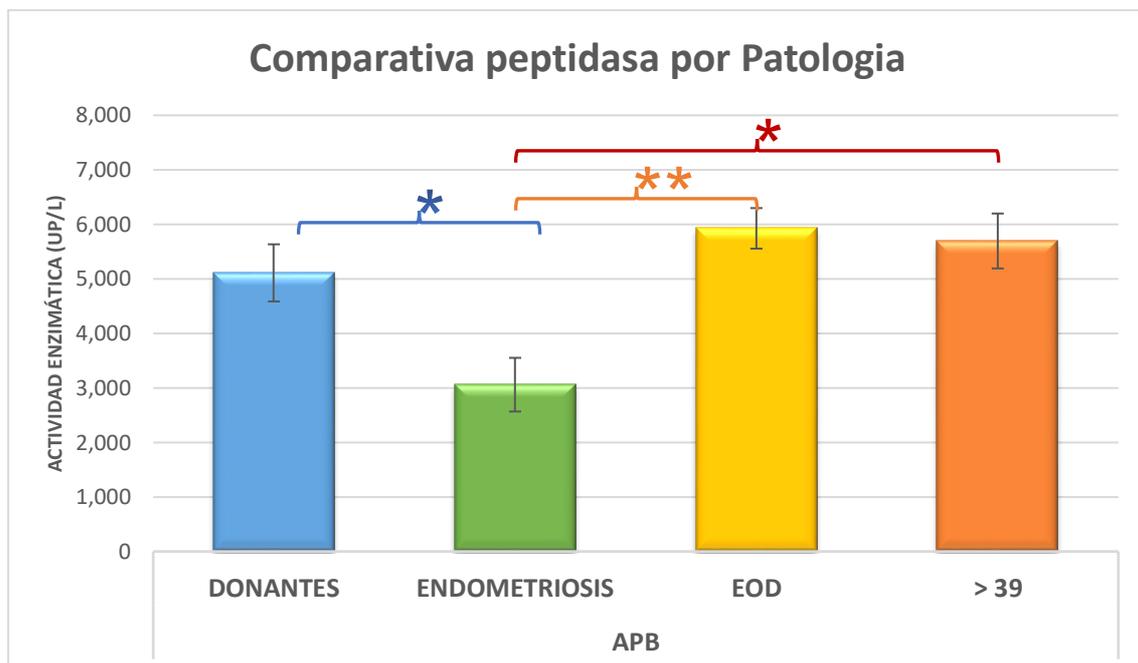
GRÁFICA 21.- Actividad de PSA en la fracción soluble del LF en los diferentes grupos de pacientes. Se representa la media del enzima (Ir a Tabla), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA, y en aquellas en las que se objetivaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias. $p < 0,05^*$

2.5.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE APB SEGÚN PATOLOGÍA.

En la siguiente gráfica (Nº22) se ve reflejada la actividad de APB en los diferentes grupos del estudio.

Comparativamente hablando, encontramos una disminución significativa de la actividad de esta peptidasa con el resto de los grupos, siendo significativa la diferencia con todos ellos.

Frente a EOD y mayores de 39 años, la endometriosis presentó casi dos veces menos actividad. La diferencia con las donantes fue algo menor, su actividad fue 1,7 veces mayor en este grupo que en el de endometriosis. Siendo todas estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05^*$ y $p < 0,01^{**}$).



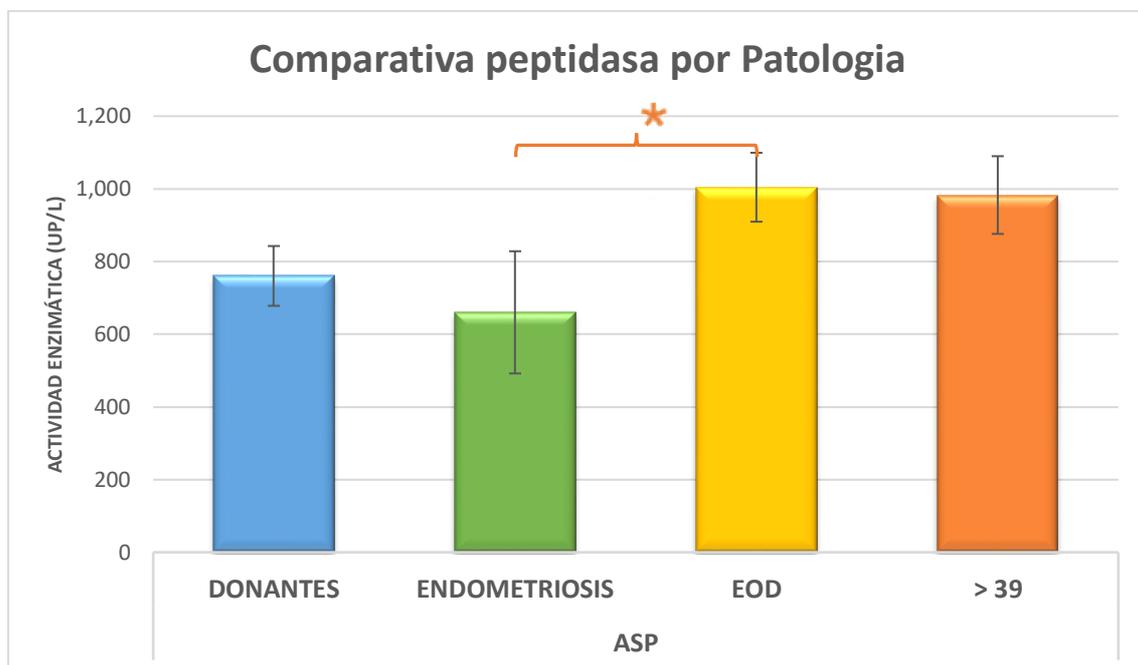
GRÁFICA 22.- Actividad de APB en la fracción soluble del LF en los diferentes grupos de pacientes. Se representa la media del enzima (Ir a Tabla), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA, y en aquellas en las que se objetivaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias. $< 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$

2.5.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ASP-AP SEGÚN PATOLOGÍA.

La actividad enzimática de ASP-AP se refleja en la siguiente gráfica, diferenciando su actividad por los diferentes grupos de estudio.

El grupo de endometriosis fue el que menor actividad enzimática para ASP presentó, mientras que la de mayor actividad fue el grupo EOD seguido muy de cerca por las mayores de 39 años.

Al comparar los diferentes grupos encontramos que en EOD se obtuvo 1,5 veces más actividad enzimática de ASP que en endometriosis, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05^*$).

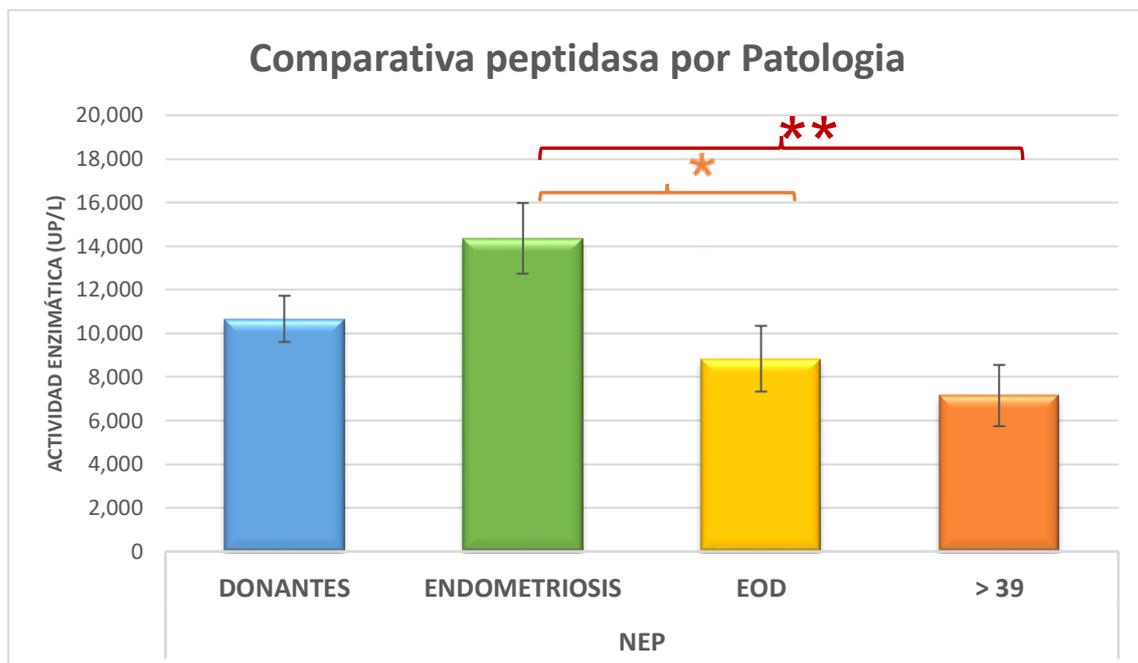


GRÁFICA 23.- Actividad de ASP en la fracción soluble del LF en los diferentes grupos de pacientes. Se representa la media del enzima (Ir a Tabla), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA, y en aquellas en las que se objetivaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias.

2.5.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NEP SEGÚN PATOLOGÍA.

Al contrario que en los apartados anteriores, en este caso observamos que NEP presenta la mayor actividad enzimática en el grupo de Endometriosis y la menor actividad en mayores de 39 años.

Y al compararlos con el resto de grupos, detectamos que el grupo de mujeres mayores de 39 años alcanzó unos niveles de actividad 2 veces inferior que en el grupo de endometriosis, siendo esta diferencia significativa ($p < 0,01^{**}$). También NEP mostró una actividad 1,6 veces inferior en el grupo de EOD comparado con el de endometriosis, que también resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05^*$).

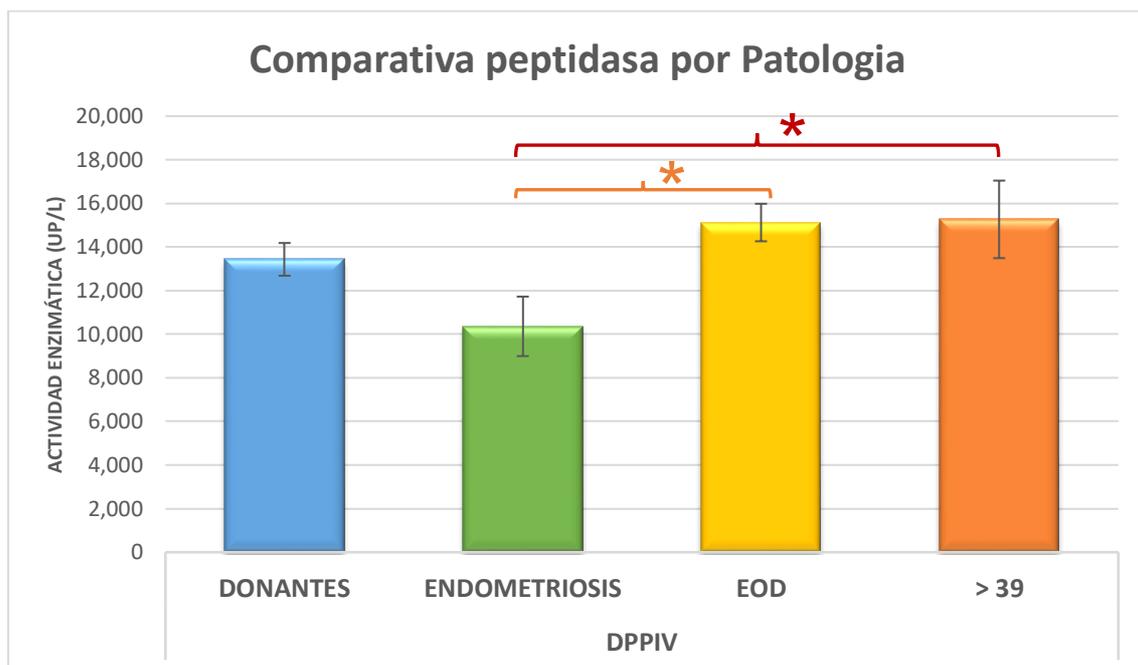


GRÁFICA 24.- Actividad de NEP en la fracción soluble del LF en los diferentes grupos de pacientes. Se representa la media del enzima (Ir a Tabla), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA, y en aquellas en las que se objetivaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias. $p < 0,05^*$

2.5.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DPPIV SEGÚN PATOLOGÍA.

En el análisis de la actividad de DPPIV se sigue observando una disminución de la actividad en endometriosis con respecto al resto de grupos, cómo hemos descrito en los anteriores casos excepto con NEP.

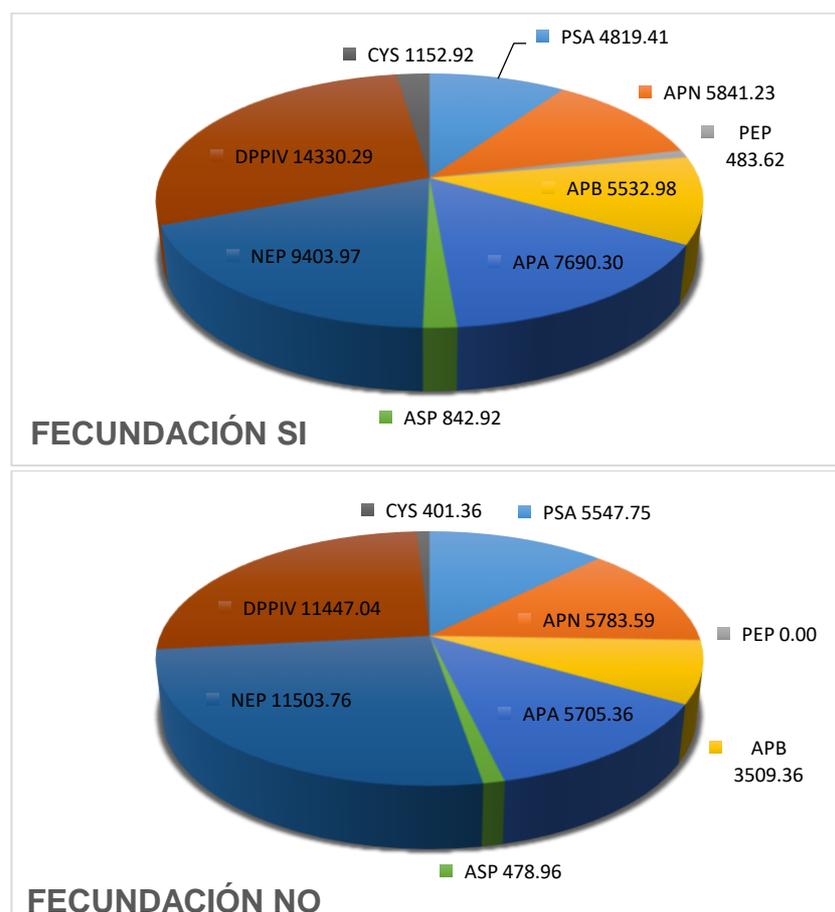
El grupo de EOD y mayores de 39 años presentaron actividades enzimáticas para DPPIV similares siendo de 1,4 veces superior en estos dos grupos con respecto al de endometriosis, siendo además esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).



GRÁFICA 25.- Actividad de DPPIV en la fracción soluble del LF en los diferentes grupos de pacientes. Se representa la media del enzima (ANEXO V), siendo la actividad enzimática expresada cómo UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una ANOVA, y en aquellas en las que se objetivaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias. $p < 0,05^*$

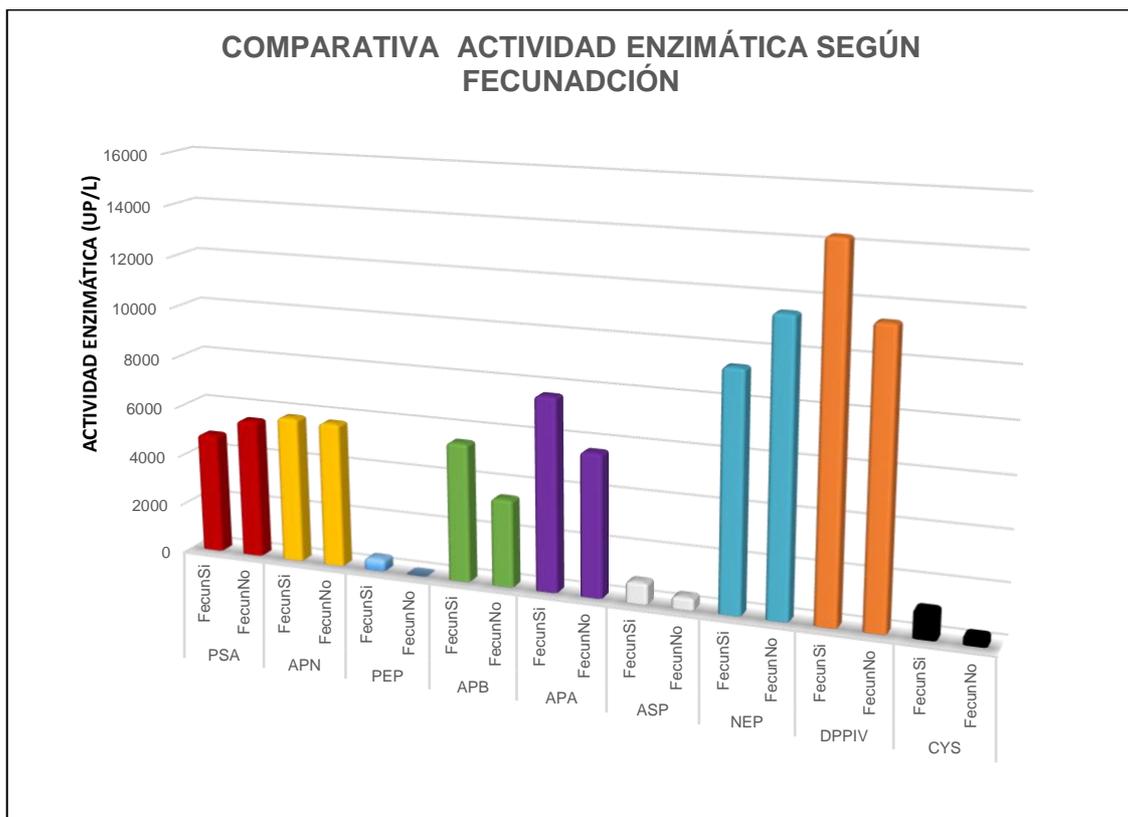
2.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF SEGÚN SI EL OVOCITO OBTENIDO CONSIGUIÓ O NO FECUNDARSE

En los siguientes gráficos se muestran las actividades enzimáticas de las 9 peptidasas en LF de los que consiguieron fecundación frente a los que no se fecundaron. Puesto que nuestra tasa de fecundación fue superior al 90%, la N del grupo que no consiguió fecundación fue muy bajo. Aun así se han comparado las actividades pero no se consiguió detectar valores estadísticamente significativos.



GRÁFICA 26. Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble de los LF con ovocito según si éste fue o no fecundado. Se representa la media de cada enzima (ANEXO VI), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

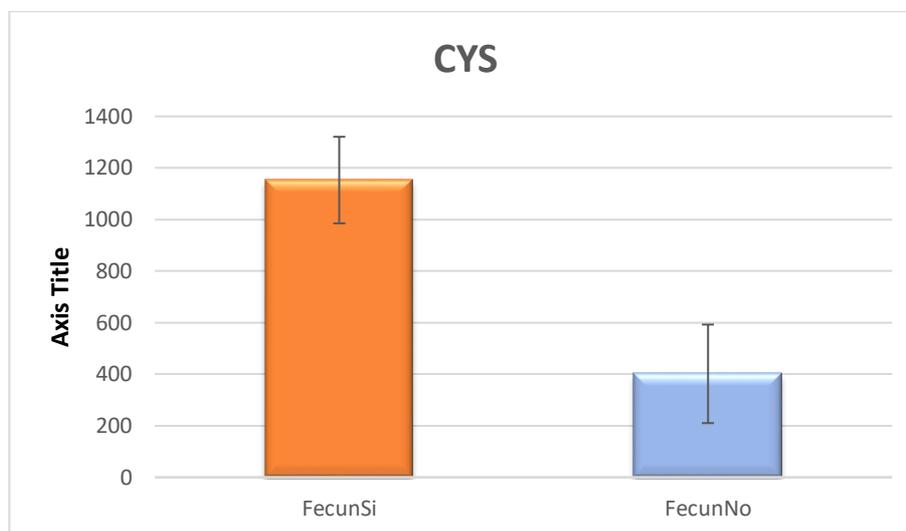
En la gráfica siguiente (gráfica 28) se ve con mayor claridad los niveles enzimáticos de las diferentes peptidasas según si el ovocito del LF fue o no fecundado. No encontramos diferencias significativas en ninguna de ellas.



GRÁFICA 28. Representación gráfica los niveles de actividad enzimática en todas las peptidasas

2.6.1. ACTIVIDAD CYS-AP SEGÚN FECUNDACIÓN

El único dato llamativo fue que en el análisis de la actividad de Cys-AP se observó que en el grupo de los que sí se fecundaron, los niveles de este enzima eran más de 2 veces superiores a los que no consiguieron la fecundación, pero aún así no fue una diferencia estadísticamente significativa; que probablemente se deba a que uno de los grupos de la muestra tenía una N muy pequeña (N=3).

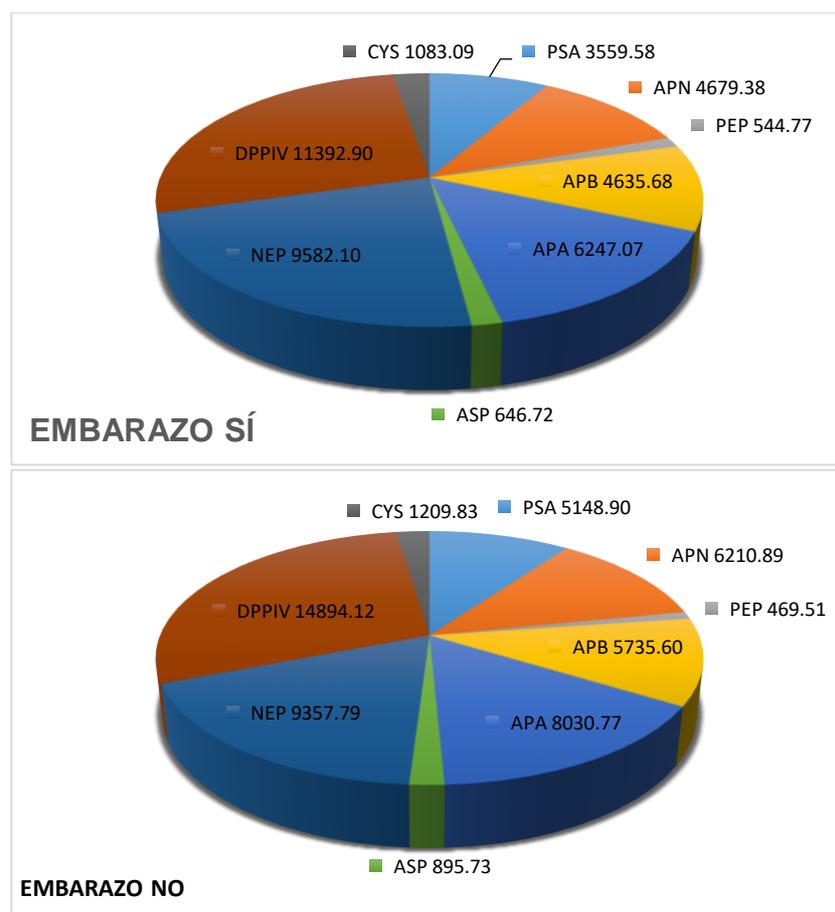


GRÁFICA 27. Actividad de CYS en la fracción soluble del LF con ovocito según si éste tuvo o no fecundación. Se representa la media del enzima (N=38 y 3, respectivamente), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una prueba no paramétrica con U de Mann-Whitney, representando los valores con significación estadística $p < 0,05^*$.

2.7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LF Y RESULTADO FIV (EMBARAZO)

El último parámetro analizado fue el éxito del tratamiento de fecundación in vitro, es decir la consecución o no de gestación. Nuestras transferencias embrionarias fueron todas set (single embryo transfer), o sea que sólo se transfirió un embrión por transferencia.

En la primera gráfica se muestra la comparación de la actividad enzimática entre los dos grupos, siendo la proporción de actividad similar, cómo en el resto de análisis, DPPIV y NEP son las que presentan mayor actividad y PEP la que menor.



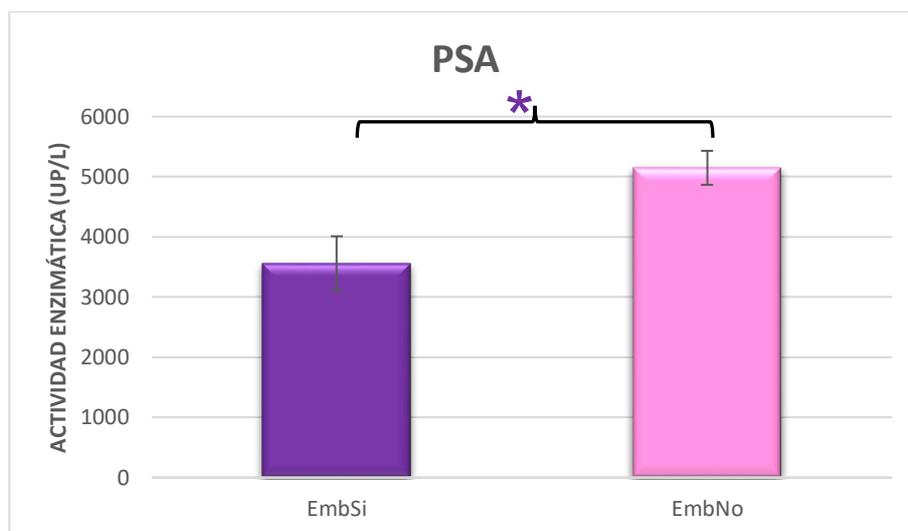
GRÁFICA 29. Actividad de las 9 peptidasas en la fracción soluble de los LF de las pacientes que consiguieron gestación. Se representa la media de cada enzima (ANEXO VII), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min).

A continuación se presentarán las gráficas de aquellas enzimas que mostraron diferencias con significación estadística.

2.7.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PSA Y RESULTADO DE FIV

La siguiente figura refleja la actividad enzimática de PSA en LF de pacientes que consiguieron gestación y las que no lo consiguieron.

Al compararse los dos grupos se observó que la actividad enzimática fue 1,4 veces superior en aquellas que no consiguieron gestación frente a las que se embarazaron; siendo esta diferencia, estadísticamente significativa ($p < 0,05^*$).

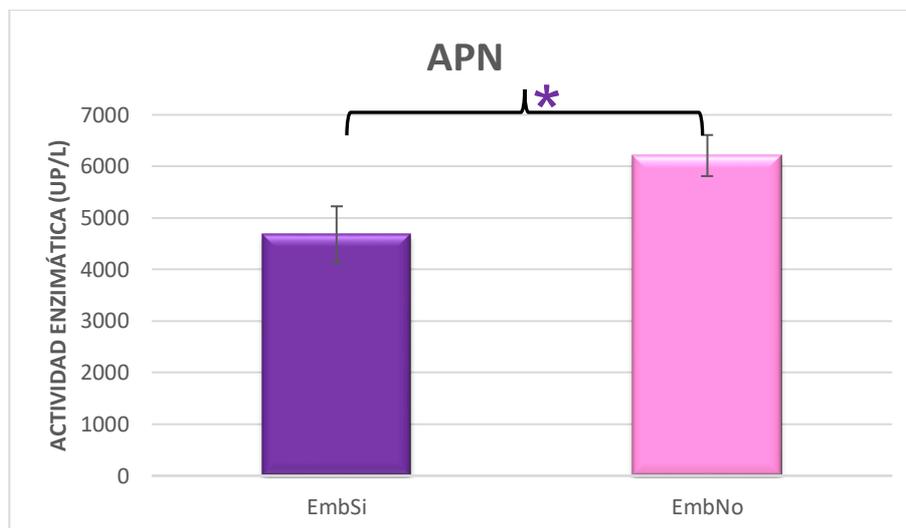


GRÁFICA 30. Actividad de PSA en la fracción soluble del LF de pacientes que consiguieron o no gestación. Se representa la media del enzima (N=7 y 25, respectivamente), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una prueba no paramétrica con U de Mann-Whitney, representando los valores con significación estadística $p < 0,05^*$.

2.7.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE APN Y RESULTADO DE FIV

Tal y como se observa en la siguiente figura, la actividad enzimática de APN se midió en el LF de todas las pacientes, comparando su actividad en dos grupos según si se consiguió o no gestación.

En este caso, se observó un aumento de la actividad en 1,3 veces en las que no consiguieron gestación frente a las que consiguieron embarazo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05^*$).



GRÁFICA 31. Actividad de APN en la fracción soluble del LF de pacientes que consiguieron o no gestación. Se representa la media del enzima (N=7 y 27, respectivamente), siendo la actividad enzimática expresada como UP (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min). El análisis estadístico fue realizado con SPSS y se hizo una prueba no paramétrica con U de Mann-Whitney, representando los valores con significación estadística $p < 0,05^*$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. SOBRE LOS RESULTADOS CLÍNICOS OBTENIDOS

Según una investigación de la OMS realizada en 190 países, hay casi 50 millones de parejas estériles en el mundo. Según si los países son más ricos o más pobres, las causas varían, siendo en estos últimos las enfermedades de transmisión sexual y en los países más desarrollados, el retraso de la maternidad como el factor más importante. Las pacientes de nuestro estudio tuvieron una media de edad de 36,4 años y la media de edad de nuestro centro, Clínica ginecológica Juana Hernández, se encuentra en 38,6 años.

Cómo ya es conocido, el punto máximo en la fertilidad femenina se encuentra entre los 20 y 24 años, para posteriormente ir disminuyendo de forma uniforme. En la literatura se advierte una mengua en la capacidad gestante de la mujer a medida que aumenta su edad, siendo las tasas de embarazo por ciclo iniciado de FIV a los 34 años cercana al 40%, mientras que en un rango de 5 años superior la tasa decrece 10 puntos drásticamente, tendencia que se mantiene a lo largo de la vida reproductiva. Siendo a los 45 la tasa de gestación prácticamente nula, ya que nos aproximamos a la edad del inicio de la menopausia (Cyrus *et al.*, 2013; Dólleman *et al.*, 2013).

Gracias a la introducción de los TRA, las posibilidades de las parejas estériles han aumentado. En los últimos años se ha observado un aumento en los tratamientos de fecundación in vitro en España (incremento del 9,5% según el registro SEF 2015); registrándose 127.809 ciclos en 2015.

VARIABLES DE LABORATORIO

Según los Criterios de Bolonia, un buen marcador de éxito en los ciclos de FIV son los ovocitos obtenidos en la punción, no los folículos contabilizados mediante ecografía. Esto puede ser explicado por varias causas, que podrían justificar por qué no obtuvimos todos los ovocitos de los folículos puncionados.

No encontramos en la literatura explicaciones con base científica, pero si opiniones de expertos, que nos hacen vislumbrar cuales son las causas de ausencia de ovocito en algunos folículos. En la mayor parte de los casos, lo que se punciona es un folículo pero en alguna ocasión se podría confundir por un quiste, que no contiene ovocitos. Una más factible es que al realizar la aspiración del líquido folicular el ovocito se quede adherido a la pared y no consigamos su extracción, o bien, si no aspiramos debidamente todo el líquido folicular pueda haber quedado en él (Cohen *et al.*, 2018). Otro de los motivos es el que expone en un artículo de opinión el Dr. Geoffrey Sher (Sher, 2016), en el que explica que aquellos ovocitos con complejas aneuploidías quedan fuertemente adheridos a la pared del folículo, imposibilitando su intento de aspiración.

Encontramos descrito un síndrome del folículo vacío *borderline* que podría explicar la causa de porque en algún ciclo, la cantidad de ovocitos que se extraen no se corresponden con el número de folículos contabilizados por ecografía. El EFS (*empty follicle syndrome*) fue descrito por primera vez por Coulam y colaboradores (1986), y se ha intentado explicar por múltiples razones. El error en la administración de la medicación es su principal causa, aunque también se ha encontrado asociación con edad avanzada e infertilidad de larga data, así como con niveles bajos de estrógenos (Baum *et al.*, 2012), endometriosis (Kuroda *et al.*, 2012). Incluso hay

investigadores que creen que puede tratarse de una alteración intrínseca del ovario o que haya una posible causa genética que produzca este síndrome (Smisha *et al.*, 2011).

VARIABLES DE ÉXITO EN TRA (FECUNDACIÓN Y GESTACIÓN)

Cuando hablamos de los factores que influyen en el éxito de los TRA, tenemos que conocer cuál es el porcentaje de fecundación esperado para una técnica. Según la SEF, en el registro de 2015 (Registro SEF, 2015), se obtuvo una tasa de fecundación del 70,5% en FIV y del 67,6% en ICSI; por lo que la tasa de fecundación del 91% reportada en este trabajo, se encuentra claramente por encima de los porcentajes esperados. Como factores que pueden influir en este parámetro encontramos la experiencia y habilidad del embriólogo, las condiciones del laboratorio e incubador, la calidad ovocitaria y la movilidad espermática... En nuestros casos no existía factor masculino asociado, la mayor parte de los ciclos eran primeros ciclos, sin un tiempo muy prolongado de infertilidad y la edad media de todas las pacientes (sin contar el grupo control) fue de 36,4 años, no considerándose una edad demasiado avanzada cómo para afectar a este parámetro.

En cuanto a la tasa de éxito en TRA, tenemos que hablar del porcentaje de gestación clínica. La SEF publica una tasa de gestación por transferencia del 36,4% en total (26,9% en las que se transfirió 1 embrión).

En 2015 según la SEF la media de embriones transferidos fue de 1,8, siendo en el 67,4% de los casos transferencias de 2 embriones; en nuestro caso las transferencias fueron de un único embrión cada vez (EST); entendemos que las transferencias que se hacen de un embrión son las que tienen mejor pronóstico, no se

hacen por sistema, cosa que nosotros en nuestro grupo de pacientes fueron prácticamente todas, por este motivo creemos que nuestra tasa es algo inferior a la publicada por la SEF (20%), aparte de tener una edad media de 36,4 años.

Según la SEF, la tasa de parto por transferencia embrionaria en 2015 fue del 26,5%, en las mayores de 40 años el resultado fue del 12,2% y de las pacientes de 35-39 años del 25,9%. Nuestra tasa en mujeres mayores de 39 años se situó alrededor del 8,3%, siendo algo inferior a la publicada, considerando que nuestras transferencias eran de 1 embrión. La tasa global de parto en EST en el registro de SEF 2015 fue del 19,4%, por lo que nuestra tasa de gestación global (20%) se encuentra dentro de los parámetros registrados. Según los criterios de Bolonia, podemos hablar de baja respuesta siempre que se cumplan dos de los siguientes criterios: edad mayor de 39 años o cualquier otro factor de riesgo de baja respuesta, ciclo previo con menos de 4 ovocitos recuperados y alteración de test de reserva ovárica (RFA < 5-7 y AMH < 0.5-1 ng/ml) (Ferraretti *et al.*, 2011).

En cuanto a la tasa en donantes, sí que observamos una tasa inferior a la esperada; en nuestro estudio obtuvimos una tasa del 26,7%, siendo la publicada en la SEF del 36,2% de partos por transferencia de embrión único. Creemos que las causas de este descenso en la tasa se deben a que en 5 de nuestras 13 donantes no se obtuvieron ovocitos, por lo tanto no pudimos transferir ningún embrión. Las causas más plausibles son el error en la administración de la medicación, puesto que en todas ellas se había demostrado fertilidad o se ha demostrado a posteriori, también podemos pensar que ocurrió un síndrome del folículo vacío, o bien que el factor masculino pudo jugar un papel importante en la no consecución de embarazo, así como factores de implantación en la receptora.

En nuestras pacientes con endometriosis encontramos una tasa inferior de fecundación, aunque se sitúa en parámetros normales según la SEF; el porcentaje de fecundación fue del 78%, pudiendo atribuir este descenso a los efectos negativos que produce la enfermedad en la calidad de los óvulos. En la literatura encontramos que la tasa de gestación con FIV en endometriosis se encuentra alrededor del 22%, esto variará dependiendo del grado de endometriosis de la mujer, siendo menor en los casos de endometriosis profunda (Brown y Farquhar, 2014). Nuestra tasa se situó alrededor del 14%, creemos que aparte del efecto deletéreo de la propia enfermedad sobre el ovario, endometrio, en definitiva sobre la capacidad reproductiva de estas pacientes, la media de edad de este grupo superaba los 35 años, efecto que consideramos también negativo en cuanto a tasa de gestación.

Por último en nuestro grupo de EOD, considerando este grupo aquellas parejas con permeabilidad tubárica bilateral, función ovulatoria normal y seminograma normal tras un año de esterilidad (Cerrillo y Garcia-Velasco), encontramos una tasa de fecundación correcta y una tasa de gestación similar a la descrita en múltiples estudios. La prevalencia de esta anomalía está constantemente en debate, puesto que existen causas de subfertilidad asociadas que no están contempladas; hay múltiples estudios con unos rangos que varían del 0 al 37%. Los estudios que encontramos sobre las tasas de gestación en esta patología son antiguos, y se insiste mucho en personalizar el tratamiento dependiendo de la edad de la mujer y del tiempo de infertilidad. En una revisión de la Cochrane de 2012, hablan de una tasa de RN (recién nacido) en casa en mujeres por debajo de los 35 años del 33%, mientras que esta tasa se reduce a más de la mitad en mujeres de los 40 a los 42, reportando un 12,5%

(Pandian y Bhattacharya, 2013). Por lo que teniendo nuestro grupo una edad media de 35 años y situándose la tasa de gestación en 33,3%, consideramos que se encuentra dentro de los parámetros descritos en la bibliografía.

VARIABLES DE ESTIMULACIÓN

En referencia a los protocolos de estimulación ovárica controlada, encontramos que el grupo con menos días de estimulación fueron las pacientes mayores de 39 años, cómo es lógico pensar dadas las características de este grupo. Conocemos que la reserva ovárica disminuye a medida que la edad materna aumenta, estando también descrita una aceleración del proceso de foliculogénesis en este tipo de mujeres (Felip *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2013); es por este motivo por el que en este grupo observamos un menor tiempo de administración de gonadotropinas (8,7 días). Cómo es lógico pensar, la dosis total de gonadotropinas fue máxima en el grupo de mayores de 39 años, a pesar de ser el grupo con menos días de estimulación, al ser pacientes con baja reserva, la dosis de inicio es superior al resto de grupos, siendo de 300UI diarias en todas. Por el contrario el grupo de donantes fue el que menor dosis de gonadotropinas precisó, puesto que se trata de pacientes jóvenes con buena reserva ovárica; aunque son las pacientes con mayor número de días de estímulo, y esto puede explicarse por la alta incidencia de pacientes con SOP entre las donantes, son pacientes con dificultad en la estimulación ovárica por el riesgo de SHO que presentan, por ese motivo se utiliza normalmente un protocolo de antagonistas, con dosis de gonadotropinas al inicio de estimulación bastante bajo pero con más días de estimulación por el efecto que produce el hiperandrogenismo en el desarrollo folicular (Onofriescu

et al., 2013).

En definitiva, con independencia del grupo al que perteneciera cada paciente, el número de días y la dosis total administrada de gonadotropinas se ha adaptado al perfil inicial de la paciente y a la respuesta que fue generando durante el tratamiento; esto ha hecho que la respuesta fuera óptima en todas las pacientes del estudio, cumpliendo uno de los objetivos principales que ha de cumplir un protocolo de estimulación ovárica.

2. SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OBSERVADA.

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, aunque 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 *et al.*, 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. Cabe 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, entre otros. (Sentandreu y Toldrá, 2007; Singh *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2010; Pérez, 2011; Larrinaga *et al.*, 2012; Thorek *et al.*, 2013).

Posiblemente, y partiendo de la “década del cerebro”, podemos encontrar los primeros trabajos que describen la regulación de los procesos de fertilidad femenina, el metabolismo peptídico y, con ello, las actividades aminopeptidásicas. Nos referimos al hecho de que es sabido 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 (A II), el neuropéptido Y, la colecistoquinina y los péptidos opioides (siendo estos últimos los más estudiados). En ratas se había 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 presentado 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 pudiendo por ello estar implicadas en la regulación de ciclo sexual (de Gandarias *et al.*, 1990, 1993, 1994a, 1996, 1999a, 1999b; Fernández, 1996). Los resultados comentados hicieron que nuestro grupo propusiera un mecanismo de liberación gonadotrópica del eje hipotálamo-hipofisario, complemento del reloj neural de Kalra (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.*, 1994a).

A partir de estos estudios iniciales, comenzaron a aparecer trabajos que implicaban directamente al metabolismo peptídico y sus enzimas reguladores en la fertilidad tanto masculina como femenina, con diversas descripciones de estos niveles tanto a nivel espermático, como seminal, ovocitario y en líquido folicular (a este nivel existen muchos menos ensayos). Por ejemplo, en el año 2002, Fernández y cols. (Fernández *et al.*, 2002) describieron por vez primera los niveles de actividad aminopeptidásica en diversas

fracciones de semen humano normozoospermico. Los altos valores de actividad observados en las diferentes fracciones espermáticas estudiadas, 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 tanto en testículos/epidídimo, como en el propio espermatozoide. Tanto Fernández (Fernández *et al.*, 2002) como Subirán (Subirán *et al.*, 2008, 2011) detectaron que en el eyaculado de varones normozoospermicos 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 (Ramon, 2011; Aparicio *et al.*, 2018a).

En nuestro estudio hemos analizado la actividad enzimática de 9 peptidasas en el LF de mujeres con endometriosis, en mayores de 39 años, en mujeres con esterilidad de origen desconocido y en donantes de óvulos. En primer lugar, comentar que en todas las muestras estudiadas hemos hallado actividad enzimática para las peptidasas APN, PSA, APB, APA, Asp-A, Cys-AP, DPPIV, PEP y NEP. Los mayores niveles de actividad los encontramos en DPPIV y NEP.

Solo un estudio previo realizado en 2014 por Roméu (Roméu, 2014; Roméu *et al.*, 2018) describió los niveles de 9 enzimas proteolíticas en líquido folicular humano en mujeres sanas y con diversas patologías de fertilidad. Observó cómo, en LF de mujeres sanas, los mayores niveles de actividad los registraban la APN, PSA, APB y DPPIV, mientras que el resto de peptidasas presentaban una actividad significativamente inferior.

Como podemos apreciar, nuestros resultados son bastante coincidentes con los de Roméu, si bien resulta necesario remarcar que nuestros niveles de DPPIV son significativamente superiores a los obtenidos en su estudio en líquidos foliculares de mujeres sanas. Los resultados de la NEP se describen por vez primera en LF.

Es por ello que iniciaremos este apartado de discusión con los resultados obtenidos con este último enzima. Se trata de una proteína superficial de membrana (por lo que su presencia a nivel de líquido folicular no es esperada), también conocida como antígeno CD10, “Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen” (CALLA) y neprilisina, y que pertenece a la familia de Zn-metalopeptidasas con un centro activo denominado HexxH característico de la familia proteica M13 (Roques *et al.*, 1993). Se ha descrito también otro miembro de esta familia de peptidasas, la neprilisina 2 (NEP2). Ambas proteínas se expresan en testículos de rata y ratón (Ghaddar *et al.*, 2000; Tanja *et al.*, 2000), así como en espermatozoide humano, por lo que se ha propuesto su implicación en la fertilidad espermática (Subirán *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2010). Estudios realizados en ratones *knockout* NEP2 han demostrado la relación entre esta proteína y la fertilidad masculina: estos ratones *knockout*

presentan tanto funciones testiculares como parámetros seminales normales, pero presentan también un menor ratio de capacidad fertilizadora, así como alteraciones embrionarias durante el desarrollo *in vitro* (Carpentier *et al.*, 2004). Por tanto, la implicación de esta proteína en la capacidad fertilizante espermática queda perfectamente demostrada. Sin embargo, y como hemos comentado, no existe información sobre el posible papel de este enzima en la capacidad fertilizante femenina. En cualquier caso, su presencia a nivel de líquido folicular demuestra que también tiene alguna función a este nivel.

Para llevar a cabo un planteamiento coherente de la Discusión, presentaremos a continuación la misma según los péptidos controlados por los enzimas ensayados en el presente trabajo. Así, comenzando con la proteína que mayor nivel de actividad presenta, analizaremos la casuística de la DPPIV. A continuación presentaremos los niveles de actividad de los enzimas encargados de la regulación del sistema opioidérgico, que son: APN, APB, APA, PSA, PEP y NEP. Continuaremos con los enzimas reguladores del Sistema Renina Angiotensina local: Asp-A, APA, APB, APN, PEP y NEP y finalizaremos con el estudio del control de los niveles oxitocinérgicos: Cys-AP y PEP.

La DPPIV está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimosinas (Havre *et al.*, 2008); 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). DPPIV 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 corporales (Iwaki-Egawa *et al.*, 1998; Carl-McGrath *et al.*, 2006; Ramon, 2011; Aparicio *et al.*, 2018a), por lo que es válido encontrar actividad de este enzima en líquido folicular, si bien resulta llamativo el hecho de que esta sea la actividad enzimática más alta hallada en este estudio. 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 (Fujiwara *et al.*, 1992, 1999; Imai *et al.*, 1992). Estos aspectos nos podrían 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.

Los niveles de péptidos opioides están controlados por degradación enzimática, siendo sus enzimas reguladores los más estudiados hasta el momento. Específicamente, son dos las enzimas

degradadoras de encefalinas: la APN (recordemos que este enzima también participa en la regulación del SRA) y la PSA. También han sido implicadas en el control de los niveles de opioides endógenos los enzimas APB y APA, si bien estas actividades parecen participar también en la regulación de los niveles de otros péptidos. Así, entre los sustratos naturales de la APB se encuentran las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, Angiotensina III y kalidinas (McLellan *et al.*, 1988; Foulon *et al.*, 2004).

En el presente trabajo hemos observado cómo, tras la DPPIV, los niveles más altos se observan en NEP y APA. De ello podríamos deducir la existencia de un importante sistema opioidérgico “local”. Incluso más específicamente se podría hablar de un sistema encefalinérgico “local”, que lógicamente estaría implicado en el mantenimiento del microambiente folicular y, con ello, en los diferentes procesos de maduración y mantenimiento ovocitario. Este aspecto ya ha sido estudiado y descrito en el gameto masculino. Estos péptidos opioides parecen estar implicados en la movilidad espermática, aunque los resultados encontrados hasta la actualidad son contradictorios. Por un lado, la movilidad espermática desciende en presencia de altas concentraciones de encefalinas y en presencia de la β -endorfina (Fraïoli *et al.*, 1982; Sastri *et al.*, 1991). Además, se ha visto que, análogos sintéticos de la met-encefalina (DAMME) produjeron también un descenso de la movilidad espermática debido a una reducción en el consumo de O₂, sin afectar en la viabilidad del espermatozoide (Foresta *et al.*, 1985). Sin embargo, otros autores han observado que las encefalinas a bajas concentraciones son necesarias para mantener la movilidad espermática (Fujisawa *et al.*, 1992). Finalmente, hay incluso algunos estudios que no detectan

efecto alguno de la met-enkefalina sobre la movilidad espermática (Fraioni *et al.*, 1985). Nuestro grupo de investigación (Agirregoitia *et al.*, 2006) propuso que el efecto bivalente de los opioides podría ser debido a la activación de distintos receptores ya que la incubación de espermatozoides humanos con morfina (agonista del receptor μ -opioides) o con naltrindol (antagonista del receptor δ -opioides) inhibe la movilidad espermática. Además, la naloxona, antagonista con afinidad diferencial por los receptores opioides, modula la movilidad dependiendo de la dosis del antagonista utilizado (Albrizio *et al.*, 2005; Mari *et al.*, 2005). Aunque el efecto de los péptidos opioides es contradictorio, algunos autores sugieren que un nivel adecuado de enkefalinas sería necesario para el mantenimiento de la movilidad espermática ya que pacientes con déficit en la movilidad espermática (astenozoospermia) presentan unos niveles de met-enkefalina significativamente menores en su plasma seminal (Fujisawa *et al.*, 1996).

Vemos entonces que, aunque todavía con resultados y conclusiones contradictorias, se ha estudiado mucho a nivel masculino, pero la cantidad de trabajos que relacionan los opioides con la fertilidad femenina es bastante insuficiente (Roméu *et al.*, 2018a). Los EOP (péptidos opioides endógenos), 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.*, 2012; 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. Nuevamente, y al igual que ocurre a nivel masculino (Aparicio, 2018; Aparicio *et al.*, 2018a), nuestros resultados muestran la importancia de los EOP en los procesos reproductivos, ya que los principales enzimas encargados de su degradación (APN y PSA) presentan una gran actividad en líquido folicular. Estas peptidasas participan en la regulación de biopéptidos tales como encefalinas, dinorfinas y endorfinas entre otras.

Además del sistema opioidérgico, otro importante modelo de regulación fisiológica es el sistema Renina-Angiotensina (SRA), del que existen evidencias de que la funcionalidad del aparato reproductor depende de la presencia de un sistema renina angiotensina local. Se ha observado infertilidad en animales carentes de los genes que codifican componentes SRA, como el enzima de conversión de la angiotensina (ECA) o angiotensinógeno (Hagaman *et al.*, 1998). Además, la distribución de los componentes de SRA, los receptores y las actividades de la angiotensina asociados demuestran funciones que están exclusivamente relacionadas con el proceso reproductivo (Saridogan *et al.*, 1996; Leung y Sernia, 2003). En el presente estudio hemos incluido un amplio espectro de enzimas que participan en la regulación de este sistema Renina-Angiotensina, como la Asp-AP, APA (Glu-AP), APB, APN, PEP, NEP y Cys-aminopeptidasas, siendo la importancia cuantitativa de cada una de

ellas distinta. Recordemos esquemáticamente la participación de cada uno de estas enzimas en la regulación del SRA completo: PEP: transformación de AI y AII en A1-7; APN: conversión de AIII en AIV; APA: AII en AIII; APB y Cys-AP (en menor proporción): AIII en AIV. Pero como decimos, la importancia de cada una de ellas es cuantitativamente distinta. Así, los mayores niveles aparecen en NEP y APA y los menores en Cys y PEP.

Resulta interesante constatar, en este sentido, como la Aminopeptidasa ácida, principal enzima controlador de los niveles de angiotensina II, es el tercer enzima con mayor actividad de los hallados en el presente estudio. Esto significa que el SRA local tiene que tener un importante papel en mantenimiento del microambiente folicular y, con ello, en los procesos de maduración y mantenimiento ovocitario. Esto que, como decimos, ha sido ampliamente descrito en gameto masculino, tiene poca información en relación con la fertilidad femenina por lo que resulta difícil discutir sobre ello. A pesar de ello, se ha descrito a nivel ovárico la presencia de APA en la membrana del 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 y además con elevada actividad. 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 una de las angiotensinasas más importantes que existen, no en vano es uno de los principales reguladores de la concentración de Angiotensina II en el ovario humano. Las enzimas APA y Asp-AP son las encargadas de metabolizar Angiotensina II en III (Nagatsu *et al.*, 1965), que a su vez será convertida en Angiotensina IV por la APN y la APB (como

hemos comentado anteriormente). La Angiotensina 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 A-II y la A-III son dos componentes vitales del RAS (Hirschi y D'Amore, 1996; Schlingemann *et al.*, 1996), sistema de comunicación celular que se ha erigido como uno de los principales reguladores de la esteroidogénesis ovárica.

Finalmente, también han sido incluidas en este proyecto de investigación enzimas que participan en la regulación de los niveles oxitocinérgicos (PEP y Cys-AP), siendo la funcionalidad principal propuesta para este péptido el útero grávido: La oxitocina es uno de los agentes uterotónicos más potentes y es clínicamente utilizado para inducir el parto. De hecho, la Cys-AP ha sido considerada en humanos la peptidasa placentaria más importante a nivel de membrana, durante el embarazo se ha detectado en plasma una forma circulante, resultante del corte proteolítico llevado a cabo en el dominio extracelular de la peptidasa (Nomura *et al.*, 2005). Esta actividad 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). Ya en el año 2004 Demaegdt identificó la 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 uno de los primeros estudios llevados a cabo en mujeres que demuestra la presencia de Cys-AP en el líquido folicular humano. 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. A pesar de todo lo anterior, tanto los niveles de Cys-AP como de PEP son los más bajos hallados en el presente trabajo, por lo que podría ser factible que el papel de ambas enzimas fuera todavía pequeño en el momento de la maduración del ovocito, siendo su posible actividad y papel mayor a partir del ya descrito tercer trimestre de gestación (Mizutani *et al.*, 1982; Mustafa *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2009).

3. SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OBSERVADA EN LOS DISTINTOS LIQUIDOS FOLICULARES EXTRAÍDOS.

Como hemos venido comentando, existe un gran desconocimiento sobre el papel que juegan las peptidasas en el aparato reproductor femenino. Solo un estudio previo (Romeu, 2014), analizó los niveles enzimáticos en líquido folicular a diferentes edades de la mujer y con diversas patologías. En este trabajo describimos y analizamos la actividad peptidérgica en el líquido folicular de mujeres sometidas a fecundación *in vitro*, midiendo las actividades en tres líquidos foliculares de cada paciente, ya que recientemente se ha descrito (Armijo, 2015) que la composición de los LF de distintas punciones en la misma paciente pueden tener metabolismos (niveles bioquímicos) diferentes. Además, algunos autores (Revelli *et al.*, 2009) plantean la necesidad de que cada folículo individual debe ser aspirado también individualmente con el fin de poder correlacionar el contenido folicular con la calidad

ovocitaria, y todo ello a pesar de los problemas que ello puede causar tanto al facultativo como a la paciente. Si la composición bioquímica del LF pudiera pronosticar el estado fértil de la mujer, podríamos considerarla un indicador de fertilidad fácil, repetitivo y fiable. Pero claro, para ello por un lado las diferencias bioquímicas entre las distintas extracciones foliculares tendrían que ser claramente significativas, y/o por otro las diferencias entre los líquidos que contuvieran gameto tendrían también que ser claramente significativas en relación con aquellos que no los tuvieran. Ya que es realizable una comparación de cada extracción entre sí pero de la misma paciente, debido a que haciendo un estudio estadístico de extracciones: ¿porqué la primera extracción no es la tercera y la segunda la primera?

Intentaremos discutir sobre estos planteamientos. En primer lugar, al realizar una comparativa (simplemente visual, no estadística) de las actividades foliculares de la misma paciente (es decir, cada una de las extracciones entre sí pero en la misma paciente, por tanto, $n = 1$), no pudimos observar ninguna diferencia de actividad clara en ninguno de los enzimas ensayados. A continuación ampliamos el estudio estadístico comparando los niveles de actividad peptidérgica hallados en las tres extracciones, que fueron denominadas extracción E1, E2 y E3. Los resultados obtenidos no muestran diferencias apreciables de actividad entre la media de las actividades enzimáticas de los dos primeros líquidos foliculares de cada paciente y las medias obtenidas al estudiar cada líquido folicular por separado (denominados, como decimos, en los resultados como extracción 1 y 2). Es decir, los mayores niveles de actividad se siguen observando en DPPIV, seguidos de NEP y los más bajos de PEP.

Sin embargo, al comparar la primera y segunda extracción (en las que en ningún caso hay diferencias significativas) con la tercera, apreciamos (con una significación pequeña) un descenso en la actividad a nivel de aminopeptidasa ácida, prolil endopeptidasa y cistil aminopeptidasa. Estas diferencias, como presentaremos más adelante, no parecen relacionadas con la presencia o ausencia de ovocito en el líquido folicular.

Como hemos comentado, un estudio previo presentado como Comunicación en la SEF (Armijo, 2015), describía diferentes niveles de estrógenos dependiendo del líquido folicular extraído. Hemos descrito que la APA está disminuida en una de las extracciones, lo cual puede resultar coincidente con los resultados obtenidos por Harata y colaboradores en el año 2006, los cuales 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. Es decir, la modificación en la actividad aminopeptidásica observada puede verse reflejada en cambios en los niveles de las hormonas sexuales femeninas. No olvidemos que el ser una de las angiotensinasas 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 (Angiotensina II) podrían erigirse como dos factores decisivos del microambiente folicular.

En relación con la Cys-AP y la PEP, ya hemos comentado anteriormente como son los enzimas que participan en la regulación de los niveles oxitocinérgicos, siendo la funcionalidad principal propuesta para este péptido el útero grávido. A pesar de que fue en 2004 cuando Demaegdt identificó la Cys-AP en la membrana de las células ováricas del *hamster* Chino, poco o nada se sabe acerca de su función en dicho compartimento. El trabajo presentado por Romeu en 2014 fue el primer estudio llevado a cabo en mujeres que demostró la presencia de Cys-AP en el ovario humano, concretamente, en la fracción soluble del LF. Por ello se propuso que 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.

En relación con la PEP, tal y como describieron Kimura y colaboradores (Kimura *et al.*, 1998), la importancia de la misma radicaría en las primeras etapas de la foliculogénesis, es decir, en el desarrollo de folículos pre-antrales.

Con todo lo anterior, y a pesar de las pequeñas diferencias apreciadas (y de la discusión que hemos realizado), podríamos deducir que la importancia relativa de cada uno de los enzimas ensayados es independiente del líquido extraído. Se mantienen los niveles de actividad, es decir, la importancia relativa de cada uno de los enzimas ensayados es independiente de la extracción: en las actividades estudiadas, no se aprecian diferencias en ninguno de los ensayos analizados. Esta situación quizá no debería ser sorprendente, ya que solo quiere decir que el líquido que cobija a los gametos no se ve afectado. Otro aspecto sería ver si existe diferencia

significativa al comparar dos a dos cada uno de los enzimas analizando si el LF presenta o no gameto, es decir, cobija o no ovocito. En primer lugar realizamos una comparativa porcentual de la presencia o no de ovocito en cada uno de los líquidos extraídos. Así, realizando una media estadística, observamos cómo en la primera extracción el 58% de los líquidos tenían ovocito, en la segunda el 55% y en la tercera el 57%. Es decir, no hubo prácticamente diferencia porcentual en la cantidad de gametos presentes en cada extracción. Otro asunto sería si apreciáramos diferencias entre líquidos que cobijaran ovocito al compararlos con los que no lo cobijaran y, en caso de haberla, podríamos otorgar alguna explicación más clara a las pequeñas diferencias observadas en la tercera extracción. Sin embargo, tal y como hemos presentado en el apartado de Resultados, en ningún caso aparecen significaciones al comparar las diferentes actividades de los líquidos foliculares que presentaban folículo frente a los que no lo tenían.

Por todo lo anterior, parece que no existen diferencias claras en el metabolismo peptídico estudiado en el presente trabajo entre los líquidos foliculares de las mismas pacientes, ni siquiera en los casos en que llegan a contener gameto o no. Es decir, el líquido antral que cobija los ovocitos parece ser, al menos en este caso, estable.

4. SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN RELACIÓN CON LA EDAD DE LA MUJER.

En las últimas décadas se ha visto un incremento en la edad media de la mujer en el parto; las TRA han contribuido en el aumento de embarazo en las mujeres mayores de 40 años. La edad avanzada de la madre se ha asociado con resultados perinatales y maternos

adversos; algunas de estas complicaciones están relacionadas por sí solas con el envejecimiento, mientras que otras pueden coexistir de forma independiente. Está claro que la fertilidad decrece a partir de los 35 años y que esta asocia una mala calidad ovocitaria, junto con una disminución de la reserva ovárica y un ambiente hormonal alterado; además de esto, a mayor edad se asocian más antecedentes médicos y quirúrgicos que pueden afectar a la fertilidad mediante varios mecanismos. En los embarazos de mujeres de edad avanzada encontramos más riesgo de aborto espontáneo, embarazo ectópico, anomalías cromosómicas, malformaciones congénitas y complicaciones obstétricas (mayor riesgo de preeclampsia, diabetes gestacional, alteraciones placentarias, mortalidad fetal y perinatal, embarazo múltiple y tasa de cesáreas). Por todo ello, es necesaria la consulta preconcepcional y un buen control gestacional, identificando e intentando minimizar los posibles factores de riesgo y tratando precozmente las complicaciones gestacionales. De hecho se ha descrito como uno de los principales culpables del descenso de la fertilidad femenina el denominado “envejecimiento ovocitario” (Faddy *et al.*, 1992; Ballesteros *et al.*, 2009; Roméu *et al.*, 2012; Gossett *et al.*, 2013). En el año 2014 Roméu describió el comportamiento de las nueve peptidasas en el LF de mujeres sin problemas reproductivos, teniendo en cuenta cinco rangos de edad. Observó como las enzimas APN, DPPIV, APA, PEP y PGI no mostraron cambios significativos de actividad con respecto a la edad, mientras que se apreciaban modificaciones estadísticamente significativas en PSA, APB, Cys-AP y Asp-AP a partir de los 40 años de edad de la mujer.

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado un grupo de mujeres menores de 39 años y hemos comparado las actividades

enzimáticas con las de mujeres mayores de 40 años. De manera similar, y corroborando los resultados de Roméu, apreciamos diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de PSA en ambos grupos de pacientes. Describimos también por vez primera que la endopeptidasa neutra muestra un descenso significativo en mujeres mayores de 40 años. No hemos podido apreciar diferencias estadísticas (aunque sí tendencia) en APB, Cys- y APA, si bien ya Roméu expuso que los resultados de estas enzimas no revelaban una tendencia clara, por lo que no se atrevían a especular sobre estos resultados. Tampoco observamos diferencias significativas en APN, PEP, ASP y DPPIV.

Sin embargo, con referencia a la peptidasa PSA, ésta parece resultar un enzima clave, ya que observamos una clara variación de su actividad en función de la edad. Así, el subgrupo de pacientes de 40 o más años reveló un incremento significativo de actividad en comparación con los niveles de edad inferior. Además, y nuevamente de acuerdo con Roméu, se constata que la actividad de la enzima PSA se correlaciona de forma positiva con la edad de la mujer. Por todo ello, parece corroborarse el hecho de que 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.*, 2003).

Y otro aspecto importante que parece corroborar este resultado es el innegable papel que los péptidos opioides endógenos juegan en la fertilidad femenina, ya que la PSA representa, junto con la APN (perteneciente incluso a la misma familia de metalopeptidasas), APB

(un poco más inespecífica) y NEP, el principal enzima regulador de los niveles encefalinérgicos.

La PSA hidroliza preferentemente residuos de alanina del extremo N-terminal de muchos oligopéptidos, siempre y cuando tengan menos de 13 aminoácidos, aunque también podría 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). Por todo ello entre los principales sustratos activos de esta enzima se encuentran las encefalinas, endorfinas y dinorfinas (Gros *et al.*, 1985b; McLellan *et al.*, 1988), es decir, péptidos opioides endógenos.

Se trata además de un enzima principalmente soluble (Tobler *et al.*, 1997), lo que cuadra completamente con los niveles observados en LF. En cerebro bovino ha sido caracterizada y purificada *in vivo* como una encefalinasa extracelular (Hersh y McKelvy, 1981), pero por ello, al ser considerada una enzima citoplasmática, se desconoce su función exacta en el metabolismo opioidoinérgico (Dyer *et al.*, 1990; Constam *et al.*, 1995). El grupo de Tomoharu Osada (Osada *et al.*, 2001) demostró que ratas transgénicas deficientes de PSA presentaban infertilidad ya que eran incapaces de formar y mantener el cuerpo lúteo del embarazo. Por todo ello, 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 (Subiran *et al.*, 2011; Agirregoitia *et al.*, 2012). Y todo el proceso madurativo podría verse alterado a partir de los cuarenta años de edad de la mujer.

Como hemos mencionado, la NEP (otro de los principales enzimas implicados en la regulación de los niveles opioidérgicos), también se ve significativamente alterada a partir de los 40 años. Pero como también hemos presentado, se trata de la primera vez que se describen los niveles de neprilisina en líquido folicular humano, por lo que sólo podríamos deducir que esta proteína está efectivamente implicada en los procesos de fertilidad femenina, posiblemente con alguna relación en el control de los niveles de opioides endógenos.

5. SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN RELACIÓN CON LA PATOLOGÍA.

Para este apartado, hemos clasificado tres grupos de pacientes: un primero que serviría como grupo control (personas donantes sanas), un segundo grupo de pacientes clasificadas como Esterilidad de Origen Desconocido (EOD) y un tercer grupo de pacientes con Endometriosis.

El grupo EOD, también conocido como Esterilidad sin causa aparente (ESCA), nos serviría (en su caso) como control de resultados obtenidos, ya que tras el pertinente estudio de fertilidad ninguno de los dos miembros de la pareja presenta problemas reproductivos. La prevalencia de esta alteración está constantemente a debate, ya que en el estudio básico no se diagnostican múltiples causas que pueden generar una subfertilidad asociada (alteraciones leves en la función tubárica, alteraciones a nivel espermático, imposibilidad del estudio del ovocito de la mujer, etc.). Por estos motivos existen autores que creen que el término EOD debería

desaparecer, puesto que depende de la cantidad y calidad de pruebas que se les realicen a las parejas (Gleicher y Barad, 2006). De hecho, 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). Por tanto, sería un excelente resultado, desde un punto de vista meramente bioquímico, que no hubiera diferencias significativas entre el grupo EOD y el grupo fértil. Lo veremos más adelante.

Por otro lado, la endometriosis se define como tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. El dolor crónico y la esterilidad son las dos mayores expresiones de esta enfermedad. (Pérez-Millán *et al.*, 2009). La encontramos en mujeres en edad reproductiva alrededor del 2.5% a 3.3%, de todas las etnias y grupos sociales. En estudio de fertilidad lo diagnosticamos en aproximadamente el 20-68% de las mujeres. (Fernández y Alborzoz, 2010). El compromiso de la fertilidad en la mujer en los estadios avanzados se entiende por la distorsión anatómica, la formación de adherencias y la destrucción de órganos y estructuras pélvicas; sin embargo en los estadios iniciales se postulan etiologías multifactoriales. La participación de mediadores inflamatorios en el fluido peritoneal (FNT-alfa, EFG, VEGF e IL-1, IL-6 e IL-8) así como la expresión de marcadores moleculares endometriales que comprometerán negativamente la calidad del ovocito, su captura por la trompa, la interacción con el espermatozoide, fecundación, desarrollo embrionario y en ocasiones la implantación. (Fernández y Alborzoz, 2010). Por todo lo anterior, se postula sobre la menor

calidad ovocitaria debido a un ambiente folicular adverso, repercutiendo de esta forma en una menor tasa de fecundación y del desarrollo embrionario posterior, provocando una menor tasa de implantación (Simón *et al.*, 1994; Garrido *et al.*, 2000; Pellicer *et al.*, 2001). Sería por ello enormemente interesante si en este caso de endometriosis aparecieran alteraciones en el metabolismo peptídico, ya que ello contribuiría a explicar parte de ese ambiente folicular adverso para la maduración ovocitaria.

Tal y como hemos presentado en los resultados, encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fértil con el de endometriosis en APB.

También hallamos diferencias significativas al comparar la actividad enzimática de APB, ASP, DPPIV y NEP al comparar el grupo EOD con el endometriosis.

Sin embargo, no hallamos alteraciones estadísticamente significativas al comparar el grupo fértil con el de esterilidad de origen desconocido.

Todo lo anterior parece confirmar la hipótesis de partida: en las personas donantes (fértils sin patología) y en las pacientes con Esterilidad sin Causa Aparente, no hay alteraciones apreciables en el metabolismo peptídico folicular, dado que el microambiente que cobija los gametos es estable. No ocurre así al estudiar el comportamiento del líquido folicular en pacientes con endometriosis, en el que se aprecian alteraciones en prácticamente todos los metabolismos peptídicos estudiados (remarcando el caso del sistema opioidérgico local, claramente afectado). Desde el principio se postulaba que la menor calidad ovocitaria era debida a un ambiente folicular adverso, repercutiendo de esta forma en una menor tasa de fecundación y del desarrollo embrionario posterior, provocando una

menor tasa de implantación.

6. SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN RELACIÓN CON EL ÉXITO REPRODUCTIVO. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS.

Según se comentó en el apartado de resultados se obtuvo una tasa de fecundación > 90% en nuestro estudio. Por tanto, el grupo de ovocito que no consiguieron fecundarse tuvo una N muy baja, aun así realizamos la comparación, no detectándose valores diferentes en ningún grupo, al menos que fueran estadísticamente significativos; sí que se encontró un aumento de la actividad de Cys-AP en aquellos líquidos de cuyo ovocito resultó fecundado, algo más de 2 veces la actividad del grupo que no se fecundó.

También hemos mencionado en el apartado de Discusión de datos de actividades enzimáticas que la funcionalidad principal propuesta para la oxitocina es el útero grávido. Este péptido es uno de los agentes uterotónicos más potentes y es clínicamente utilizado para inducir el parto. De hecho, la Cys-AP ha sido considerada en humanos la peptidasa placentaria más importante a nivel de membrana; durante el embarazo se ha detectado en plasma una forma circulante, resultante del corte proteolítico llevado a cabo en el dominio extracelular de la peptidasa (Nomura *et al.*, 2005). Esta actividad 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).

Todos estos aspectos podríamos relacionarlos, aunque faltarían muchos estudios y una N mayor, con los que propuso Romeu en 2014, en el que el aumento de la actividad de Cys-AP en determinados líquidos foliculares nos podrían indicar que los ovocitos obtenidos de ellos tienen más opciones de poder fecundarse, siendo este aumento de actividad un intento del folículo de reducir las contracciones uterinas endometriales para poder mejorar la implantación embrionaria.

Cómo último parámetro, analizamos el resultado del tratamiento, o lo que es lo mismo la consecución de embarazo, con la actividad peptídica del líquido folicular. Seguimos observando la proporción que llevamos toda la discusión exponiendo, siendo DPPIV y NEP las de máxima actividad y la de menor fue PEP, en ambos grupos. En este análisis nos encontramos también con una N bastante baja, lo que limita los resultados del estudio, pero aún así se obtuvo algún resultado que comentaremos a continuación y que podrían llevar a análisis posteriores con N mayor.

Se obtuvieron dos resultados con significación estadística, siendo los niveles de APN y PSA casi dos veces menores en aquellos líquidos en los que el ovocito consiguió embarazo, del que no.

Cómo se comentó anteriormente, encontramos una correlación positiva con la actividad enzimática de PSA en relación a la edad materna, pudiendo relacionarla de la misma manera con la calidad ovocitaria. Siguiendo este patrón, observamos un aumento de la

actividad con significación estadística en el líquido de ovocitos que no consiguieron gestación. Por esto, podríamos especular sobre que de alguna manera la menor actividad opioidérgica en el LF (niveles elevados de PSA y APN), hace que exista mayor actividad o reactividad a nivel del líquido folicular, ayudando a que el ovocito presente una mayor calidad, mejorando sus posibilidades de dar un embarazo. Aún así, la variabilidad en los resultados, encontrados en la literatura, hacen complicado pensar que la actividad peptídica, al menos de las peptidasas descritas en este trabajo, puedan convertirse en un marcador de calidad ovocitaria o de resultado en un tratamiento de FIV. Hacen falta muchos estudios con un mayor número de pacientes para poder llegar a alguna conclusión.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1) Nuestra tasa de fecundación del 91%, se encuentra claramente por encima de los porcentajes esperados. Como factores que pueden influir en este parámetro encontramos la experiencia del embriólogo, las condiciones del laboratorio e incubador, la calidad ovocitaria y la movilidad espermática. Aunque es necesario comentar que en nuestros casos no existía factor masculino asociado, la mayor parte de los ciclos eran primeros ciclos, sin un tiempo muy prolongado de infertilidad y la edad media de todas las pacientes (sin contar el grupo control) fue de 36,4 años.

2) Todas las muestras de Líquido Folicular estudiadas presentaban actividad enzimática para las peptidasas APN, PSA, APB, APA, Asp-AP, Cys-AP, DPPIV, PEP y NEP. Los mayores niveles de actividad los encontramos en DPPIV y NEP.

3) Comparando los niveles de actividad peptidásica hallados en las tres extracciones, denominadas extracción E1, E2 y E3, los resultados obtenidos no muestran diferencias apreciables de actividad entre la media de las actividades enzimáticas de los líquidos foliculares de cada paciente. La importancia relativa de cada uno de los enzimas ensayados es independiente del líquido extraído. Esta situación no debería ser sorprendente, ya que solo quiere decir que el líquido que cobija a los gametos no se ve afectado.

4) En ningún caso aparecen significaciones al comparar las diferentes actividades de los líquidos foliculares que presentaban óvulo frente a los que no lo tenían. El líquido antral que cobija los

ovocitos parece ser, al menos en este caso, estable, independientemente de que contengan gameto o no.

5) En relación con la actividad observada al comparar rangos de edad superiores e inferiores a 39 años, apreciamos diferencias estadísticamente significativas de la PSA en ambos grupos de pacientes. Parece corroborarse el hecho de que esta actividad podría ser considerada un buen marcador de calidad folicular y, en consecuencia, de calidad ovocitaria. Describimos también por vez primera que la endopeptidasa neutra muestra un descenso significativo en mujeres mayores de 40 años. A partir de los 40 años se ve afectado el metabolismo opioidérgico.

6) Existen diferencias significativas al comparar el grupo fértil con el de endometriosis en APB. También se aprecian diferencias significativas al comparar la actividad enzimática de APB, ASP, DPPIV y NEP al comparar el grupo esterilidad de origen desconocido con el de endometriosis, pero no se aprecian alteraciones significativas al comparar el grupo fértil con el de esterilidad de origen desconocido. Esto parece confirmar que en las personas donantes (fértiles sin patología) y en las pacientes con Esterilidad sin Causa Aparente, no hay alteraciones apreciables en el metabolismo peptídico folicular, dado que el microambiente que cobija los gametos es estable. No ocurre así al estudiar el comportamiento del líquido folicular en pacientes con endometriosis, en el que se aprecian alteraciones en prácticamente todos los metabolismos peptídicos estudiados, remarcando el caso del sistema opioidérgico local, claramente afectado.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- A**girregoitia E, Peralta L, Mendoza R, Expósito A, Ereño ED, Matorras R, et al. Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2012; 24 (5):5 50–7.
- Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, et al. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91 (12): 4969–75.
- Agirregoitia N, Gil J, Ruiz F, Irazusta J, Casis L. Effect of aging on rat tissue peptidase activities. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2003; 58 (9): B792-797.
- Agirregoitia N, Irazusta A, Ruiz F, Irazusta J, Gil J. Ontogeny of soluble and particulate prolyl endopeptidase activity in several areas of the rat brain and in the pituitary gland. *Dev Neurosci*. 2003; 25 (5): 316–23.
- Alba F, Iribar C, Ramirez M, Arenas C. A fluorimetric method for the determination of brain aminopeptidases. *Arch Neurobiol (Madr)*. 1989; 52 (4): 169–73.
- Alborzi S, Zarei A, Alborzi S, Alborzi M. Management of ovarian endometrioma. *Clin Obstet Gynecol*. 2006; 49 (3): 480–91.
- Albrizio M, Guaricci AC, Calamita G, Zarrilli A, Minoia P. Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertil Steril*. 2006; 86 (6): 1776–9.
- Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Sciorsci RL, Mari G, Calamita G, et al. Expression and subcellular localization of the μ -opioid receptor in equine spermatozoa: Evidence for its functional role. *Reproduction*. 2005; 129 (1): 39–49.
- Angelisova P, Drbal K, Horejsi V, Cerny J. Association of CD10 / Neutral Endopeptidase 24 . 11 With Membrane Microdomains Rich in Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins and Lyn Kinase. *Blood*. 1999; 93 (4): 1437–9.
- Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2006; 1764 (11): 1775–85.
- Antczak C, De Meester I, Bauvois B. Ectopeptidases in pathophysiology. *BioEssays*. 2001; 23 (3): 251–60.

Aparicio MV. Fragmentación del ADN espermático y su relación con el metabolismo peptídico. Universidad del País Vasco; 2018.

Aparicio M, Irazusta J, Sanz B, Franco J, Subirán N, Valdivia A, et al. Peptidase activities in human astenozoospermic semen. *Hellyon* 2018a; pendiente de publicación.

Aparicio M, Rodríguez M, Subirán N, Arizaleta J, Hernández J, Casis L. Fragmentación del DNA espermático y sistema renina-angiotensina local. In: 32^o Congreso Nacional Sociedad Española de Fertilidad Madrid. 2018b.

Arday M, Calderon G, Cuadros J, Figueroa M, Herrer R, Moreno J. Criterios ASEBIR de la valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Segunda. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción; 2008.

Armijo M. Análisis de los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular para optimización de los resultados de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. In: Congreso de Sociedad Española de la Fertilidad. Barcelona; 2015.

Arteaga M, García I. Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 1^a. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2013.

Aurich-Costa J, Cadel S, Gouzy C, Foulon T, Cherif D, Cohen P. Assignment of the aminopeptidase B gene (RNPEP) to human chromosome 1 band q32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 79 (1–2): 143–4.

Babkova K, Korabecny J, Soukup O, Nepovimova E, Jun D, Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: Attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future Med Chem.* 2017; 9 (10): 1015–38.

Baker TG. A Quantitative and Cytologica Study of Germ Cells in Human Ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1963; 158:417.

Balasz J, Miró F, Burzaco I, Casamitjana R, Civico S, Ballescá JL, et al. Endocrinology: The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: Evidence from in-vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotrophic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 1995; 10 (7): 1678–83.

Ballesteros A, Castellón G, Sánchez I, Pozzobon C. Primera visita de esterilidad. In: Remohí J, Bellver J, Requena A, Pellicer A, editors. *Guía de Protocolos en Reproducción Humana.* 1st ed. Momento Médico Iberoamericana; 2009.

Balogh A, Cadel S, Foulon T, Picart R, Der Garabedian A, Rousselet A, et al. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Cell Sci.* 1998; 111: 161–9.

Barattini J, Raso D, Cogorno M, Lotti B, Neuspiller F. Edad y reproducción. In: Remohí, J; Bellver, J; Ferrando, M; Requena, A; Pellicer A, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 5^a. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2018. p. 17–29.

Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 2002; 77 (6): 1148–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23557756>

Barret A, Rawling N, Woessner J. Handbook of Proteolytic Enzymes. Segunda. Elsevier Academic Press; 2004. Vol. 1.

Baum M, MacHtinger R, Yerushalmi GM, Maman E, Seidman DS, Dor J, et al. Recurrence of empty follicle syndrome with stimulated IVF cycles. *Gynecol Endocrinol*. 2012; 28 (4): 293–5.

Belisle S, Petit A, Gallopayet N, Bellabarba D, Lehoux J, Lemaire S. Functional receptor sites in human placentas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 66 (2): 283–9.

Bhagwat S V., Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*. 2001; 97 (3): 652–9.

Blanco L. Alteraciones en la actividad enzimática, expresión tisular y expresión génica de peptidasas en neoplasias renales. Universidad del País Vasco; 2010.

Blanco L, Larrinaga G, Perez I, Lopez JI, Gil J, Agirregoitia E, et al. Acid, basic, and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *Am J Physiol Ren Physiol* [Internet]. 2008; 294 (4): F850-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216146>

Blanco L, Perez I, Sanz B, Gil J, López JI, Ugalde A, et al. Changes in cell-surface peptidase activity in papillary renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2010; 30 (4): 1137–41.

Blanco L, Sanz B, Perez I, Sánchez CE, Cándenas ML, Pinto FM, et al. Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms. *BMC Cancer*. 2014; 14 (1): 386.

Bodineau L, Frugièrè A, Marc Y, Inguibert N, Fassot C, Balavoine F, et al. Orally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure: A new strategy for treating hypertension. *Hypertension*. 2008; 51 (5): 1318–25.

Bogenrieder T, Finstad CL, Freeman RH, Papandreou CN, Scher HI, Albino AP, et al. Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue. *Prostate*. 1997; 33 (4): 225–32.

Bonilla-Musoles F. La realidad es más tozuda que la ficción. *Rev Iberoam Fertil*. 2010; 27 (1): 1–3.

Bonilla-Musoles F, Pellicer A. *Obstetricia, Reproducción y Ginecología Básicas*. Primera. Editorial Médica Panamericana; 2008.

Bosler JS, Davies KP, Neal-Perry GS. Peptides in seminal fluid and their role in infertility: A potential role for opiorphin inhibition of neutral endopeptidase activity as a clinically relevant modulator of sperm motility: A review. *Reprod Sci*. 2014; 21 (11): 1334–40.

Botella Llusia J. Controversies about luteal phase defects. *An R Acad Nac Med (Madr)*. 1995; 112 (1): 43–60.

Brown J, Farquhar C. *Endometriosis: An overview of Cochrane Reviews*. Vol. 2014, Cochrane Database of Systematic Reviews. 2014.

Bulletti C, Coccia M, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27: 441–7.

Bulletti C, Flamigni C, De Ziegler D. Uterine contractility and embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005; 17 (3): 265–76.

Bulletti C, Ziegler D De, Polli V, Del Ferro E, Palini S, Flamigni C. Characteristics of uterine contractility during menses in women with mild to moderate endometriosis. *Fertil Steril*. 2002; 77 (6): 1156–61.

Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, Midol-Monnet S, Noël N, et al. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997; 94 (7): 2963–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20305&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Cadel S, Piesse C, Gouzy-Dannon C, Cohen P, Foulon T. Arginyl Aminopeptidase. In: Hooper N, Lendeckel U, editors. *Aminopeptidases in Biology and Disease*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004. p. 113–26.

Cadel S, Pierotti AR, Foulon T, Créminon C, Barré N, Segrétain D, et al. Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Mol Cell Endocrinol*. 1995; 110 (1–2): 149–60.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. Ectopeptidases in tumour biology: A review. Vol. 21, *Histology and Histopathology*. 2006. p. 1339–53.

Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, Boileau G, Jeannotte L, DesGroseillers L, et al. Reduced Fertility in Male Mice Deficient in the Zinc Metalloproteinase NL1. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004; 24 (10): 4428–37. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.24.10.4428-4437.2004>

Carrera MDP, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Mayas MD, Martínez-Martos JM. Ovarian renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases are involved

in progesterone overproduction in rats with mammary tumours induced by N-methyl nitrosourea. *Anticancer Res.* 2009; 29(11): 4633–7.

Carrera MP, Ramírez-Expósito MJ, Valenzuela MT, García MJ, Mayas MD, Martínez-Martos JM. Glutamyl- but Not Aspartyl- Aminopeptidase Activity is Modified in Serum of N-Methyl Nitrosourea-induced Rat Mammary Tumours. *Anticancer Res.* 2004; 24 (2 B): 801–5.

Cerrillo M, Garcia-Velasco JA. ESTUDIO Y TRATAMIENTO DE LA DISFUNCIÓN REPRODUCTIVA DE ORIGEN DESCONOCIDO. Guías de práctica clínica SEF. p. GUÍA 12. Available from: <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/guiasPracticaClinicas/guia12.pdf>

Channing CP, Schaerf FW, Anderson LD, Tsafiri A. Ovarian follicular and luteal physiology. *Int Rev Physiol.* 1980; 22: 117–201.

Clark A, Roberts V, Gallety C, Tomlinson L, Norman R. Maximizing weight loss in the overweight infertile patient - A prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2000; 15: 65–6.

Cohen Y, Tannus S, Alzawawi N, Son WY, Dahan M, Buckett W. Poor ovarian response as a predictor for live birth in older women undergoing IVF. *Reprod Biomed Online.* 2018; 36 (4): 435–41.

Constam DB, Tobler AR, Rensing-Ehl A, Kemler I, Hersh LB, Fontana A. Puromycin-sensitive aminopeptidase: Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem.* 1995; 270 (45): 26931–9.

Constam DB, Tobler AR, Rensing-Ehl A, Kemler I, Hersh LB, Fontana A. Puromycin-sensitive aminopeptidase: Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem.* 1995; 270 (45): 26931–9.

Coulam CB, Bustillo M, Schulman JD. Empty follicle syndrome. *Fertil Steril.* 1986; 46 (6): 1153–5.

Cyrus Chu CY, Lee RD. On the evolution of intergenerational division of labor, menopause and transfers among adults and offspring. *J Theor Biol.* 2013; 332: 171–80.

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. Vol. 274, *Journal of Biological Chemistry.* 1999. p. 1865–8.

Dando PM, Barrett AJ. Aminopeptidase PS. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition.* 2004. p. 313–6.

Dando PM, Barrett AJ. Aminopeptidase PS. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition.* 2004. p. 313–6.

Dando P, Young N, Barrett A. Aminopeptidase PS: a widely distributed cytosolic peptidase. *Proteolysis Cell Funct.* 1997; 13: 88–95.

De Gandarias J, Echevarría E, Irazusta J, Gil J, Casis L. Brain aminopeptidase activity after subacute xylene exposure. *Neurotoxicol Teratol.* 1993; 15 (1): 51–3.

De Gandarias J, Irazusta J, Echevarria E, Casis L. Regulación de la liberación gonadotrópica hipofisaria: Papel de los enzimas proteolíticos. *Gac Médica Bilbao.* 1994a; 91 (3): 70–4.

De Gandarias J, Irazusta J, Varona A, Fernandez D, Gil J, Casis L. Effect of lithium treatments on the tyrosine-aminopeptidase activities in the rat brain and the pituitary gland. *Arzneimittelforschung [Internet].* 1999a; 49 (10): 816–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10554657

De Gandarias J, Irazusta J, Varona A, Gil J, Fernández D, Casis L. Effect of imipramine on enkephalin-degrading peptidases. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1999b; 9 (6): 493–9.

De Gandarias J, Irazusta J, Fernández D, Gallego M, Silió M, Casis L. Membrane-bound tyrosine aminopeptidase activities in the rat brain throughout the estrous cycle. *Life Sci.* 1996; 59 (13): 1097–101.

De Gandarias J, Irazusta J, Fernandez D, Varona A, Casis L. Developmental changes of pyroglutamate-peptidase activity in several regions of the female and the Male rat brain. *Int J Neurosci.* 1994b; 77 (1–2): 53–60.

De Gandarias J, Irazusta J, Gil J, Varona A, Ortega F, Casis L. Subcellular ontogeny of brain pyroglutamyl peptidase I. *Peptides.* 2000; 21 (4): 509–17.

De Gandarias J, Ramirez M, Echevarria E, Irazusta J, Casis L. Serum and brain aminopeptidase activities in cyclic rats. *Gen Physiol Biophys.* 1990; 9(4): 385–9.

De Mota N, Iturrioz X, Claperon C, Bodineau L, Fassot C, Roques BP, et al. Human brain aminopeptidase A: Biochemical properties and distribution in brain nuclei. *J Neurochem.* 2008; 106 (1): 416–28.

De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla J, Ferraretti A, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2012; 27 (4): 954–66.

De Souza ANC, Bruno JA, Carvalho KM. An enkephalin degrading aminopeptidase of human brain preserved during the vertebrate phylogeny. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp.* 1991; 99 (3): 363–7.

Dell'Aquila ME, Casavola V, Reshkin SJ, Albrizio M, Guerra L, Maritato F, et al. Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2002; 63 (2): 210–22.

Dell'Aquila ME, Cho YS, Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Minoia P. Immunofluorescence detection of the mu-opioid receptor in human oocytes. *Hum Reprod.* 2003; 18: 180.

Demaegdt H, Vanderheyden P, De Backer JP, Mosselmans S, Laeremans H, Le MT, et al. Endogenous cystinyl aminopeptidase in Chinese hamster ovary cells: Characterization by [¹²⁵I]Ang IV binding and catalytic activity. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(5): 885–92.

Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? In: *Animal Reproduction Science.* 2000. p. 743–52.

Dólleman M, Faddy MJ, Van Disseldorp J, Van Der Schouw YT, Messow CM, Leader B, et al. The relationship between anti-müllerian hormone in women receiving fertility assessments and age at menopause in subfertile women: Evidence from large population studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (5): 1946–53.

Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Vol. 368, *Lancet.* 2006. p. 1696–705.

Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H, Lambeir AM, Van Der Veken P, Augustyns K, et al. Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57 (6): 531–41.

Dyer SH, Slaughter CA, Orth K, Moomaw CR, Hersh LB. Comparison of the Soluble and Membrane-Bound Forms of the Puromycin-Sensitive Enkephalin-Degrading Aminopeptidases from Rat. *J Neurochem.* 1990; 54 (2): 547–54.

Edwards RG. FOLLICULAR FLUID. *Reproduction* [Internet]. 1974; 37 (1): 189–219. Available from: <http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/jrf.0.0370189>

Edwards R. Follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 1974; 37 (1): 189–219.

Erbeznik H, Hersh LB. A novel mammalian high-molecular-weight aminopeptidase. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 344 (1): 228–34.

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

Estomba H, Muñoa-Hoyos I, Gianzo M, Urizar-Arenaza I, Casis L, Irazusta J, et al. Expression and Localization of Opioid Receptors in Male Germ Cells and the Implication for Mouse Spermatogenesis. *PLoS One.* 2016; 11 (3): e0152162.

Fabbri A, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Steroid Biochem.* 1989; 32 (1 PART 2): 145–50.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992; 7 (10): 1342–6.

Felip R, Outomuro B, Guinart J, Pérez P. A comparative study of Recombinant, step-down and low-dose step-up ovulation induction regimens with Ovarian, FSH administration for non-assisted fertility treatment in patients with low Reserve. *Hum Reprod.* 2003; 18: 184.

Fernández-Atucha A, Echevarría E, Larrinaga G, Gil J, Martínez-Cengotitabengoa M, González-Pinto AM, et al. Plasma peptidases as prognostic biomarkers in patients with first-episode psychosis. *Psychiatry Res.* 2015; 228 (2): 197–202.

Fernández D. Papel de las aminopeptidasas cerebrales en la liberación de gonadotropinas. Universidad del País Vasco; 1996.

Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides.* 2002; 23 (3): 461–8.

Fernández E, Alborzoz J. Endometriosis e infertilidad. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2010; 21 (3): 403–8.

Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011; 26 (7): 1616–24.

Ferro ES, Hyslop S, Camargo ACM. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. *J Neurochem.* 2004; 91 (4): 769–77.

Fink G. Oestrogen and progesterone interactions in the control of gonadotrophin and prolactin secretion. *J Steroid Biochem.* 1988; 30 (1–6): 169–78.

Florentin D, Sassi A, Roques BP. A highly sensitive fluorometric assay for "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins. *Anal Biochem.* 1984; 141 (1): 62-9.

Foresta C, Tamarin A, Scandellari C, Arslan P. Effects of a met-enkephalin analogue on motility, O₂ consumption, and ATP content of human spermatozoa. *Arch Adrol.* 14 (2-3): 247-52.

Foulon T, Cadel S, Piesse C, Cohen P. Aminopeptidase B. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 2004.

Foulon T, Cadel S, Chesneau V, Draoui M, Prat A, Cohen P. Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: Functional properties, structure, and cellular distribution. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 780: 106–20.

Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Moretti C, Bonifacio V, Isidori A, et al. Naloxone increases bioactive LH in man: evidence for selective release of early LH pool. *J Endocrinol Investig Off J Ital Soc Endocrinol.* 1985; 8 (6): 513–7.

Fraioli F, Panerai AE, Santoro C, Fabbri A, Isidori A. Control of gonadotropin secretion in man: Role of opioid peptides. *Horm Metab Res.* 1982; 14 (6) :312–6.

Fujimura H, Ino K, Nagasaka T, Nakashima N, Nakazato H, Kikkawa F, et al. Aminopeptidase A expression in cervical neoplasia and its relationship to neoplastic transformation and progression. *Oncology.* 2000; 58 (4): 342–52.

Fujisawa M, Bardin CW, Morris PL. A germ cell factor(s) modulates preproenkephalin gene expression in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1992; 84 (1–2): 79–88.

Fujisawa M, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Metenkephalin in seminal plasma of infertile men. *Int J Urol.* 1996; 3 (4): 297–300.

Fujiwara H, Imai K, Inoue T, Maeda M, Fujii S. Membrane-bound cell surface peptidases in reproductive organs. *Endocr J.* 1999; 46 (1): 11–25.

Fujiwara H, Maeda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Takakura K, et al. Human luteal cells express dipeptidyl peptidase IV on the cell surface. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75 (5): 1352–7.

Fukasawa KM, Fukasawa K, Kanai M, Fujii S, Harada M. Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B. *J Biol Chem.* 1996; 271 (48): 30731–5.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264 (3): 224–36.

Gainer H, Russell JT, Loh YP. An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from β -lipotropin60-65. *FEBS Lett.* 1984; 175 (1): 135–9.

García-Horsman JA, Männistö PT, Venäläinen JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides.* 2007; 41 (1): 1–24.

Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. Vol. 6, *Human Reproduction Update.* 2000. p. 67–74.

Gass J, Khosla C. Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (3): 345–55.

Ghaddar G, Ruchon F, Carpentier L, Marcinkiewicz M, Seidah NG, Crine P, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metalloproteinase of the neprilysin family. *Biochem J.* 2000; 347: 419–29.

Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? *Hum Reprod.* 2006; 21 (8): 1951–5.

Glenner GG, McMillan PJ, Folk JE. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal α -L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature.* 1962; 194 (4831): 867.

Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1971; 110: 644.

Gonzalès J, Lesourd S, Van Dreden P, Richard P, Lefèbvre G, Vauthier Brouzes D. Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet.* 1992; 9 (3): 211–6.

Goossens FJ, Wauters JG, Vanhoof GC, Bossuyt PJ, Schatteman KA, Loens K, et al. Subregional mapping of the human lymphocyte prolyl oligopeptidase gene (PREP) to human chromosome 6q22. *Cytogenet Genome Res.* 1996; 74 (1–2): 99–101.

Goossens F, De Meester I, Vanhoof G, Scharpé S. Distribution of Prolyl Oligopeptidase in Human Peripheral Tissues and Body Fluid. *Clin Chem Lab Med.* 1996; 34 (1): 17–22.

Gossett DR, Nayak S, Bhatt S, Bailey SC. What do healthy women know about the consequences of delayed childbearing? *J Health Commun.* 2013; 18 (SUPPL. 1): 118–28.

Goto Y, Hattori A, Ishii Y, Mizutani S, Tsujimoto M. Enzymatic properties of human aminopeptidase A: Regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV. *J Biol Chem.* 2006; 281 (33): 23503–13.

Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clin Chem.* 1988; 34 (12): 2499–501.

Goverde A, Mc Donnell J, Vermeiden J, Schats R, Rutten F, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilization in idiopathic subfertility: a randomized trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet.* 2000; (9197): 13–8.

Green BD, Flatt PR, Bailey CJ. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res.* 2006; 3 (3): 159–65.

Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10-14mole. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962; 9 (5): 430–5.

Gros C, Giros B, Schwartz JC. Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: Identification of aminopeptidase M. *Neuropeptides.* 1985b; 5 (4–6): 485–8.

Gros C, Giros B, Schwartz JC. Identification of Aminopeptidase M as an Enkephalin-Inactivating Enzyme in Rat Cerebral Membranes. *Biochemistry.* 1985a; 24 (9): 2179–85.

Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, et al. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95 (5): 2552–7.

Hallberg M, Le Grevés P, Nyberg F. Neuropeptide processing. In: Lendeckel, N.M.; Hooper U, editor. *Proteases in the Brain.* Primera. Springer Science; 2005. p. 203–34.

Hannula MJ, Myöhänen TT, Tenorio-Laranga J, Männistö PT, Garcia-Horsman JA. Prolyl oligopeptidase colocalizes with α -synuclein, β -amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience.* 2013; 242: 140–50.

Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. 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. *Fertil Steril.* 2006; 86 (2): 433–9.

Harb HM, Gallos ID, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: A systematic review and meta-analysis. Vol. 120, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2013. p. 1308–20.

Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, et al. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: Its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology.* 2002; 122 (2): 376–86.

Hassan E, Creatsas G, Mastorakos G, Michalas S. Clinical implications of the ovarian/endometrial renin-angiotensin-aldosterone system. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 900: 107–18.

Havre P, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang N. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008; 13: 1634–45.

Hersh L, McKelvy J. An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J Neurochem.* 1981; 36 (1): 171–8.

Hiroi Y, Endo Y, Natori Y. Purification and properties of an aminopeptidase from rat-liver cytosol. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 294 (2): 440–5.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. Vol. 32, *Cardiovascular Research*. 1996. p. 687–98.

Hopsu VK, Mäkinen KK, Glenner GG. Characterization of aminopeptidase B: Substrate specificity and affector studies. *Arch Biochem Biophys*. 1966; 114 (3): 567–75.

Horio J, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Nakanishi Y, Kumano Y, et al. Structural organization of the 5'-end and chromosomal assignment of human placental leucine aminopeptidase/insulin-regulated membrane aminopeptidase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 262 (1): 269–74.

Huang K, Takahara S, Kinouchi T, Takeyama M, Ishida T, Ueyama H, et al. Alanyl aminopeptidase from human seminal plasma: Purification characterization, and immunohistochemical localization in the male genital tract. *J Biochem*. 1997; 122 (4): 779–87.

Hui KS. Brain-specific aminopeptidase: From enkephalinase to protector against neurodegeneration. *Neurochem Res*. 2007; 32 (12): 2062–71.

Hwang SR, O'Neill A, Bark S, Foulon T, Hook V. Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: Molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J Neurochem*. 2007; 100 (5): 1340–50.

Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Kariya M, Takakura K, Kanzaki H, et al. Dipeptidyl peptidase IV as a differentiation marker of the human endometrial glandular cells. *Hum Reprod*. 1992; 7 (9): 1189–94.

Ino K, Uehara C, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Suzuki T, et al. Enhancement of aminopeptidase A expression during Angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT1receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (8): 3973–82.

Irazusta J, Larrinaga G, González-Maeso J, Gil J, Meana JJ, Casis L. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem Int*. 2002; 40 (4): 733–9.

Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl*. 2004; 25 (5): 733–9.

Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yoshida S, Hioki T, Tatematsu M, et al. Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 2001; 92 (1): 49–54.

Ito T, Nomura S, Okada M, Katsumata Y, Iwase A, Kikkawa F, et al. Transcriptional regulation of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene. *Mol Hum Reprod*. 2001; 7 (9): 887–94.

Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem*. 1998; 124 (2): 428–33.

Jia-rong Z, Shuang-di L, Xiao-ping W. Eutopic or Ectopic Pregnancy: A Competition between Signals Derived from the Endometrium and the Fallopian Tube for Blastocyst Implantation. *Placenta*. 2009; 30 (10): 835–9.

Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, Hu Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2001; 98 (4): 1930–4. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.98.4.1930>

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

Kalra S. Hypothalamic opioid systems and reproduction—physiological considerations. *Hormones in Gynecological Endocrinology*.; 1992.

Kamath MS, Bhattacharya S. Demographics of infertility and management of unexplained infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012; 26 (6): 729–38.

Kaminski T, Siawrys G, Bogacka I, Okrasa S, Przala J. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim Reprod Sci*. 2003; 78 (1–2): 71–84.

Kandror K V., Yu L, Pilch PF. The major protein of GLUT4-containing vesicles, gp160, has aminopeptidase activity. *J Biol Chem*. 1994; 269 (49): 30777–80.

Karbowiak T, Gougeon RD, Rigolet S, Delmotte L, Debeaufort F, Voilley A. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. *Food Chem*. 2008; 106 (4 SPEC. ISS.): 1340–9.

Kazlauskas S, Coroleu B, Bajo J. Esterilidad: definiciones, epidemiología y etiología. In: Coroleu, B; Bajo J, editor. *Fundamentos de Reproducción*. SEGO; 2009. p. 41–8.

Kehoe PG, Hibbs E, Palmer LE, Miners JS. Angiotensin-III is Increased in Alzheimer's Disease in Association with Amyloid- β and Tau Pathology. *J Alzheimer's Dis*. 2017; 58 (1): 203–14.

Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem*. 1995; 270 (40): 23612–8.

Kelly JA, Neidle EL, Neidle A. An Aminopeptidase from Mouse Brain Cytosol That Cleaves N-Terminal Acidic Amino Acid Residues. *J Neurochem*. 1983; 40 (6): 1727–34.

Kenny J. Cell surface peptidases are neither peptide- nor organ-specific. Vol. 11, *Trends in Biochemical Sciences*. 1986. p. 40–2.

Keppler D, Walter R, Pérez C, Sierra F. Increased expression of mature cathepsin B in aging rat liver. *Cell Tissue Res*. 2000; 302 (2): 181–8.

Kerr MA, Kenny AJ. The Purification and Specificity of a Neutral Endopeptidase from Rabbit Kidney Brush Border. *Biochem J*. 1974; 137 (3): 477–88.

Khatun A, Rahman MS, Ryu DY, Kwon WS, Pang MG. Elevated aminopeptidase N affects sperm motility and early embryo development. *PLoS One*. 2017; 12 (8).

Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nomura S, Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2005; 1751 (1): 45–51.

Kimura A, Matsui H, Takahashi T. Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility. *Zool Sci [Internet]*. 2002; 19 (1): 93–102. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12025410

Kimura A, Ohnishi J, Okimura H, Hamabata T, Takahashi T. Localization of prolyl endopeptidase mRNA in small growing follicles of porcine ovary. *Mol Reprod Dev*. 1998; 50 (2): 121–7.

Kioussi C, Crine P, Matsas R. Endopeptidase-24.11 is suppressed in myelin-forming but not in non-myelin-forming schwann cells during development of the rat sciatic nerve. *Neuroscience*. 1992; 50 (1): 69–83.

Kuroda Y, Kataoka N, Hashimoto H, Mizusawa Y, Chiba M, Tokura Y, et al. The impact of endometriotic ovarian cysts on assisted reproductive technology and ovarian reserve. *J Mamm Ova Reserv*. 2012; 54: 34.

Larrinaga G, Blanco L, Sanz B, Perez I, Gil J, Unda M, et al. The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival. *AJP Ren Physiol [Internet]*. 2012; 303 (12): F1584–91. Available from: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajprenal.00477.2012>

Larrinaga G, Pérez I, Blanco L, López JI, Andrés L, Etxezarraga C, et al. Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia. *Regul Pept*. 2010; 163 (1–3): 102–6.

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Irazusta A, Zarrazquin I, Sanchez CE, et al. 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. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011a; 75 (11): 1399–403.

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Zarrazquin I, Casis L, Anta JA, et al. Altered dipeptidyl peptidase IV and prolyl endopeptidase activities in chronic tonsillitis, tonsillar hyperplasia and adenoid hyperplasia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011b; 75 (3): 347–50.

Lauffart B, McDermott JR, Jones P, Mantle D. Amino acid inhibition of aminopeptidases purified from human cerebral cortex. *Biochem Soc Trans*. 1988; 16 (5): 849–50.

Laustsen PG, Rasmussen TE, Petersen K, Pedraza-Diaz S, Moestrup SK, Gliemann J, et al. The complete amino acid sequence of human placental oxytocinase. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 1997; 1352 (1): 1–7.

Letarte M. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med [Internet]*. 1988; 168 (4): 1247–53. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.168.4.1247>

Leung PS, Sernia C. The renin-angiotensin system and male reproduction: New functions for old hormones. *J Mol Endocrinol*. 2003; 30 (3): 263–70.

Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol*. 2007; 580 (1): 31–7.

Li J, Wilk E, Wilk S. Inhibition of prolyl oligopeptidase by Fmoc-aminoacylpyrrolidine-2-nitriles. *J Neurochem [Internet]*. 1996; 66 (5): 2105–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780042>

Linardi A, Panunto PC, Ferro ES, Hyslop S. Peptidase activities in rats treated chronically with N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Biochem Pharmacol*. 2004; 68 (2): 205–14.

Lindner C, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, Bettendorf G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metab Res [Internet]*. 1988; 20 (4): 243–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3397036

Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG. Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: An optimal and practical panel for differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131 (8): 1290–7.

Lodja Z, Gossrau R. Study on aminopeptidase A. *Histochemistry*. 1980; 67 (3): 267–90.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest.* 1989; 83 (4): 1299–307.

López M. Calidad folicular: Agonistas versus antagonistas de la GnRH en una población de buen pronóstico. Hospital Universitario Virgen de las Nieves; 2008.

López N, Armijo O, González C, Gómez R, Díaz-Almirón M. Hormonas esteroideas foliculares y su relación con los resultados globales del ciclo de estimulación ovárica. *Rev Chil Obstet y Ginecol.* 2014; 79 (6): 473–80.

Luan Y, Xu W. The Structure and Main Functions of Aminopeptidase N. *Curr Med Chem* [Internet]. 2007; 14 (6): 639–47. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=14&issue=6&spage=639>

Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett.* 1988; 229 (1): 206–10.

Mantle D, Hardy MF, Lauffart B, McDermott JR, Smith a I, Pennington RJ. Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle. *Biochem J.* 1983; 211 (3): 567–73.

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

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

Marcel D, Pollard H, Verroust P, Schwartz JC, Beaudet A. Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (EC 3.4.24.11) in the neostriatum of the rat. *J Neurosci* [Internet]. 1990; 10 (8): 2804–17. Available from: <papers3://publication/uuid/442167DE-43B9-430D-8305-3A0001EB3C8D>

Marchio S, Lahdenranta J, Schlingemann R, Valdembri D, Wesseling P, Arap M, et al. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell.* 2004; 5 (2): 151–62.

Marcus SF, Brinsden PR. Analysis of the incidence and risk factors associated with ectopic pregnancy following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1995; 10 (1): 199–203.

Mari G, Rizzato G, Iacono E, Merlo B, Minoia, Belluzzi S. Effects of beta-endorphin and naloxone on motility of cooled equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2005; 89 (1–4): 223–5.

Maroulis G. Effect of aging on fertility and pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol.* 1991; 9 (3): 165–75.

Martínez-Salazar J, Cerrillo M, Ferrando M. Tratamiento quirúrgico de la endometriosis. In: Remohí, J; Bellver, J; Domingo, J; Bosch, E; Pellicer A, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 3^a. McGraw-Hill; 2007. p. 75–83.

Matorras R, Crisol L, Garitano I, Ferrando M. Epidemiología de la esterilidad. In: Remohí, J; Bellver, J; Ferrando, M; Requena, A; Pellicer A, editor. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 5^a. Editorial Médica Panamericana; 2018. p. 5–17.

Matorras R, Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad. Madrid: Adalia; 2007.

Matsas R, Kenny AJ. Immunocytochemical localization of endopeptidase-24.11 in cultured neurons from pig striatum. *Neuroscience*. 1989; 31 (1): 237–46.

Matsas R, Stephenson SL, Hryszko J, Kenny AJ, Turner AJ. The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem J*. 1985; 231 (2): 445–9.

Matsumoto H, Rogi T, Yamashiro K, Kodama S, Tsuruoka N, Hattori A, et al. Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*. 2000; 267 (1): 46–52.

McLellan S, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB. Studies on the Tissue Distribution of the Puromycin-Sensitive Enkephalin-Degrading Aminopeptidases. *J Neurochem*. 1988; 51 (5): 1552–9.

Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. Vol. 14, *Trends in Molecular Medicine*. 2008. p. 361–71.

Minaretzis D, Harris D, Alper MM, Mortola JF, Berger MJ, Power D. Multivariate analysis of factors predictive of successful live births in in vitro fertilization (IVF) suggests strategies to improve IVF outcome. *J Assist Reprod Genet*. 1998; 15 (6): 365–71.

Mitsui T, Nomura S, Itakura A, Mizutani S. Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation. *Biol Pharm Bull [Internet]*. 2004; 27 (6): 768–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187414>

Mizutani S, Hayakawa H, Akiyama H, Sakura H, Yoshino M, Oya M, et al. Simultaneous determinations of plasma oxytocin and serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) during late pregnancy. *Clin Biochem*. 1982; 15 (3): 141–5.

Moeller I, Albiston AL, Lew RA, Mendelsohn FAO, Chai SY. A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [3H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT4receptor. *J Neurochem*. 1999; 73 (1): 301–8.

Molina R. Parámetros bioquímicos del líquido folicular y su relación con la fertilización in vitro de los ovocitos. Universidad de Granada; 1990.

Momeni N, Yoshimoto T, Ryberg B, Sandberg-Wollheim M, Grubb A. Factors influencing analysis of prolyl endopeptidase in human blood and cerebrospinal fluid: increase in assay sensitivity. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003; 63 (6): 387–95.

Moore K, Persaud T. *Embriología Clínica.* 8^a. McGraw-Hill; 1999.

Morain P, Boeijinga PH, Demazières A, De Nanteuil G, Luthringer R. Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers. *Neuropsychobiology.* 2007; 55 (3–4): 176–83.

Morain P, Robin JL, De Nanteuil G, Jochemsen R, Heidet V, Guez D. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *Br J Clin Pharmacol.* 2000; 50 (4): 350–9.

Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: A review. *Fertil Steril.* 2002; 77 (3): 433–44.

Muñoa I, Urizar I, Casis L, Irazusta J, Subirán N. The Epigenetic Regulation of the Opioid System: New Individualized Prompt Prevention and Treatment Strategies. *J Cell Biochem.* 2015; 116 (11): 2419–26.

Murakami H, Yokoyama A, Kondo K, Nakanishi S, Kohno N, Miyake M. Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (24): 8674–9.

Mustafa T, Chai SY, May CN, Mendelsohn FAO, Albiston AL. Oxytocinase/insulin-regulated aminopeptidase is distributed throughout the sheep, female reproductive tract and is regulated by oestrogen in the uterus. *Regul Pept.* 2004; 122 (2): 85–9.

Myohanen T, Kaariainen T, Jalkanen A, Piltonen M, Mannisto P. Localization of prolyl oligopeptidase in the thalamic and cortical projection neurons: A retrograde neurotracing study in the rat brain. *Neurosci Lett.* 2009; 450 (2): 201–5.

Nagatsu I, Gillespi L, Folk J, Glenner G. Serum aminopeptidases, “angiotensinase,” and hypertension. I. Degradation of angiotensin II by human serum. *Biochem Pharmacol.* 1965; 14 (5): 721–8.

Nanus DM. Of Peptides and Peptidases: The Role of Cell Surface Peptidases in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (17): 6307–9.

Nascimento-Silva MCL, Leal AT, Daffre S, Juliano L, da Silva Vaz I, Paiva-Silva G de O, et al. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus*

(*Boophilus*) microplus eggs. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2008; 149 (4): 599–607.

Nasmyth K. Disseminating the Genome: Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis. *Annu Rev Genet*. 2001; 35 (1): 673–745.

Nazari A, Askari HA, Check JH, O'Shaughnessy A. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancy in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1993; 60 (5): 919–21.

Nelson S, Messow M, McConnachie A, Wallace H, Kelsey T, Fleming R, et al. External validation of nomogram for the decline in serum anti-Mullerian hormone in women: a population study of 15,834 infertility patients. *Reprod Biomed Online*. 2011; 23 (2): 204–6.

Nemeth G, Pepperell J, Yamada Y, Palumbo A, Naftolin F. The basis and evidence of a role for the ovarian renin-angiotensin system in health and disease. *J Soc Gynecol Investig*. 1994; 1 (2): 118–27.

Nicolás M, Fernández L, Amorocho B, Mollà M, Landeras J. Prevención y tratamiento del embarazo múltiple. In: Remohí, J; Bellver, J; Ferrando, M; Requena, A; Pellicer A, editor. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción humana*. 5^a. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2017. p. 889–904.

Noble F, Roques BP. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2007; 11 (2): 145–59. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.11.2.145>

Nomura S, Ito T, Yamamoto E, Sumigama S, Iwase A, Okada M, et al. Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2005; 1751 (1): 19–25.

Nomura S, Tsujimoto M, Mizutani S. Cystinyl aminopeptidase, oxytocinase and insulin-regulated aminopeptidase. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition*. 2004. p. 307–11.

○ 'Cuinn G. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem Soc Trans*. 1998; 26 (3): 279–92.

Ocain TD, Rich DH. L-Lysinethiol: A subnanomolar inhibitor of aminopeptidase B. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 145 (3): 1038–42.

Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*. 2010; 25 (12): 2944–54.

Oleary R, Gallagher S, Oconnor B. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996; 28 (4): 441–9.

Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* (80-) [Internet]. 1977; 196 (4288): 441–4. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/196/4288/441>

Onofriescu A, Bors A, Luca A, Holicov M, Onofriescu M, Vulpoi C. GnRH Antagonist IVF Protocol in PCOS. *Curr Heal Sci J.* 2013; 39 (1): 20–5.

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

Osada T, Watanabe G, Sakaki Y, Takeuchi T. Puromycin-Sensitive Aminopeptidase Is Essential for the Maternal Recognition of Pregnancy in Mice. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2001b; 15 (6): 882–93. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.15.6.0644>

Pandian Z, Bhattacharya S. IVF for unexplained infertility. *Hum Reprod Update.* 2013; 19 (5): 431.

Pandian Z, Gibreel A, Bhattacharya S. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. Vol. 2015, *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2015.

Pascual I, García G, Sánchez L, Arzola L, Labrada N, Arrebola Y, et al. La Aminopeptidasa N de mamíferos: características bioquímicas, funciones fisiológicas y su implicación en procesos fisiopatológicos en humanos. *Rev Cuba Ciencias Biológicas.* 2015; 4 (1): 2–16.

Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet.* 2003; 112 (2): 195–203.

Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco JA, Remohí J, et al. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 943: 122–30.

Peralta L. Expresión y localización de los receptores opioides (δ , κ , μ) y los receptores cannabinoides (CB1, CB2) durante la reanudación de la meiosis en ovocitos humanos. Universidad del País Vasco; 2012.

Pérez-Millán F, Coroleu B, Bajo J. Endometriosis y Esterilidad. In: *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, editor. Fundamentos de Reproducción.* Madrid; 2009. p. 165–74.

Pérez I. Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en neoplasias colorrectales. Universidad del País Vasco; 2011.

Pérez I, Varona A, Blanco L, Gil I J, Santaolalla F, Zabala A, et al. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck-Journal Sci Spec Head Neck*. 2009; 31 (10): 1335–40.

Petraglia F, Comitini G, D'Ambrogio G, Volpe A, Facchinetti F, Alessandrini G, et al. Short-term effects of ovariectomy: the opioid control of LH secretion in fertile climacteric and postmenopausal women. *J Endocrinol Investig Off J Ital Soc Endocrinol*. 1985; 8 (4): 325–30.

Petraglia F, Facchinetti F, M'Futa K, Ruspa M, Bonavera JJ, Gandolfi F, et al. Endogenous opioid peptides in uterine fluid. *Fertil Steril*. 1986; 46 (2): 247–51.

Petraglia F, Di Meo G, Storchi R, Segre A, Facchinetti F, Szalay S, et al. Proopiomelanocortin-related peptides and methionine enkephalin in human follicular fluid: Changes during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 1987; 157 (1): 142–6.

Pham V, Burns P, Albiston AL, Yeatman HR, Ng L, Diwakarla S, et al. Reproduction and maternal behavior in insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) knockout mice. *Peptides*. 2009; 30 (10): 1861–5.

Pinto F, Ravina C, Subiran N, Cejudo-Roman A, Fernandez-Sanchez M, Irazusta J, et al. Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8: 104.

Polgár L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59 (2): 349–62.

Pro B, Dang N. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol*. 2004; 19 (4): 1345–51.

Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, et al. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood*. 2007; 110 (1): 37–44.

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

Ramírez-Expósito MJ, Martínez JM, Prieto I, Alba F, Ramírez M. Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Horm Metab Res*. 2000; 32 (5): 161–3.

Ramon M. Estudio de la actividad aminopeptidásica en espermatozoides astenozoospermicos. Comparación clínica. Departamento de Fisiología. Universidad del País Vasco. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco; 2011.

Rawlings N, Polgár L, Barrett A. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem J Lett*. 1991; 279: 907–8.

Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: An update and review of practice. *Reprod Biomed Online*. 2012; 24 (6): 591–602.

Re RN. Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. Vol. 42, *Hypertension*. 2003. p. 117–22.

Re RN. The origins of intracrine hormone action. *Am J Med Sci*. 2002; 323 (1): 43–8.

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

Registro SEF. Registro SEF: Técnicas de Reproducción Asistida (IA y FIV/ICSI) - 2011 [Internet]. 2013. Available from: https://www.registrosef.com/public/docs/sef2011_IAFIV.pdf. %0A

Registro SEF. Registro SEF: Técnicas de Reproducción Asistida (IA y FIV/ICSI) - 2015. 2015.

Reindollar RH, Regan MM, Neumann PJ, Levine BS, Thornton KL, Alper MM, et al. A randomized clinical trial to evaluate optimal treatment for unexplained infertility: The fast track and standard treatment (FASTT) trial. *Fertil Steril*. 2010; 94 (3): 888–99.

Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: From single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7: 40.

Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13 - Not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today*. 1999; 20 (2): 83–8.

Rodríguez Gallego M, Aparicio M, Arizaleta J, Hernández J, Casis L. El metabolismo opioidérgico no se ve alterado por la presencia/ausencia de ovocito en líquido folicular. In: 32^o Congreso Nacional Sociedad Española de Fertilidad Madrid. Madrid; 2018.

Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase: A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J Biol Chem*. 1996; 271 (1): 56–61.

Rogues BP, Beaumont A. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol Sci*. 1990; 11 (6): 245–9.

Roméu C, Irazusta J, Casis L. The role of peptidases in (in)fertility. *MOJ Anat Physiol*. 2018a; 5 (2): 110–5.

Roméu C, Lierta M, Chueca A, de Bonrosto C, Giménez I, Urries A, et al. Metabolismo peptídico en el líquido folicular: correlación clínica. *Rev Iberoam Fertil y Reprod*. 2014.

Roméu C, Lierta M, Chueca A, Sobreviela M, Urries A, Sanz B, et al. Variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular según la edad de la mujer. *Rev Iberoam Fertil y Reprod.* 2012; 29: 150–1.

Roméu C, Lierta M, Chueca A, Sobreviela M, Urries A, Sanz B, et al. Variación del metabolismo peptídico en el líquido folicular en mujeres patológicas. *Rev Embriol Clínica y Biol la Reprod.* 2013; 18 (2): 192.

Roméu C, Perez I, Irazusta J, Subirán N, Sanz B, Valdivia A, et al. Peptide metabolism is altered in the follicular fluid of patients with various reproductive pathologies. *Hum. Reprod.* 2018b; pendiente publicación.

Roméu C, Urries A, Lierta M, Rubio J, Sanz B, Pérez I, et al. Aminopeptidase activity in human follicular fluid. *Hum Reprod.* 2011; 26: I226–7.

Roméu C. Alteraciones en la actividad enzimática de peptidasas en líquido folicular humano. Universidad del País Vasco; 2014.

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev [Internet].* 1993; 45 (1): 87-146. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/45/1/87.abstract>

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004; 81 (1): 19–25.

Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J. The Regulation of the Inflammatory Response Through Nuclear Factor- κ B Pathway by Angiotensin IV Extends the Role of the Renin Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2007; 17 (1): 19–25.

Salerno a., Di Iorio L, Nazzaro A. A proteomic analysis of human follicular fluid in women undergoing IVF cycles. *Fertil Steril.* 2011; 96 (3): S193.

Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S, Arici A, Abou-Setta AM. Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2006.

Sanderink GJ, Artur Y, Schiele F, Gueguen R, Siest G. Alanine aminopeptidase in serum: Biological variations and reference limits. *Clin Chem.* 1988; 34 (7): 1422–6.

Saridogan E, Djahanbakhch O, Puddefoot JR, Demetroulis C, Collingwood K, Mehta JG, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II stimulation of ciliary activity in human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81 (7): 2719–25.

Sarkar D, Yen S. Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous-cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology.* 1985; 116 (5): 2075–9.

Sarkar D, Yen S. Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous-cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology*. 1985; 116 (5): 2075–9.

Sastri BVR, Janson VE, Owens LK. Significance of Substance P— and Enkephalin—Peptide Systems in the Male Genital Tract. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 632 (1): 339–53.

Schlingemann R, Oosterwijk E, Wesseling P, Rietveld F, Ruitter D. Aminopeptidase A is a constituent of activated pericytes in angiogenesis. *Journals Pathol*. 1996; 179 (4): 436–42.

Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Andersen AN. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Hum Reprod Update*. 2012; 18 (1): 29–43.

Schwartz JC. Metabolism of enkephalins and the inactivating neuropeptidase concept. *Trends Neurosci*. 1983; 6 (2): 45–8.

Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2006; 21 (11): 2960–8.

Scornik O, Botbol V. Bestatin as an Experimental Tool in Mammals. *Curr Drug Metab*. 2001; 2 (1): 67–85.

Scott RT, Hodgen GD. The ovarian follicle: Life cycle of a pelvic clock. *Clin Obstet Gynecol*. 1990; 33 (3): 551–62.

Sentandreu MÁ, Toldrá F. Oligopeptides hydrolysed by muscle dipeptidyl peptidases can generate angiotensin-I converting enzyme inhibitory dipeptides. *Eur Food Res Technol*. 2007; 224 (6): 785–90.

Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferman N. Proteins of Human Follicular Fluid: The Blood-Follicle Barrier. *Fertil Steril*. 1973; 24 (6): 429–34.

Sharp B, Pekary AE. β -endorphin₆₁₋₉₁ and other β -endorphin-immunoreactive peptides in human semen. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981; 52 (3): 586–8.

Sher G. Repeated IVF Failure Due to “Empty Follicles” and Poor Egg Quality: A Case Report [Internet]. 2016. Available from: <https://haveababy.com/fertility-information/ivf-authority/repeated-ivf-failure-due-empty-follicles-poor-egg-quality-case-report>

Shimada K, Takahashi M, Turner a J, Tanzawa K. Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys₄₁₂ with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* [Internet]. 1996; 315 (Pt 3): 863–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocr Rev.* 2002; 23 (5): 647–64.

Silveira PF, Irazusta J, Gil J, Agirregoitia N, Casis L. Interactions among challenges of hydromineral balance, angiotensin-converting enzyme, and cystine aminopeptidase. *Peptides.* 2001; 22 (12): 2137–44.

Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, De Los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: Results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod.* 1994; 9 (4): 725–9.

Singh J, Naran A, Misso N, Rigby P, Thompson P, Bhoola K. Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of Human lung carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8 (2): 300–6.

Singh N, Bahadur A, Malhotra N, Kalaivani M, Mittal S. 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. *Arch Gynecol Obstet.* 2013; 288 (3): 697–703.

Siristatidis C, Bhattacharya S. Unexplained infertility: Does it really exist? Does it matter? *Hum Reprod.* 2007; 22 (8): 2084–7.

Sjoholm I, Yman L. Degradation of oxytocin, lysine-vasopressin, angiotensin II and angiotensin-II-amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase). *Acta Pharm Suec.* 1967; 4 (2): 65–76.

Sjostrom H, Noren O, Olsen J. Structure and function of aminopeptidase N. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases. Cell Pept Immune Funct Dis.* 2000; 477: 25–34.

Smisha M, Sankar K, Thomas B, Varma T. Recurrent genuine empty follicle syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 4 (3): 147–9.

Smitz J, Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients. *Hum Reprod.* 2007; 22 (3): 676–87.

Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schröter C, Thompson MW, Hersh LB, et al. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol.* 2000; 1 (5): 413–8.

Subirán N, Agirregoitia E, Valdivia A, Ochoa C, Casis L, Irazusta J. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril.* 2008; 89 (5 SUPPL.): 1571–7.

Subirán N, Candenás L, Pinto FM, Cejudo-Roman A, Agirregoitia E, Irazusta J. Autocrine regulation of human sperm motility by the met-enkephalin opioid peptide. *Fertil Steril.* 2012; 98 (3): 617–25.

Subiran N, Casis L, Irazusta J. Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol Med*. 2011; 17 (7–8): 846–53.

Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H. Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. *Arch Biochem Biophys*. 1976; 177 (1): 196–200.

Sumitani S, Ramlal T, Somwar R, Keller SR, Klip A. Insulin regulation and selective segregation with glucose transporter-4 of the membrane aminopeptidase vp165 in rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 1997; 138 (3): 1029–34.

Sumitomo M, Shen R, Nanus DM. Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2005; 1751 (1): 52–9.

Suzuki Y, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, et al. Possible role of placental leucine aminopeptidase in the antiproliferative effect of oxytocin in human endometrial adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003; 9 (4): 1528–34.

Szeltner Z, Polgár L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci*. 2008; 9 (1): 96–107.

Tam LT, Engelbrecht S, Talent JM, Gracy RW, Erdos EG. The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 133 (3): 1187–92.

Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, et al. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem*. 2003; 278 (34): 32275–83.

Tanja O, Facchinetti P, Rose C, Bonhomme MC, Gros C, Schwartz JC. Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 271 (3): 565–70.

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The Chromogranin–Secretogranin Family. *N Engl J Med* [Internet]. 2003; 348 (12): 1134–49. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra021405>

Taylor A. Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1993; 18 (5): 167–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8328016

Thompson MW, Tobler A, Fontana A, Hersh LB. Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 258 (2): 234–40.

Thorek DLJ, Evans MJ, Carlsson S V., Ulmert D, Lilja H. Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. *Thromb Haemost.* 2013; 110 (3): 484–92.

Tiruppathi C, Ganapathy V, Leibach FH. 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. *J Biol Chem.* 1990; 265 (4): 2048–53.

Tobler A, Constam DB, Schmitt-Gräff A, Malipiero U, Schlapbach R, Fontana A. Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons. *J Neurochem [Internet].* 1997; 68 (3): 889–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9048733>

Tsafiriri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *Journals Reprod Fertil.* 1982; 64 (2): 541–51.

Tsafiriri A, Pomerantz SH. Oocyte maturation inhibitor. *Clin Endocrinol Metab.* 1986; 15 (1): 157–70.

Tsuji E, Misumi Y, Fujiwara T, Takami N, Ogata S, Ikehara Y. An Active-Site Mutation (Gly633 Arg) of Dipeptidyl Peptidase IV Causes Its Retention and Rapid Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Biochemistry.* 1992; 31 (47): 11921–7.

Tucker MR, Kennady MC, Jacoway JR. Autogenous auricular cartilage implantation following discectomy in the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990; 48 (1): 38–44.

Turner AJ. Processing and metabolism of neuropeptides. *Essays Biochem.* 1986; 22: 69–119.

Turner A. Metabolism of enkephalins. *ISI Atlas Sci.* 1987; 1 (1): 74–7.

Turner A, Matsas R, Kenny A. Endopeptidase-24.11 and neuropeptide metabolism. *Biochem Soc Trans.* 1985; 13 (1): 39–42.

Turner AJ, Barret A, Rawling N, Woessner J. Membrane alanyl aminopeptidase. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition.* Elsevier Academic Press; 2004. p. 289–94.

Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, Múgica J, Ochoa C, Casis L. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: Increased activity in necrozoospermia. *Regul Pept.* 2004; 122 (2): 79–84.

Varona A, Blanco L, López JI, Gil J, Agirregoitia E, Irazusta J, et al. Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol [Internet].* 2007; 292 (2): F780–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985214>

Vazeux G, Wang J, Corvol P, Llorens-Cortès C. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J Biol Chem.* 1996; 271 (15): 9069–74.

Vidal C, Giles J, Pellicer A, Remohí J. Esterilidad de Origen Desconocido. In: Remohí J, Bellver J, Requena A, Pellicer A, editors. *Guía de Protocolos en Reproducción Humana. Momento Médico Iberoamericana*; 2009. p. 147–51.

Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, Djahanbakhch O. Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. *Hum Reprod.* 1997; 12 (4): 651–62.

Waksman G, Hamel E, Delay-Goyet P, Roques BP. Neuronal localization of the neutral endopeptidase “enkephalinase” in rat brain revealed by lesions and autoradiography. *EMBO J [Internet].* 1986; 5 (12): 3163–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3545813

Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerenyi TD. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science (80-).* 1971; 173 (3999): 827–9.

Wang J, Cooper MD, Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Aminopeptidase A. In: Barrett A, Woessner J, Rawlings N, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 2nd ed. 2014.

Wang J, Walker H, Lin Q, Jenkins N, Copeland NG, Watanabe T, et al. The mouse BP-1 gene: Structure, chromosomal localization, and regulation of expression by type I interferons and interleukin-7. *Genomics.* 1996; 33 (2): 167–76.

Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Bridget Brosnihan K, Greenet LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens.* 1991; 9 (7): 631–8.

Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. Vol. 102, *Cancer Science.* 2011. p. 501–8.

Wickström M, Nygren P, Nygren P, Larsson R, Lindberg J, Larsson R, et al. Melflufen - a peptidase-potentiated alkylating agent in clinical trials. *Oncotarget [Internet].* 2017; 8 (39): 66641–55. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/18420>

Wiedeman PE, Trevillyan JM. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs [Internet].* 2003; 4 (4): 412–20. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&NEWS=N&AN=2003228604>

Wilcox CS, Williams CM, Smith TB, Frederickson ED, Wingo C, Bucci CM. Diagnostic uses of angiotensin-converting enzyme inhibitors in renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 1988; 1 (4): 344S–349S.

Wilk S, Thurston LS. Inhibition of angiotensin III formation by thiol derivatives of acidic amino acids. *Neuropeptides*. 1990; 16 (3): 163–8.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem*. 1998; 273 (26): 15961–70.

Wilk S. Aspartyl aminopeptidase. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition*. 2004. p. 937–9.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 407 (2): 176–83.

Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 1992; 12 (7): 2549–54.

Yang Y, Zhao C, Liang J, Yu M, Qu X. Effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on bone metabolism and the possible underlying mechanisms. Vol. 8, *Frontiers in Pharmacology*. 2017. p. 487.

Yoshimoto T, Fischl M, Orlowski RC, Walter R. Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. Comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. *J Biol Chem*. 1978; 253 (10): 3708–16.

Zhu Y, Pintar JE. Expression of Opioid Receptors and Ligands in Pregnant Mouse Uterus and Placenta. *Biol Reprod* [Internet]. 1998; 59 (4): 925–32. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod59.4.925>

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996; 93 (21): 11968–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I

ovocitoSiNo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
PEP OVOCITO SI	16	483,6179	387,92277	96,98069
OVOCITO NO	21	299,5184	365,17388	79,68747
PSA OVOCITO SI	36	4859,8728	1486,77448	247,79575
OVOCITO NO	23	4329,8832	1844,91641	384,69167
APN OVOCITO SI	38	5838,1989	1939,09200	314,56226
OVOCITO NO	29	5962,1223	2422,89384	449,92009
APB OVOCITO SI	40	5431,8009	2479,90407	392,10726
OVOCITO NO	32	5027,9650	2544,30171	449,77325
APA OVOCITO SI	43	7551,8198	2682,81212	409,12501
OVOCITO NO	34	7277,0325	2803,70198	480,83092
ASP OVOCITO SI	44	818,1040	425,33123	64,12110
OVOCITO NO	28	916,9703	488,24315	92,26928
NEP OVOCITO SI	36	9520,6267	6157,37416	1026,22903
OVOCITO NO	32	11050,4261	5586,17492	987,50554
DPPIV OVOCITO SI	47	14146,2535	5565,79979	811,85534
OVOCITO NO	34	13118,6742	4262,43644	731,00182
CYS OVOCITO SI	41	1097,9312	1017,43235	158,89624
OVOCITO NO	24	1262,9257	894,79036	182,64832

?

ANEXO II

actividad	extracción	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
						Límite inferior	Límite superior
PSA	1	18	5161,8967	1670,18081	393,665	4331,335	5992,458
	2	18	4567,0028	1736,70059	409,344	3703,362	5430,644
	3	18	4316,4461	1310,19026	308,815	3664,904	4967,988
APN	1	22	6523,9541	2549,47836	543,551	5393,579	7654,329
	2	22	5797,2127	2373,07948	505,942	4745,048	6849,377
	3	22	5689,5095	1460,42973	311,365	5041,991	6337,028
PEP	1	8	402,6675	313,43894	110,817	140,626	664,709
	2	8	376,2688	418,74058	148,047	26,193	726,345
	3	8	315,7213	347,09832	122,718	25,540	605,903
APB	1	22	5651,0609	2776,07904	591,862	4420,216	6881,905
	2	22	4900,1691	2553,41066	544,389	3768,050	6032,288
	3	22	4761,8405	1958,88328	417,635	3893,320	5630,361
APA	1	24	8345,3325	3286,53978	670,862	6957,548	9733,117
	2	24	7362,7996	3104,56602	633,717	6051,856	8673,743
	3	24	6630,8588	1712,83021	349,630	5907,594	7354,124
ASP	1	20	1040,4025	362,26125	81,004	870,859	1209,946
	2	20	906,9650	467,35689	104,504	688,235	1125,695
	3	20	828,7665	387,85726	86,728	647,244	1010,289
NEP	1	21	11241,5719	6708,88227	1463,998	8187,725	14295,419
	2	21	9817,6352	6027,09574	1315,220	7074,134	12561,136
	3	21	9784,3324	5783,67153	1262,101	7151,637	12417,028
DPPIV	1	26	14759,2700	5209,57905	1021,683	12655,075	16863,465
	2	26	13396,9573	5054,06232	991,183	11355,577	15438,337
	3	26	12659,2031	4942,59857	969,323	10662,844	14655,562
CYS	1	18	1430,8361	1023,49381	241,240	921,865	1939,808
	2	18	1120,1711	908,11081	214,044	668,578	1571,764
	3	18	1033,4256	824,10063	194,242	623,610	1443,241

?

ANEXO III

actividad	mayores39	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
PSA	< 39	51	4399,4064	1680,82722	235,36289
	> 39	9	5707,6081	1303,70432	434,56811
APN	< 39	58	5940,7916	2169,07687	284,81375
	> 39	10	5992,9436	2360,61429	746,49178
PEP	< 39	33	348,9487	366,76479	63,84555
	> 39	5	537,7657	450,77287	201,59176
APB	< 39	57	5135,7333	2626,75669	347,92242
	> 39	15	5695,3413	1951,43686	503,85883
APA	< 39	65	7517,7563	2774,99919	344,19629
	> 39	13	7416,0151	2884,94485	800,13974
ASP	< 39	58	832,6301	458,23336	60,16899
	> 39	15	982,9904	414,03964	106,90458
NEP	< 39	57	10955,0307	5890,54027	780,22112
	> 39	12	7150,6151	4866,36456	1404,79844
DPPIV	< 39	67	13401,9208	4512,74499	551,31955
	> 39	15	15263,8985	6886,16292	1777,99962
CYS	< 39	51	1138,9948	945,21492	132,35656
	> 39	15	1234,0617	1051,21039	271,42135

?

ANEXO IV

ACTIVIDAD	GRUPOS	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
PSA	DONANTES	28	4343,3108	1776,54024	335,73455	3654,4404	5032,1812	1200,66	7541,67
	ENDOMETRIOSIS	10	3883,3822	2064,53071	652,86193	2406,5059	5360,2585	1195,46	6550,77
	EOD	13	4917,1692	976,72563	270,89495	4326,9398	5507,3986	3330,43	6199,65
	> 39	9	5707,6081	1303,70432	434,56811	4705,4923	6709,7240	3551,31	7446,03
	Total	60	4595,6366	1687,18155	217,81420	4159,7914	5031,4818	1195,46	7541,67
APN	DONANTES	30	5476,0701	1987,56093	362,87732	4733,9026	6218,2375	1853,69	9340,12
	ENDOMETRIOSIS	12	6744,8408	2545,11179	734,71049	5127,7539	8361,9277	2691,26	10079,02
	EOD	16	6209,1075	2113,05585	528,26396	5083,1395	7335,0755	2818,67	12088,93
	> 39	10	5992,9436	2360,61429	746,49178	4304,2619	7681,6254	2919,90	9417,60
	Total	68	5948,4610	2179,80788	264,34053	5420,8351	6476,0869	1853,69	12088,93
PEP	DONANTES	21	387,4577	368,31490	80,37290	219,8027	555,1126	64,62	1128,31
	ENDOMETRIOSIS	7	158,7575	75,34591	28,47808	89,0742	228,4409	71,45	284,06
	EOD	4	217,7384	188,76146	94,38073	-82,6232	518,1000	62,37	489,52
	> 39	5	537,7657	450,77287	201,59176	-21,9427	1097,4741	63,78	1142,20
	Total	37	346,1539	341,48540	56,13985	232,2970	460,0108	62,37	1142,20
APB	DONANTES	32	5110,4737	2964,61280	524,07445	4041,6168	6179,3306	1336,29	11972,22
	ENDOMETRIOSIS	8	3059,6451	1392,45365	492,30671	1895,5248	4223,7655	1168,50	4937,17
	EOD	16	5926,8042	1487,54112	371,88528	5134,1495	6719,4589	3024,29	8123,31
	> 39	15	5695,3413	1951,43686	503,85883	4614,6716	6776,0110	2767,21	9190,63
	Total	71	5186,9198	2454,03483	291,24035	4606,0592	5767,7804	1168,50	11972,22
APA	DONANTES	33	7146,9974	2792,28426	486,07430	6156,8965	8137,0984	2387,50	13544,96
	ENDOMETRIOSIS	12	8435,8259	3974,05906	1147,21204	5910,8292	10960,8225	3254,95	17278,58
	EOD	19	7555,7624	1743,11095	399,89708	6715,6099	8395,9150	3420,17	10608,99
	> 39	13	7416,0151	2884,94485	800,13974	5672,6604	9159,3698	4328,60	14495,52
	Total	77	7494,1365	2792,28282	318,21016	6860,3660	8127,9069	2387,50	17278,58
ASP	DONANTES	28	760,4336	435,27852	82,25991	591,6502	929,2170	65,83	1675,77
	ENDOMETRIOSIS	10	660,1921	531,64877	168,12210	279,8735	1040,5107	20,53	1454,96
	EOD	19	1004,4077	413,17838	94,78962	805,2621	1203,5533	282,87	1804,66
	> 39	15	982,9904	414,03964	106,90458	753,7029	1212,2779	68,21	1659,31
	Total	72	857,2592	450,84830	53,13298	751,3151	963,2034	20,53	1804,66
NEP	DONANTES	32	10666,8516	5985,02842	1058,01355	8509,0188	12824,6845	375,45	19848,68
	ENDOMETRIOSIS	11	14358,0079	5378,48934	1621,67555	10744,6896	17971,3262	7952,17	24122,10
	EOD	13	8837,9074	5436,08363	1507,69833	5552,9150	12122,8999	417,11	16888,34
	> 39	12	7150,6151	4866,36456	1404,79844	4058,6746	10242,5557	232,45	14145,86
	Total	68	10293,7870	5918,71184	717,74924	8861,1535	11726,4205	232,45	24122,10
DPPIV	DONANTES	35	13430,0497	4437,95769	750,15176	11905,5579	14954,5415	4020,55	22298,57
	ENDOMETRIOSIS	12	10358,2316	4727,30723	1364,65605	7354,6439	13361,8193	2131,87	15978,33
	EOD	19	15119,7860	3748,59468	859,98660	13313,0212	16926,5508	6627,44	21126,80
	> 39	15	15263,8985	6886,16292	1777,99962	11450,4686	19077,3284	5954,24	30233,67
	Total	81	13710,9251	5054,46460	561,60718	12593,2912	14828,5590	2131,87	30233,67
CYS	DONANTES	23	1230,8437	1052,74271	219,51203	775,6036	1686,0838	-464,86	3267,04
	ENDOMETRIOSIS	8	490,0558	537,15281	189,91220	40,9848	939,1268	7,73	1274,26
	EOD	19	1238,8964	853,84421	195,88530	827,3567	1650,4361	436,62	3260,96
	> 39	15	1234,0617	1051,21039	271,42135	651,9208	1816,2026	-677,22	2843,55
	Total	65	1142,7663	959,18577	118,97235	905,0917	1380,4409	-677,22	3267,04

ANEXO V

Comparaciones múltiples							
DMS							
Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Limite inferior	Limite superior
PSA	1	2	459,92859	600,14713	,447	-742,3106	1662,1678
		3	-573,85845	546,74672	,298	-1669,1237	521,4068
		4	-1364,29734	624,23130	,033	-2614,7829	-113,8118
	2	1	-459,92859	600,14713	,447	-1662,1678	742,3106
		3	-1033,78703	685,23130	,137	-2406,4703	338,8962
		4	-1824,22592	748,51498	,018	-3323,6816	-324,7702
	3	1	573,85845	546,74672	,298	-521,4068	1669,1237
		2	1033,78703	685,23130	,137	-338,8962	2406,4703
		4	-790,43889	706,42061	,268	-2205,5694	624,6916
	4	1	1364,29734	624,23130	,033	113,8118	2614,7829
		2	1824,22592	748,51498	,018	324,7702	3323,6816
		3	790,43889	706,42061	,268	-624,6916	2205,5694
APN	1	2	-1268,77072	743,12800	,093	-2753,3396	215,7981
		3	-733,03744	673,51695	,281	-2078,5422	612,4673
		4	-516,87358	794,43725	,518	-2103,9444	1070,1973
	2	1	1268,77072	743,12800	,093	-215,7981	2753,3396
		3	535,73328	830,84237	,521	-1124,0652	2195,5317
		4	751,89714	931,56025	,423	-1109,1084	2612,9027
	3	1	733,03744	673,51695	,281	-612,4673	2078,5422
		2	-535,73328	830,84237	,521	-2195,5317	1124,0652
		4	216,16386	877,03498	,806	-1535,9149	1968,2426
	4	1	516,87358	794,43725	,518	-1070,1973	2103,9444
		2	-751,89714	931,56025	,423	-2612,9027	1109,1084
		3	-216,16386	877,03498	,806	-1968,2426	1535,9149
PEP	1	2	228,70013	145,48236	,125	-67,2860	524,6862
		3	169,71922	181,85295	,357	-200,2634	539,7018
		4	-150,30805	165,87542	,371	-487,7841	187,1680
	2	1	-228,70013	145,48236	,125	-524,6862	67,2860
		3	-58,98091	208,93314	,779	-484,0586	366,0968
		4	-379,00818	195,18507	,061	-776,1152	18,0988
	3	1	-169,71922	181,85295	,357	-539,7018	200,2634
		2	58,98091	208,93314	,779	-366,0968	484,0586
		4	-320,02727	223,61259	,162	-774,9705	134,9160
	4	1	150,30805	165,87542	,371	-187,1680	487,7841
		2	379,00818	195,18507	,061	-18,0988	776,1152
		3	320,02727	223,61259	,162	-134,9160	774,9705
APB	1	2	2050,82861	932,08567	,031	190,3778	3911,2794
		3	-816,33043	721,99046	,262	-2257,4294	624,7686
		4	-584,86755	737,86028	,431	-2057,6428	887,9077
	2	1	-2050,82861	932,08567	,031	-3911,2794	-190,3778
		3	-2867,15904	1021,04870	,007	-4905,1808	-829,1373
		4	-2635,69616	1032,33135	,013	-4696,2381	-575,1542
	3	1	816,33043	721,99046	,262	-624,7686	2257,4294
		2	2867,15904	1021,04870	,007	829,1373	4905,1808
		4	231,46289	847,46358	,786	-1460,0815	1923,0073
	4	1	584,86755	737,86028	,431	-887,9077	2057,6428
		2	2635,69616	1032,33135	,013	575,1542	4696,2381
		3	-231,46289	847,46358	,786	-1923,0073	1460,0815
APA	1	2	-1288,82843	948,38016	,178	-3178,9474	601,2905
		3	-408,76499	810,19899	,615	-2023,4892	1205,9593
		4	-269,01766	921,24271	,771	-2105,0517	1567,0164
	2	1	1288,82843	948,38016	,178	-601,2905	3178,9474
		3	880,06344	1037,37844	,399	-1187,4288	2947,5557
		4	1019,81077	1126,24143	,368	-1224,7852	3264,4067
	3	1	408,76499	810,19899	,615	-1205,9593	2023,4892
		2	-880,06344	1037,37844	,399	-2947,5557	1187,4288
		4	139,74734	1012,62888	,891	-1878,4191	2157,9138
	4	1	269,01766	921,24271	,771	-1567,0164	2105,0517
		2	-1019,81077	1126,24143	,368	-3264,4067	1224,7852
		3	-139,74734	1012,62888	,891	-2157,9138	1878,4191
ASP	1	2	100,24150	161,89368	,538	-222,8123	423,2953
		3	-243,97408	130,62017	,066	-504,6226	16,6744
		4	-222,55680	140,61340	,118	-503,1465	58,0329
	2	1	-100,24150	161,89368	,538	-423,2953	222,8123
		3	-344,21558	171,68776	,049	-686,8132	-1,6180
		4	-322,79830	179,40787	,076	-680,8011	35,2045
	3	1	243,97408	130,62017	,066	-16,6744	504,6226
		2	344,21558	171,68776	,049	1,6180	686,8132
		4	21,41728	151,79685	,888	-281,4687	324,3032
	4	1	222,55680	140,61340	,118	-58,0329	503,1465
		2	322,79830	179,40787	,076	-35,2045	680,8011
		3	-21,41728	151,79685	,888	-324,3032	281,4687
NEP	1	2	-3691,15624	1961,06440	,064	-7608,8327	236,5203
		3	1828,94419	1845,39165	,325	-1857,6494	5515,5378
		4	3516,23649	1899,28302	,069	-278,0175	7310,4905
	2	1	3691,15624	1961,06440	,064	-226,5203	7608,8327
		3	5520,10042	2298,61672	,019	928,0856	10112,1152
		4	7207,39273	2342,10258	,003	2528,5050	11886,2805
	3	1	-1828,94419	1845,39165	,325	-5515,5378	1857,6494
		2	-5520,10042	2298,61672	,019	-10112,1152	-928,0856
		4	1687,29230	2246,13919	,455	-2799,8866	6174,4712
	4	1	-3516,23649	1899,28302	,069	-7310,4905	278,0175
		2	-7207,39273	2342,10258	,003	-11886,2805	-2528,5050
		3	-1687,29230	2246,13919	,455	-6174,4712	2799,8866
DPPIV	1	2	3071,81811	1631,82634	,064	-177,5633	6321,1995
		3	-1689,73629	1390,06693	,228	-4457,7132	1078,2406
		4	-1833,84880	1505,41072	,227	-4831,5045	1163,8069
	2	1	-3071,81811	1631,82634	,064	-6321,1995	177,5633
		3	-4761,55440	1798,71799	,010	-8343,2595	-1179,8493
		4	-4905,66691	1889,27546	,011	-8667,6950	-1143,6388
	3	1	1689,73629	1390,06693	,228	-1078,2406	4457,7132
		2	4761,55440	1798,71799	,010	1179,8493	8343,2595
		4	-144,11251	1684,87111	,932	-3499,1195	3210,8945
	4	1	1833,84880	1505,41072	,227	-1163,8069	4831,5045
		2	4905,66691	1889,27546	,011	1143,6388	8667,6950
		3	144,11251	1684,87111	,932	-3210,8945	3499,1195
CYS	1	2	740,78786	389,73470	,062	-38,5348	1520,1106
		3	-8,05271	294,36154	,978	-596,6650	580,5596
		4	-3,21800	315,12248	,992	-633,3444	626,9083
	2	1	-740,78786	389,73470	,062	-1520,1106	38,5348
		3	-748,84057	400,18170	,066	-1549,0533	51,3722
		4	-744,00586	415,69082	,078	-1575,2310	87,2193
	3	1	8,05271	294,36154	,978	-580,5596	596,6650
		2	748,84057	400,18170	,066	-51,3722	1549,0533
		4	4,83471	327,95493	,988	-650,9517	660,6211
	4	1	3,21800	315,12248	,992	-626,9083	633,3444
		2	744,00586	415,69082	,078	-87,2193	1575,2310
		3	-4,83471	327,95493	,988	-660,6211	650,9517

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO VI

fecundSiNo		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
PSA	FecunSi	34	4819,4097	1517,50525	260,25000
	FecunNo	2	5547,7450	610,16951	431,45500
APN	FecunSi	36	5841,2325	1993,50854	332,25142
	FecunNo	2	5783,5938	154,63895	109,34625
PEP	FecunSi	16	483,6179	387,92277	96,98069
	FecunNo	0	0,0000	0,00000	0,00000
APB	FecunSi	38	5532,9819	2502,36980	405,93798
	FecunNo	2	3509,3624	614,69874	434,65765
APA	FecunSi	40	7690,3043	2680,87850	423,88411
	FecunNo	3	5705,3600	2345,37468	1354,10271
ASP	FecunSi	41	842,9190	426,18536	66,55897
	FecunNo	3	478,9649	267,70739	154,56094
NEP	FecunSi	34	9403,9719	6119,91061	1049,55601
	FecunNo	2	11503,7589	9092,66600	6429,48579
DPPIV	FecunSi	44	14330,2906	5533,84512	834,25854
	FecunNo	3	11447,0427	6513,00138	3760,28310
CYS	FecunSi	38	1152,9235	1034,76059	167,86033
	FecunNo	3	401,3619	331,06542	191,14071

ANEXO VII

EmbSiNo		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
PSA	EmbSi	7	3559,5771	1197,26725	452,52448
	EmbNo	25	5148,9032	1415,68018	283,13604
APN	EmbSi	7	4679,3761	1446,11929	546,58171
	EmbNo	27	6210,8932	2071,28624	398,61922
PEP	EmbSi	3	544,7681	407,36198	235,19055
	EmbNo	13	469,5063	399,12057	110,69613
APB	EmbSi	7	4635,6768	3614,44682	1366,13249
	EmbNo	31	5735,5992	2209,03074	396,75363
APA	EmbSi	8	6247,0733	2292,09297	810,37724
	EmbNo	31	8030,7663	2722,01915	488,88907
ASP	EmbSi	7	646,7231	525,77869	198,72567
	EmbNo	32	895,7296	409,48018	72,38655
NEP	EmbSi	7	9582,0984	4633,83428	1751,42473
	EmbNo	27	9357,7909	6524,64230	1255,66800
DPPIV	EmbSi	8	11392,8961	6222,92478	2200,13616
	EmbNo	34	14894,1179	5382,62318	923,11226
CYS	EmbSi	6	1083,0914	1435,84138	586,17979
	EmbNo	30	1209,8319	988,75279	180,52074

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

- Rodríguez Gallego, Maria Victoria; Arizaleta Urarte, Jose Antonio; Hernández Hernández, Juana; Valdivia Palacín, Asier; Cortés Meler, Lorea; Subirán Ciudad, Nerea; Casis Saénz, Luis. 2016. Metabolismo peptídico follicular en tres aspirados de pacientes fértiles. En: 31^o congreso nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Málaga.
- Rodríguez Gallego M^a Victoria; Aparicio Prieto M^a Victoria; Arizaleta Urarte José Antonio; Hernández Hernández Juana; Casis Saenz Luis. 2018. El metabolismo opioidérgico no se ve alterado por la presencia/ausencia de ovocito en líquido follicular. En: 32^o congreso nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Madrid.

3^o Congreso Nacional de la
Sociedad Española de Fertilidad
6^o Congreso Nacional de
Enfermería de la Reproducción



SEF

Palacio de Ferias y Congresos

Málaga
19-21 Mayo 2016



Nº Ref. 161/158

METABOLISMO PEPTÍDICO FOLICULAR EN TRES ASPIRADOS DE PACIENTES FÉRTILES

M.V. Rodríguez-Gallego (1), J. Arizaleta (1), J. Hernández(1,2), A. Valdivia (3), L. Cortés (3), N. Subirán (3) y L. Casis (3)

- (1) Clínica Ginecológica J. Hernández, Logroño, La Rioja.
(2) Servicio de Ginecología, Hospital San Pedro, Logroño.
(3) Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UPV/EHU

Introducción

El líquido folicular (LF) proporciona un entorno muy importante para el desarrollo ovocitario. Con el fin de relacionar su contenido bioquímico con la calidad ovocitaria, es importante que cada folículo sea aspirado de manera individual. Para comprobar si el metabolismo peptídico pudiera estar alterado de manera interfolicular, en el presente estudio hemos analizado la actividad enzimática de siete peptidasas, degradadoras de péptidos endógenos con actividad biológica, en tres LF independientes de mujeres sin problemas de fertilidad con una edad comprendida entre los 25 y 30 años, con el fin de descartar este aspecto como un factor modificador, ya descrito previamente por nuestro grupo investigador.

Material y Métodos

Las muestras de LF se obtuvieron en la Clínica Juana Hernández de Logroño, con consentimiento informado (n=10 pacientes, tres muestras por paciente de aspirado diferente; total: 30 muestras). Las actividades se midieron fluorimétricamente. Los enzimas analizados han sido: **Aminopeptidasa (AP) neutra (APN)**, **AP sensible a puromicina (PSA)**, **AP básica (APB)**, **dipeptidil peptidasa IV (DPPIV)**, **cistinil-AP (Cys-AP)**, **aspartil-AP (Asp-AP)** y **glutamil-AP (Glu-AP)**. Los resultados obtenidos se presentan como unidades de actividad por ml.

Resultados

ACTIVIDAD PEPTIDÁSICA EN LÍQUIDO FOLICULAR

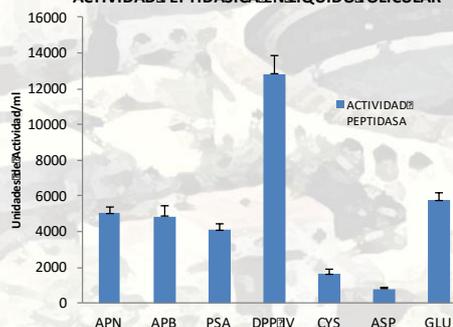


Figura 1. Valores de actividad enzimática de las distintas peptidasas analizadas en líquido folicular humano, representados como unidades de actividad peptidásica (U.A.P.) por mililitro /ml) + SEM (error estándar medio).

PORCENTAJES DE ACTIVIDAD EN LÍQUIDO FOLICULAR

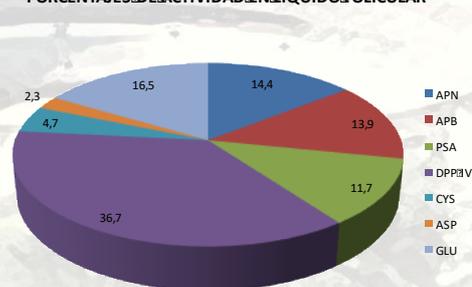


Figura 2. Porcentajes de actividad para los enzimas estudiados (APN, APB, PSA, DPPIV, CYS, ASP, GLU).

Conclusiones

Se podría sugerir un papel relevante del metabolismo de tacininas (péptidos degradados por DPPIV) y opioides (degradados por APN, PSA y APB) en el líquido folicular humano, frente a otros sistemas peptídicos. Comparativamente hablando, no parecen apreciarse diferencias marcadas entre las actividades de la misma paciente en las diferentes muestras foliculares en ninguno de los enzimas ensayados. Necesitamos, sin embargo, un análisis más profundo para discriminar este aserto relacionándolo con el grado de maduración ovocitaria..



SEF Málaga 2016



COMUNICACIONES SEF

MADRES ESTÉRILES, SOMETIDAS A ICSI-TE Y SU RELACIÓN CON LA EXPOSICIÓN A METALES PESADOS.

Autores:

(1) Cohen Corcía, Isaac; (2) García Fortea, Pedro; (1) González Mesa, Ernesto; (1) Ruiz Martín, Ana; (1) Ruiz Escalera, Juan; (1) Campos Pérez, Francisco; (1) Gutiérrez Rueda, Ana; (1) Reche Rosado, Alberto Juan.

Centro de Trabajo:

(1) Hospital Regional Universitario de Málaga; (2) Inspección Médica de Centros y Servicios Sanitarios de la Consejería de Salud. Delegación Territorial de Málaga. Provincia Málaga.

161/155. HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO EN GESTANTES ESTÉRILES, SOMETIDAS A ICSI-TE Y SU RELACIÓN CON LA PATOLOGÍA OBSTÉTRICA MATERNO-FETAL, TASA DE ABORTO Y RESULTADOS PERINATALES.

Autores:

(1) Cohen Corcía, Isaac; (2) García Fortea, Pedro; (1) González Mesa, Ernesto; (1) Ruiz Martín, Ana; (1) Ruiz Escalera, Juan; (1) Campos Pérez, Francisco; (1) Gutiérrez Rueda, Ana; (1) Reche Rosado, Alberto Juan.

Centro de Trabajo:

(1) Hospital Regional Universitario de Málaga; (2) Inspección Médica de Centros y Servicios Sanitarios de la Consejería de Salud. Delegación Territorial de Málaga. Provincia Málaga.

161/158. METABOLISMO PEPTÍDICO FOLICULAR EN TRES ASPIRADOS DE PACIENTES FÉRTILES

Autores:

(1) Rodríguez Gallego, María Victoria; (1) Arizaleta Urarte, Jose Antonio; (1) Hernández Hernández, Juana; (2) Valdivia Palacín, Asier; (2) Cortés Meler, Lorea; (2) Subirán Ciudad, Nerea; (2) Casis Saénz, Luis.

Centro de Trabajo:

(1) Clínica Ginecológica Juana Hernández. Logroño; (2) Departamento De Fisiología. Facultad De Medicina Upv.

161/159. ESTUDIO PROSPECTIVO, RANDOMIZADO, DOBLE CIEGO Y CON PLACEBO CONTROL DEL EFECTO DE LA VITAMINA E SOBRE PARÁMETROS SEMINALES EN HOMBRES INFÉRTILES

Autores:

(1) Exposito Navarro, Antonia; (2) Perez-sanz, Jairo; (3) Aspichueta Vivanco, Fermin; (4) Crisol Ortiz, Lorena; (1) Diaz-Nuñez, María; (1) Mendoza Hourtouat, Rosario; (1) Martínez-astorquiza Ortiz De Zárate, Txanton; (1) Matorras Weinig, Roberto.

Centro de Trabajo:

(1) Hospital Universitario Cruces. Barakaldo; (2) Upv. Leioa; (3) Ivi Bilbao. Leioa; (4) Unidad De Reproducción Asistida Hospital Donostia.

161/162. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE DONANTES EN LA VALORACIÓN PSICOLÓGICA

Autores:

(1) Roca de Bes, Montserrat; (2) Bricchette Uncal, María; (3) Ródenas Andrés, Marisol; (4) Valladolid Baringo, Noelia; (5) Mestre Blabia, M^a Gema; (6) Negre Masía, Cristina; (7) Giménez Mollá, Vicenta; (8) Baccino, Giuliana.

Centro de Trabajo:

(1) Hospital Quiron. Barcelona; (2) Centro Aesthesis. Madrid; (3) Ivi. Cartagena; (4) Consulta Privada. Madrid; (5) Clínica Ibilab. Mallorca; (6) Ambito privado. Barcelona; (7) Hospital Quirón. San Sebastián; (8) Clínica FIV. Madrid.

161/164. EL ABORTO RECURRENTE Y EL FALLO DE IMPLANTACIÓN DE CAUSA DESCONOCIDA ESTUDIADOS MEDIANTE UN PANEL DE POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN TROMBOFILIAS; FRECUENCIA



www.sefmalaga2016.com



32° CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD
7° CONGRESO NACIONAL DE ENFERMERÍA DE LA REPRODUCCIÓN
 MADRID 16, 17 Y 18 DE MAYO 2018 PALACIO MUNICIPAL DE CONGRESOS

#SEF2018



246/96

EL METABOLISMO OPIOIDÉRGICO NO SE VE ALTERADO POR LA PRESENCIA/AUSENCIA DE UN OOCITO EN EL LÍQUIDO FOLICULAR.

Rodríguez Gallego M^a Victoria^{2,3}, Aparicio Prieto M^a Victoria¹, Arizaleta Urarte José Antonio³, Hernández Hernández Juana^{2,3} y Casis Saenz Luis⁴.

- ¹Hospital Universitario de Cruces (Bizkaia)
- ²Hospital San Pedro (Logroño)
- ³Clínica Ginecológica J. Hernández (Logroño)
- ⁴Dpto. Fisiología, Fac. Medicina, UPV/EHU

Introducción (incluyendo objetivos):

El líquido folicular (LF) está formado por sustancias procedentes de vasos localizados por fuera de la lámina basal y por productos de secreción de las propias células foliculares, produciendo todas ellas efectos a nivel ovocitario y en las células circundantes. Por ello, el LF representa un complejo compartimento funcional, en el que se integran señales endocrinas, inmunológica y mitogénicas, haciendo que cada folículo sea único. El microambiente que presente cada folículo determinará si éste es seleccionado para ovular. En los últimos años encontramos en el campo de la reproducción asistida múltiples estudios que pretenden establecer una relación entre composición de líquido folicular y resultados reproductivos. En la presente comunicación describimos las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo opioidérgico en LF que contenían oocito vs LF que no lo contenían con el fin de determinar si el entorno peptídico podría determinar un papel en la maduración ovocitaria. Dado que el metabolismo opioidérgico ha sido implicado en diversos aspectos tanto de la fertilidad masculina como femenina, el objetivo principal del presente trabajo sería comprobar si la presencia o ausencia de oocito en el líquido folicular podría estar relacionada con la actividad enzimática reguladora de dicho sistema opioide local y, con ello, comprobar si el medio que protege al gameto es estable o variable dependiendo de la presencia o ausencia del mismo. La presencia de variabilidad podría abrir una interesante línea de investigación, ya que se podrían plantear modificaciones bioquímicas desde el exterior.

Material y métodos:

Las muestras de LF (n=30 en cada caso) se obtuvieron de pacientes voluntarias (consentimiento informado) en la Clínica Ginecológica J. Hernández. Las actividades enzimáticas ensayadas fueron: Aminopeptidasa Neutra (APN), Peptidasa Sensible a Puromicina (PSA), Aminopeptidasa Básica (APB) y Endopeptidasa Neutra (NEP), todas ellas implicadas en el control del metabolismo encefalinérgico. Para las determinaciones enzimáticas utilizamos derivados amídicos de la β-naftilamina (aminoacil-β-naftilamidas). La acción de las peptidasas sobre el sustrato genera aminoácidos libres y moléculas de β-naftilamina (figura 7). Esta última molécula tiene la particularidad de ser fluorescente. 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.

El estudio estadístico se llevó a cabo empleando la U de Mann-Whitney.

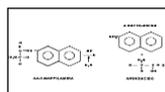
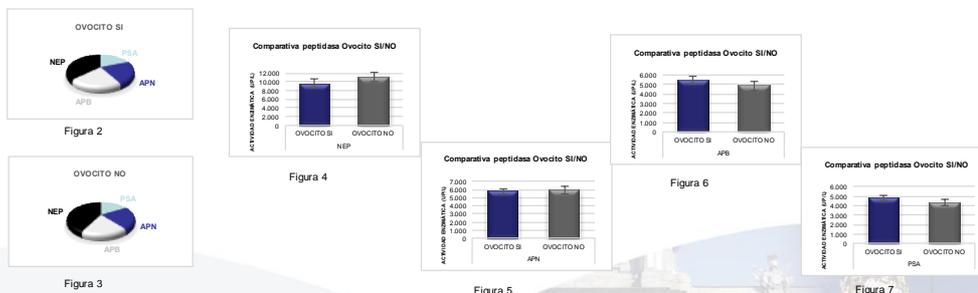


Figura 1.- Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasas en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, β-naftilamina, emite fluorescencia a 412 nm cuando es excitado a 345 nm.

Resultados:

En todos los líquidos foliculares observamos actividad enzimática reguladora de encefalinas, siendo los mayores niveles los de la NEP, seguidos de la APN, APB y PSA. Estos niveles enzimáticos se mantienen constantes independientemente de la presencia o no de gameto (Figs. 2 y 3). Al comparar estadísticamente las actividades en LF con y sin oocito, tampoco observamos diferencias significativas entre ambos grupos (Figs. 4, 5, 6 y 7).



Conclusiones:

1. Los enzimas reguladores del sistema encefalinérgico local están presentes en el líquido folicular humano.
2. El metabolismo opioidérgico tiene algún papel en el microambiente folicular.
3. El entorno folicular encefalinérgico se mantiene en pacientes sometidas a TRA independientemente de la presencia final de gameto.





