



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Tesis doctoral

**Estudio del efecto del estrés en la ventana de
implantación y su influencia en el éxito
reproductivo**

Autora:

Diana Martí García

Trabajo dirigido por:

Dra. Patricia Díaz Gimeno

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

Prof. Vicente Serra Serra

Valencia, diciembre 2024



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Dra. Patricia Díaz Gimeno, Licenciada en Biología y Doctora por la Universidad de Valencia en Ginecología y Obstetricia, Investigadora principal Miguel Servet en Fundación IVI - Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) en el grupo de Biomarcadores, Medicina Genómica, Estadística y Análisis Masivo de datos en Reproducción Humana Asistida y líder del grupo de Medicina Reproductiva Genómica y de Sistemas en Fundación IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Estudio del efecto del estrés en la ventana de implantación y su influencia en el éxito reproductivo”** ha sido realizado íntegramente por Diana Martí García bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 11 de diciembre de 2024.

**PATRICIA
DÍAZ
GIMENO** Firmado
digitalmente por
PATRICIA|DÍAZ|
GIMENO
Fecha: 2024.12.11
15:55:58 +01'00'

Fdo. Dra. Patricia Díaz Gimeno



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Dr. Marcos Meseguer Escrivá, Licenciado en Biología y Doctor por la Universidad de Valencia en Ginecología y Obstetricia. Director Global de Investigación en Embriología y Embriólogo Sénior en IVI Valencia. Líder del grupo de Biomarcadores, Medicina Genómica, Estadística y Análisis Masivo de datos en Reproducción Humana Asistida del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Estudio del efecto del estrés en la ventana de implantación y su influencia en el éxito reproductivo”** ha sido realizado íntegramente por Diana Martí García bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 9 de diciembre de 2024.

MESEGUER
ESCRIVA MARCOS
- 73776663T

Firmado digitalmente por
MESEGUER ESCRIVA
MARCOS - 73776663T
Fecha: 2024.12.09
12:20:01 +01'00'

Fdo. Dr. Marcos Meseguer Escrivá



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Prof. Vicente Serra Serra, Profesor Catedrático en Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Valencia e investigador en Fundación IVI/Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Estudio del efecto del estrés en la ventana de implantación y su influencia en el éxito reproductivo”** ha sido realizado íntegramente por Diana Martí García bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 9 de diciembre de 2024.

VICENTE|
SERRA|
SERRA

Firmado digitalmente
por VICENTE|SERRA|
SERRA
Fecha: 2024.12.09
16:28:03 +01'00'

Fdo. Prof. Vicente Serra Serra

A mis yayos

*“Por la noche mirarás las estrellas.
Tú tendrás estrellas como no tiene nadie.
Tú tendrás estrellas que saben reír”*

AGRADECIMIENTOS

Si me pidieran que describiera el doctorado en una frase, diría que es como montarse en una montaña rusa sin saber lo que te espera en la siguiente curva. Son constantes subidas y bajadas, es estar un día bien, y al siguiente plantearte dejarlo. Y no diré cuántas veces me he planteado dejarlo (pero no han sido pocas). Sin embargo, esa montaña rusa me ha hecho crecer, como profesional y como persona. No soy la misma que era hace 4 años, y cómo me alegro de ello. Pero este camino, tan largo y arduo, no lo he recorrido sola. Estos cuatro años he compartido momentos muy especiales con personas maravillosas sin las cuáles esta tesis no habría sido posible. Esta tesis es mía, pero también es vuestra. Así que quiero dedicar unas páginas para agradecer el apoyo recibido, los consejos, las risas y los buenos momentos.

La primera persona a la que tengo que agradecer esta tesis es a la Dra. Patricia Díaz Gimeno. Gracias Patri por confiar en mí hace 5 años, cuando entré para hacer el TFM, y permitirme seguir en tu grupo los siguientes 4 años. Has confiado en mí, en el proyecto y en nuestro trabajo aun cuando ni yo misma lo hacía. Gracias por tu seguridad, tesón, motivación, esfuerzo y confianza en ti misma y en tu trabajo, y por siempre reflejarlo y transmitirlo. Ten por seguro que yo no estaría aquí hoy escribiendo esto si no fuera por ti. Junto a ti he crecido y te estaré eternamente agradecida. Tienes un equipo maravilloso y no te mereces menos. Eres una profesional y una persona increíble. Gracias.

Agradecer también a mis co-directores el Dr. Marcos Meseguer Escrivá y el Profesor Vicente Serra Serra, y a mi tutor académico, el Profesor José Remohí, por su ayuda y apoyo en la gestión administrativa y por ser también parte de esta tesis.

Por supuesto, esta tesis no habría sido posible de no haber estado en Fundación IVI. Gracias al Dr. Nicolás Garrido y al Profesor Antonio Pellicer por dejarme formar parte de esta increíble familia y sus instalaciones. Gracias también al resto de los IPs, Irene, Horten, Sonia y Paco, por ser parte fundamental de FIVI y por los buenos ratos en los congresos. También a Carmen e Inma, por su ayuda en la gestión administrativa, a todos los miembros de la UAGI, por su apoyo en la gestión de los proyectos, y a las técnicas de laboratorio Amparo, Jessica y en especial a Alicia, por siempre estar dispuesta a echar una mano en los experimentos.

Mis bioinfos, qué habría hecho yo sin vosotros. Patri, qué agradecida estoy a la vida por haberte puesto en mi camino. Por ser mi mami dentro del grupo, por enseñarme, apoyarme, ayudarme y guiarme. Porque los problemas siempre son menos problemas contigo. Por ponerme los pies en la tierra cuando me desmorono/agobio/estreso/meentra la ansiedad. Por

torturar conmigo los datos hasta conseguir algo bueno. Por las aventurillas vividas en Ámsterdam. Nuestras skills en inglés han mejorado considerablemente después de ese viaje. Quién nos iba a decir a nosotras que acabaríamos compartiendo cama en ESA habitación. Eres una gran mujer, madre, profesional y mentora. Te mereces todo lo bueno que te pase en la vida. Almu, la que fue mi primera profe. Gracias por enseñarme mucho de lo que sé a día de hoy. Ten por seguro que esta tesis tiene una gran parte tuya. Antonio, gracias por el apoyo profesional y personal. Por convertirte en un amigo. Por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera de FIVI. Fran, ha sido uno honor ser D última todo este tiempo, pero lamento mucho decirte que voy a ceder mi puesto a otra persona (lo siento Asunta). Ahora me toca a mí el turno de hacer mi propio ranking. Gracias por todos los conocimientos que me has transmitido, especialmente por enseñarme a cuidar mis celulitas. Aunque haya odiado tus “depende”. Asunta, la otra integrante de los revibros. Gracias por hacer más divertidos los días, contigo todo siempre son risas. A las más recientes incorporaciones que en poco más de un año se han convertido en imprescindibles para mí. Mi Nati, siempre con una sonrisa en la cara y un abracito y un “Didiiii” para subir el ánimo, con sus “buen diaaaa” que alegran las mañanas. Y por ese viaje tan increíble que compartimos, y que nos unió todavía más. Rebeca, mi compi de mesa. Si pensaba que no podía encontrar a alguien tan torpe como yo, llegaste tú para desmentirlo. Siempre serás la mejor compi de cultivos, de tesitos y de bolis cuquis que haya. Te has convertido en alguien muy importante para mi en muy poco tiempo. Elena, mi mano derecha. Tu tesón, dedicación y buen humor son envidiables, no podría tener una mejor compañera de proyecto. Lo que unió *Molto Beni* que no lo separe nadie. Quiero seguir regalándote naranjas con mucho blanco durante mucho más años. Sólo pido a la vida pasar muchos años más compartiendo risas y vida (y micrófono) con estas tres mujeres maravillosas. Gracias también a Pablo por los buenos momentos compartidos y a Ismael por los años que coincidimos en el grupo. Y a María Salvaleda, porque siempre es una alegría cuando vienes a FIVI, y por ser mi mayor frikicompi de libros. A todos vosotros, GRACIAS. Vuestra postdoc senior os quiere. No podría haber tenido un equipo mejor ni eligiéndolo.

Estos 4 años en Fundación IVI han puesto en mi vida a muchas personas maravillosas, que van a tener un hueco en mi corazón siempre. Mi Pepi, qué decir de ti.... Gracias por dejarme ser, contigo. Por contar siempre conmigo y ser una amiga tan especial. Y por traer a mi vida a tu Fran y Korita, que son un regalo. Qué suerte coincidir contigo, conectar, y seguir manteniéndote en mi vida. Eres un auténtico regalo. Marina, amiga, doy gracias al Máster por traerte a Valencia y ponerte en mi camino, pero doy más aún las gracias a Copenhague por estrechar nuestros lazos y unirnos más que nunca. Tengo bastante claro que ese viaje marcó un antes y un después en nuestra relación y para mi va a ser siempre muy especial. He

encontrado en ti un lugar seguro, y sé que siempre nos seguiremos haciendo de psicólogas la una a la otra. Anita, nuestra eterna presidenta. Eres una persona muy especial y estoy muy agradecida de haber compartido tantos buenos momentos durante estos años: meriendas, viajes.... Sé que a las tres os esperan cosas maravillosas en esta vida, porque os las merecéis, y quiero seguir celebrándolas con vosotras muchos años más. Os quiero. No me olvido por supuesto del resto de los Planetonsios: Adolfo, Eva, María Cristina, Emilio, Yassmin, Alejandro y María. Por todos los momentos compartidos dentro y sobre todo fuera de Fundación. Por ser el mejor team bodas, rutas y quedadas en general. Por los días de comida y juegos de mesa que se convierten en pasar 12 horas comiendo sin parar. Tampoco me olvido de mis dos compis de Máster y clínica favoritos: David y mi veci María Luisa. Hacer planes con vosotros es un gustazo.

Al resto de predocs y postdocs de FIVI: Aitana, Ana Belén, Rosa Pacheco, María Gómez, Paula, Clara, Andrea, Sara, Jeros, Cristina. Por los ratitos compartidos en las comidas, el laboratorio o los pasillos. Por hacer que los días de trabajo cuesten un poquito menos. Mención especial a las personas con las que he compartido congresos y viajes. A las del team Ámsterdam, Rosa Galán, Isabel Cuadrado y Anna Buigues, porque fue una gozada disfrutar con vosotras de la ciudad y vivir aventurillas, de las buenas y de las no tan buenas. El viaje fue *la bomba*. Y al team EEUU, Marcos, Alba y Robertito, por esas dos semanas increíbles en las que conocimos mundo y volvimos con miles de anécdotas, experiencias y didifotos. Ojalá poder repetir ese viaje.

Esta tesis no podría haber sido posible sin la colaboración de los y las profesionales de la clínica IVI Valencia. Gracias a los ginecólogos y las ginecólogas por su ayuda en el reclutamiento de pacientes y recogida de biopsias. A todo el personal de la clínica, especialmente a las enfermeras, por su colaboración. A Pilar Dolz y Eva Pérez por su ayuda en la evaluación psicológica de las pacientes, parte fundamental de esta tesis. Laura Caracena y Ana Sáez. GRACIAS. Por preocuparos por el reclutamiento como si esta tesis fuera vuestra. Por celebrar cada paciente reclutada como un gran logro. No sé qué habría hecho sin vosotras. Destacar también la colaboración de los y las profesionales del Servicio de Genómica y la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, en especial agradecer a Marina y Cristina.

A las babys, a las de toda la vida: Alba, Andrea, Carmen, Lara, Lorena, Maica, María, Marilu, Mayte y Paula. Por haber estado en todas las etapas de mi vida. Porque por mucho que pasen los años y la vida nos reparta por todas las partes del mundo, la vuelta a casa, los viajes y los reencuentros siempre son la mejor parte. Y ojalá que siempre sea así. Mención especial a mi Mj, por ser la que más me ha aguantado durante estos 4 años y la que ha sufrido

y se ha alegrado conmigo a partes iguales. Porque sabes que nunca voy a cumplir la regla de los audios de 30 segundos cuando tengo muchas cosas que contar (que suele ser casi siempre). Por todos los dramitas compartidos (que no son pocos). Y porque, aunque no nos veamos tanto como nos gustaría, cuando nos vemos, es como si no hubiera pasado el tiempo.

Yo que siempre soy de dejar lo mejor para el final, quiero cerrar estos agradecimientos con la parte más importante de mi vida: mi familia. Mis estrellitas del cielo, para quienes va dedicada esta tesis. Los que han hecho, durante años, que todo esto sea posible. Espero que estéis orgullosos de todo lo que estoy consiguiendo y todo lo que me queda por conseguir, aunque no lo dudo. Estoy segura de que siempre seréis mis mayores fans. Todo lo que soy y donde estoy a día de hoy es gracias a vosotros, y eso no se me va a olvidar nunca. Gracias por todo siempre. A mis padres. Necesitaría una hoja entera para agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí durante toda mi vida y me quedaría corta. Gracias por confiar en mí hasta en los peores momentos, por sacarme siempre a flote. Por conocerme mejor que yo misma. Por hacer siempre todo lo que está en vuestra mano para que consiga aquello que me propongo. Por inculcarme la importancia del trabajo y la constancia y formar a la persona que soy hoy en día. No podría haber tenido unos padres mejores. Sois y seréis siempre mi mayor tesoro. Os quiero.

A la que ahora es mi segunda familia: José, Vero y Esther. Gracias por acogerme como una más desde el primer día, hace ya más de 5 años, y hacerme sentir tan bien siempre.

Y aunque sé que nunca lo vas a leer, gracias mi bichito, mi niño, mi Oliver. Por ser el amor más puro que existe, mi compañero más fiel. Por las incontables horas que has pasado a mi lado mientras escribía esta tesis. Por todo lo que me has dado en estos casi 5 años. Mami te va a querer toda tu vida y toda la suya.

Por último, gracias a ti, Josep. Quién nos iba a decir a nosotros hace 6 años que hoy estaríamos aquí, juntos. Gracias por sostener mi mundo cuando se derrumbaba. Por ayudarme a ser una versión renovada y mucho mejor de mí misma. Por tu paciencia y apoyo incondicional. Gracias por querer quedarte y hacer que todo esto sea posible. Gracias por aguantarme hasta en mis peores días. Por saber cómo sacarme siempre una sonrisa. Gracias por dejar que juntos construyamos la preciosa familia que tenemos. Esto no ha hecho más que empezar, todavía nos queda la mejor parte. Gracias por todo. Siempre. Te quiero.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el grupo de Medicina Reproductiva Genómica y de Sistemas de Fundación IVI, que forma parte del grupo de Biomarcadores, Medicina Genómica, Estadística y Análisis Masivo de datos en Reproducción Humana Asistida del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), en colaboración con la clínica IVI Valencia.

Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación por parte del Centro para el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (IDI-20210289) y de Fundación IVI (1805-FIVI-033-PD), así como a la subvención del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU19/03247) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España y al contrato Miguel Servet (CP20/00118), financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación) y cofinanciado por la Unión Europea.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
1. El endometrio humano.....	3
2. Ciclo menstrual, regulación hormonal e implantación embrionaria	5
2.1. El ciclo menstrual	5
2.2. Ventana de implantación, receptividad y regulación hormonal	7
2.3. Mecanismos moleculares en la implantación y el desarrollo embrionario temprano.....	8
3. Esteroidogénesis y ruta de síntesis de hormonas esteroideas	11
3.1. Síntesis de hormonas esteroideas en glándulas esteroidogénicas.....	11
3.2. Síntesis de hormonas esteroideas en endometrio: intracrinología.....	14
4. El estrés como factor que afecta negativamente a la función endometrial	16
4.1. Fisiología de la respuesta al estrés	17
4.2. Estrés e infertilidad	20
4.3. Evaluación psicológica y fisiológica del estrés: situación actual	22
5. Tecnologías de alto rendimiento y medicina de precisión	26
5.1. Espectrometría de masas para la definición de biomarcadores: análisis del perfil esteroideo.....	27
5.2. Transcriptómica para el estudio del factor endometrial	30
5.3. Estrategias en investigación: Ciencia de día y ciencia de noche	33
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1. Diseño del estudio	45
2. Reclutamiento de pacientes y recogida de muestras biológicas	47
2.1. Aprobación ética y protección de datos.....	47
2.2. Preparación endometrial y obtención de biopsias.....	48
2.3. Seguimiento clínico y clasificación de las participantes	49
3. Caracterización molecular: Determinación de los niveles de esteroides en tejido endometrial por UPLC-MS/MS	50
4. Caracterización y clasificación psicológica de participantes empleando el cuestionario STAI	51
5. Asociación de biomarcadores moleculares de estrés con el éxito reproductivo y correlación con las puntuaciones del cuestionario STAI	52

6. Identificación de los mecanismos moleculares a través de los cuales el estrés afecta a la función endometrial	52
6.1. Procesamiento de las biopsias	52
6.2. Extracción de RNA y evaluación de la calidad	53
6.3. Generación de librerías y secuenciación	53
6.4. Preprocesado y análisis exploratorio de datos transcriptómicos	53
6.5. Estudio del comportamiento génico en función de las concentraciones de hormonas esteroideas y los cuestionarios psicológicos	54
7. Estudio del efecto del cortisol en la expresión génica de células endometriales estromales en cultivo	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
1. Caracterización demográfica y clínica de las poblaciones de pacientes FIV	59
2. Caracterización de metabolitos de la ruta de biosíntesis esteroidea de las poblaciones de pacientes FIV	60
3. Los niveles endometriales de hormonas esteroideas afectan a las probabilidades de lograr un embarazo a término	61
4. El cuestionario STAI es un método no invasivo que refleja los cambios fisiológicos endometriales en respuesta al estrés	72
5. Los cambios en los niveles de esteroides endometriales y el estrés afectan a la expresión génica y la función endometrial	82
6. El cortisol altera la expresión génica de células endometriales estromales en cultivo	102
7. La edad disminuye los niveles de estrona, androstenediona y cortisol en tejido endometrial	106
8. Fortalezas y limitaciones	110
CONCLUSIONES.....	113
REFERENCIAS.....	117
APÉNDICE A. Cuestionario STAI	145
APÉNDICE B. Tablas suplementarias.....	147
APÉNDICE C. Producción científica.....	183

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de los órganos internos del aparato reproductor femenino y composición del endometrio	4
Figura 2. El ciclo menstrual	6
Figura 3. Mecanismos moleculares en la implantación y el desarrollo embrionario temprano	10
Figura 4. Versión resumida de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas	13
Figura 5. Fisiología de la respuesta al estrés	18
Figura 6. Ciencias ómicas, biología de sistemas y medicina personalizada	27
Figura 7. Espectrometría de masas	29
Figura 8. Principales pasos en los protocolos de RNA-Seq de Illumina®	32
Figura 9. Aproximaciones bioinformáticas para el análisis de datos transcriptómicos.....	32
Figura 10. Estrategias de investigación: Ciencia de día vs ciencia de noche.....	34
Figura 11. Diseño del estudio	45
Figura 12. Tipos de preparación endometrial para la toma de una biopsia en un ciclo de evaluación.....	48
Figura 13. Los niveles endometriales de estrona, estradiol y androstenediona están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 1.....	66
Figura 14. Los niveles endometriales de estradiol, 17OHP4, DHEA y cortisol están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 2.....	67
Figura 15. Los estrógenos, andrógenos y corticosteroides en el microambiente endometrial juegan un papel clave para la consecución de un embarazo a término	68
Figura 16. El estrés agudo (evaluado con las puntuaciones de STAI Estado) afecta a las concentraciones de cortisol y estrógenos.....	76
Figura 17. Las puntuaciones del cuestionario STAI Estado están altamente correlacionadas con los niveles de cortisol, estradiol y estrona en el microambiente endometrial.....	77

Figura 18. El estrés prolongado (evaluado con las puntuaciones de STAI Rasgo) afecta a las concentraciones de DHEA.....	79
Figura 19. Cada tipo de estrés afecta mayoritariamente a una región diferente de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas	80
Figura 20. Comportamiento transcriptómico de los controles positivos y las réplicas técnicas empleadas en el protocolo de secuenciación de RNA. A) Gráfico del PCA con las 54 muestras	83
Figura 21. Corrección del efecto del RIN en el comportamiento transcriptómico de las muestras	84
Figura 22. Funciones en las que están implicados los genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de cortisol	85
Figura 23. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de cortisol.....	85
Figura 24. Funciones en las que están implicados los genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estrona.....	90
Figura 25. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de estrona	90
Figura 26. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de estradiol.....	93
Figura 27. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de DHEA	97
Figura 28. Intersección de genes (A) y funciones (B) significativamente influenciados por los cuatro metabolitos priorizados	97
Figura 29. Funciones comunes a las anotadas para los genes significativamente afectados por los niveles de cortisol y de estrona.....	98
Figura 30. Cambios en la expresión génica en función de las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo	99
Figura 31. Genes comunes afectados por el estrés y los metabolitos.....	101
Figura 32. El cortisol disminuye significativamente la expresión de GSK3A, RPRD2 y SETD2 en células endometriales estromales en cultivo	102
Figura 33. El cortisol afecta significativamente a la expresión de HBB, NCSTN y SNORA1 en células endometriales estromales en cultivo.	104

Figura 34. La expresión génica de las pacientes FIV se encuentra influida por los resultados reproductivos.	109
---	-----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuestionarios psicológicos aplicables en la evaluación en medicina reproductiva.	24
Tabla 2. Investigaciones realizadas en biomarcadores de estrés.	24
Tabla 3. Caracterización demográfica y clínica de las poblaciones de pacientes FIV.	59
Tabla 4. Caracterización metabólitos esteroideos de las poblaciones de pacientes FIV.	60
Tabla 5. Influencia de variables clínicas y variables relativas a la transferencia embrionaria en los resultados reproductivos en las poblaciones 1 y 2.	61
Tabla 6. Influencia del tipo de preparación endometrial previa a la toma de la biopsia en la concentración de hormonas esteroideas en tejido endometrial para los análisis relativos a los resultados reproductivos en la población 2.	63
Tabla 7. Los niveles de estradiol endometrial se encuentran relacionados con el éxito reproductivo.	64
Tabla 8. Influencia de variables demográficas y variables clínicas en la caracterización psicológica por el test STAI dimensión Estado.	73
Tabla 9. Influencia de variables demográficas y variables clínicas en la caracterización psicológica por el test STAI dimensión Rasgo.	73
Tabla 10. Influencia del tipo de preparación endometrial previa a la toma de la biopsia en la concentración de hormonas esteroideas en tejido endometrial para los análisis relativos a la caracterización psicológica.	74
Tabla 11. El estrés agudo (determinado por las puntuaciones de STAI Estado) provoca aumentos en las concentraciones endometriales de cortisol y estrona.	75
Tabla 12. El estrés prolongado (determinado por las puntuaciones de STAI Rasgo) provoca disminuciones en las concentraciones endometriales de estrona y DHEA.	78
Tabla 13. Características de la población de voluntarias sanas.	106
Tabla 14. Comparación de características demográficas entre las pacientes FIV (población 2) y las voluntarias sanas (población 3).	107

Tabla 15. La edad disminuye las concentraciones de estrona, androstenediona y cortisol en tejido endometrial.....	108
--	-----

LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla Suplementaria 1. Primers empleados para la RT-qPCR.	147
Tabla Suplementaria 2. Los niveles endometriales de estrona, estradiol y androstenediona están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 1.	147
Tabla Suplementaria 3. Los niveles endometriales de estradiol, 17OHP4, DHEA y cortisol están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 2.	149
Tabla Suplementaria 4. El estrés agudo (evaluado con las puntuaciones de STAI Estado) afecta a las concentraciones de cortisol y estrógenos.	151
Tabla Suplementaria 5. El estrés prolongado (evaluado con las puntuaciones de STAI Rasgo) afecta a las concentraciones de DHEA.	153
Tabla Suplementaria 6. 182 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de cortisol.	156
Tabla Suplementaria 7. 501 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estrona.	162
Tabla Suplementaria 8. 9 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estradiol.	181
Tabla Suplementaria 9. 12 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estrés a largo plazo (evaluado por las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo).	181

ABREVIATURAS

11 β HSDs *11-beta-hydroxysteroid dehydrogenases*

17OHP4 17-hidroxiprogesterona

17OHP5 17-hidroxipregnenolona

17 β HSDs *17-beta-hydroxysteroid dehydrogenases*

2-ME1 2-metoxiestrona

3 β HSDs *3-beta-hydroxysteroid dehydrogenases*

A4 Androstenediona

ACTH Hormona adenocorticotropa

AKR1C *Aldo-keto reductase type 1C*

BCORL1 *BCL6 Corepressor like 1*

BEX4 *Brain expressed X-linked 4*

cDNA DNA complementario

CORO1A *Coronin 1A*

CPM *Counts per Million*

CRH Hormona liberadora de corticotropina

CYP1A1 *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1*

CYP11A1 *Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1*

CYP11B1 *Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 1*

CYP11B2 *Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 1*

CYP17A1 *Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*

CYP19A1 *Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*

CYP21A2 *Cytochrome P450 Family 21 Subfamily A Member 1*

DART	Análisis directo en masas a tiempo real
DEA	<i>Differential expression analysis</i> /análisis de expresión diferencial
DHEA	Dehidroepiandrostediona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
ESR1	<i>Estrogen receptor 1</i>
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FSH	Hormona foliculoestimulante
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
GC-MS	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPR63	<i>G-coupled protein receptor 63</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i> /Enriquecimiento de conjuntos de genes
GSK3A	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha</i>
HBB	<i>Hemoglobin Subunit Beta</i>
HESC	Células endometriales estromales humanas
HOXA-10	<i>Homeobox A10</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HYLS1	<i>Centriolar and Ciliogenesis associated protein</i>

IFT27	<i>Intraflagellar transport 27</i>
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de masa corporal
INCA1	<i>Inhibitor of CDK, Cyclin A1 Interacting Protein 1</i>
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
lncRNAs	<i>long non-coding RNAs</i>
LOD	Límite de detección
MAN1B1	<i>Mannosidase Alpha Class 1B Member 1</i>
MAPK	Quinasa de proteínas activada por mitógenos
MAPK1	Quinasa de proteínas activada por mitógenos 1
MS	Espectrometría de masas
MST4	<i>Serine/Threonine Kinase 26</i>
MUC1	Mucina 1
NCSTN	<i>Nicastrin</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> /Secuenciación de nueva generación
NK	<i>Natural killer</i>
ORA	<i>Over-representation analysis</i> /análisis de sobre-representación
P4	Progesterona
PCA	<i>Principal component analysis</i> /Análisis de componentes principales

PCDH17	<i>Protocadherin 17</i>
PGT	<i>Preimplantation Genetic Testing</i>
PVCA	<i>Principal Variance Component Analysis</i>
Q1	Primer cuartil
Q2	Mediana
Q3	Tercer cuartil
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación de RNA
RNV	Recién nacido vivo
RPRD2	<i>Regulation of Nuclear Pre-mRNA Domain Containing 2</i>
RPSA	<i>Ribosomal protein SA</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SAAL1	<i>Serum Amyloid A Like 1</i>
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SERPINE1	<i>Serpin Family E Member 1</i>
SETD2	<i>SET Domain Containing 2, histone lysine methyltransferase</i>
sncRNAs	<i>small non-coding RNAs</i>
SNORA1	<i>Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 1</i>
snoRNAs	<i>Small nucleolar RNAs</i>
SNPs	Cambios en un solo nucleótido
SRD5As	<i>Steroid 5 alpha-reductase</i>
STAI	<i>State-Trait Anxiety Inventory</i> /Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica

STAR *Spliced Transcripts Alignment Reference*

STK26 *Serine/Threonine Kinase 26*

STS *Steroid sulfatase*

SULT1E1 *Sulfotransferase family 1E member 1*

T Testosterona

TGIF1 *TGFB Induced Factor Homeobox 1*

THS Terapia hormonal sustitutiva

TRA Tratamientos de reproducción asistida

UPLC Cromatografía líquida de ultra alta resolución

UPLC-MS/MS Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida de alta resolución

WAS *Actin Nucleation Promoting Factor*

WOI Ventana de implantación/Window of implantation

ZNF668 *Zinc finger protein 668*



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. El endometrio humano

El aparato reproductor femenino está formado por los órganos internos (ovarios, trompas de Falopio, útero y vagina) (**Figura 1A**) y los órganos externos (periné y vulva). Dentro de los órganos internos, el **útero** es un órgano hueco y muscular, localizado entre la vejiga y el recto, y cuya principal función es la de albergar el óvulo fecundado y nutrir al embrión en desarrollo hasta su nacimiento, o, en caso contrario, eliminar este óvulo no fecundado durante la menstruación (Jones and Lopez, 2013; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2016).

En promedio, un útero no gestante mide unos 5 cm de ancho y 7 cm de largo, con 3 cm de grosor, medidas que aumentan hasta cuatro veces durante el embarazo. La parte interior de este órgano, que tiene forma de triángulo invertido, se encuentra dividida en cuatro segmentos anatómicos principales: el fundus (amplia zona curvada superior, localizada por encima de la entrada de las trompas de Falopio), el cuerpo (parte principal del útero, que comienza justo por debajo del nivel de las trompas de Falopio), el istmo (une el cuerpo con el cuello uterino), y el cuello uterino o cérvix (se extiende desde el istmo hacia abajo y se abre en la vagina) (**Figura 1A**). Histológicamente, la pared uterina está compuesta por tres capas: el perimetrio, la capa serosa externa; el miometrio, la capa muscular intermedia; y el endometrio, la capa mucosa interna (Simón *et al.*, 2009; Rogers, 2010) (**Figura 1B**).

El **endometrio** es un tejido dinámico, que juega un papel fundamental en la implantación embrionaria y los procesos de adhesión e invasión subyacentes, y cuyo desarrollo adecuado y coordinado es clave en el establecimiento de un embarazo (Simón *et al.*, 2009; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2016). Está subdividido en cuatro compartimentos: epitelial, estromal, vascular e inmune (**Figura 1B**). El revestimiento uterino está formado por un **epitelio** columnar simple y polarizado, dividido en glándulas y epitelio luminal. El epitelio cambia su morfología en función de la fase del ciclo menstrual, desarrollando microvellosidades durante la fase proliferativa, que disminuyen durante la fase secretora, siendo estos cambios fundamentales para que la implantación se lleve a cabo de forma exitosa. De hecho, la función principal de este compartimento epitelial es la de asegurar la implantación embrionaria, actuando como primer mediador en el diálogo materno-fetal, y siendo el epitelio glandular el encargado de producir moléculas de sustento para el embrión. El **estroma endometrial** es un tejido conectivo constituido por células, principalmente fibroblastos, y matriz extracelular. Los fibroblastos son los principales implicados en la regulación de la implantación, ya que, durante el proceso conocido como decidualización, sufren una serie de cambios que regulan

la invasión del trofoblasto en el útero materno. El **componente inmune endometrial**, entre cuyas funciones destaca el evitar el rechazo inmunológico al embrión durante la implantación, está formado principalmente por células *Natural Killer* (NK) uterinas, macrófagos y linfocitos T, y comprende entre un 10 y un 15% de las células del estroma. Por último, el **componente vascular** está formado principalmente por una red de vasos sanguíneos. Una adecuada angiogénesis es crucial dada la ciclicidad intrínseca del endometrio y la gran variedad de procesos que sustenta, siendo indispensable para el desarrollo endometrial, la implantación y la placentación.

Estos cuatro compartimentos se encuentran distribuidos en las dos capas endometriales principales: funcional y basal. La capa funcional se transforma y regenera cada mes durante la menstruación, mientras que la capa basal se encarga de que esta regeneración cíclica se dé de manera rápida y eficiente gracias a su reservorio de células madre (Simón *et al.*, 2009) (**Figura 1B**).

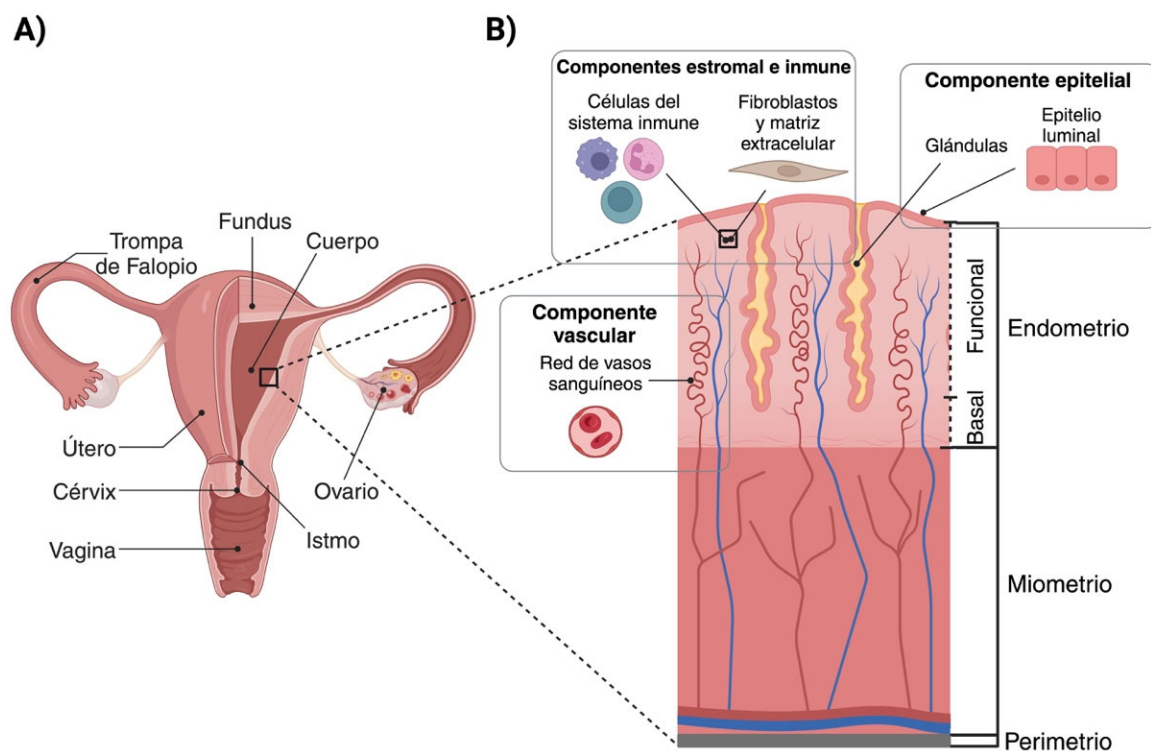


Figura 1. Anatomía de los órganos internos del aparato reproductor femenino y composición del endometrio. A) Principales órganos internos del aparato reproductor femenino y segmentos anatómicos uterinos. B) Composición del endometrio. Se esquematizan las tres capas que forman la pared uterina (perimetrio, miometrio y endometrio), los cuatro componentes que forman el endometrio (epitelial, estromal, vascular e inmune) y las dos capas en las cuales se distribuyen esos cuatro compartimentos (basal y funcional). Figura creada con Biorender.com

2. Ciclo menstrual, regulación hormonal e implantación embrionaria

2.1. El ciclo menstrual

El endometrio es un tejido multicelular y dinámico que sufre modificaciones durante el ciclo menstrual provocando su constante renovación. Esta renovación está orquestada por cambios cíclicos en los niveles de las hormonas esteroideas, principalmente 17β -estradiol (estradiol, E2) y pregn-4-en-3,20-diona (progesterona, P4), guiados por el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. De forma breve, el hipotálamo, mediante la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), influencia la producción de hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por parte de la hipófisis. Estas gonadotropinas se encargan de regular la actividad ovárica, induciendo la producción y liberación de E2 y P4 por parte de las células de la teca y la granulosa, fomentando también la foliculogénesis y, en última instancia, la ovulación. Son estas hormonas las que, al unirse a sus receptores endometriales, regulan los cambios morfológicos y funcionales del tejido. En definitiva, el ciclo menstrual es el resultado de interacciones altamente reguladas entre el cerebro, la hipófisis, los ovarios y el endometrio, conllevando cambios tanto a nivel ovárico como a nivel endometrial (Jones and Lopez, 2013; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2016).

El ciclo menstrual tiene una duración media de 28 días, con un rango de variación de entre 21 y 35 días, extendiéndose desde la menarquia (primera menstruación, en torno a los 12 años) hasta la menopausia (ausencia de menstruación, que se da entre los 45 y los 53 años). A nivel endometrial, se divide en menstruación, fase proliferativa y fase secretora. De forma paralela, en el ovario, ocurren las fases folicular y lútea. La menstruación y la fase proliferativa coinciden con la fase folicular ovárica, mientras que la fase secretora endometrial se da al mismo tiempo que la fase lútea ovárica (Jones and Lopez, 2013; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2016; Jain *et al.*, 2022). A continuación, se detallan las características de estas fases (**Figura 2**):

- **Menstruación (días 0-5/7):** En ausencia de un embarazo, el cuerpo lúteo ovárico degenera, provocando el descenso en los niveles de P4. En consecuencia, en la capa funcional endometrial se producen una serie de eventos celulares y moleculares, como apoptosis e inflamación, que culminan con su desprendimiento y expulsión a través del canal cervical, lo que se conoce como menstruación. Seguidamente, esta capa es regenerada rápidamente gracias a las células madre de la capa basal, comenzando así la fase proliferativa.

- **Fase proliferativa/fase folicular (días 5/7-14):** Los folículos en creciente desarrollo en el ovario secretan E2, llevando al endometrio a crecer y desarrollarse, aumentando el tamaño de las glándulas y el aporte sanguíneo. Debido al aumento continuado de los niveles estrogénicos, se produce un pico de LH en sangre que causa la rotura del folículo dominante, la liberación del óvulo a las trompas de Falopio y, por tanto, la ovulación (9-12 horas posteriores al pico de LH), dando comienzo a la fase secretora/lútea.
- **Fase secretora/fase lútea (días 14-28):** Durante esta fase, el ambiente endometrial se prepara para la posible llegada e implantación de un embrión y para el adecuado mantenimiento de un embarazo: el endometrio se engrosa, las glándulas secretan glucógeno y moco, y los músculos del miometrio se contraen menos frecuentemente que en la fase anterior. Estos cambios vienen fomentados por la transformación del folículo ovulado en un cuerpo lúteo, el cual libera P4, aumentando sus niveles en sangre, que se mantendrán en el caso de que se dé un embarazo. La fase secretora puede dividirse en temprana (días 14-18), media (días 18-24) y tardía (días 24-28).

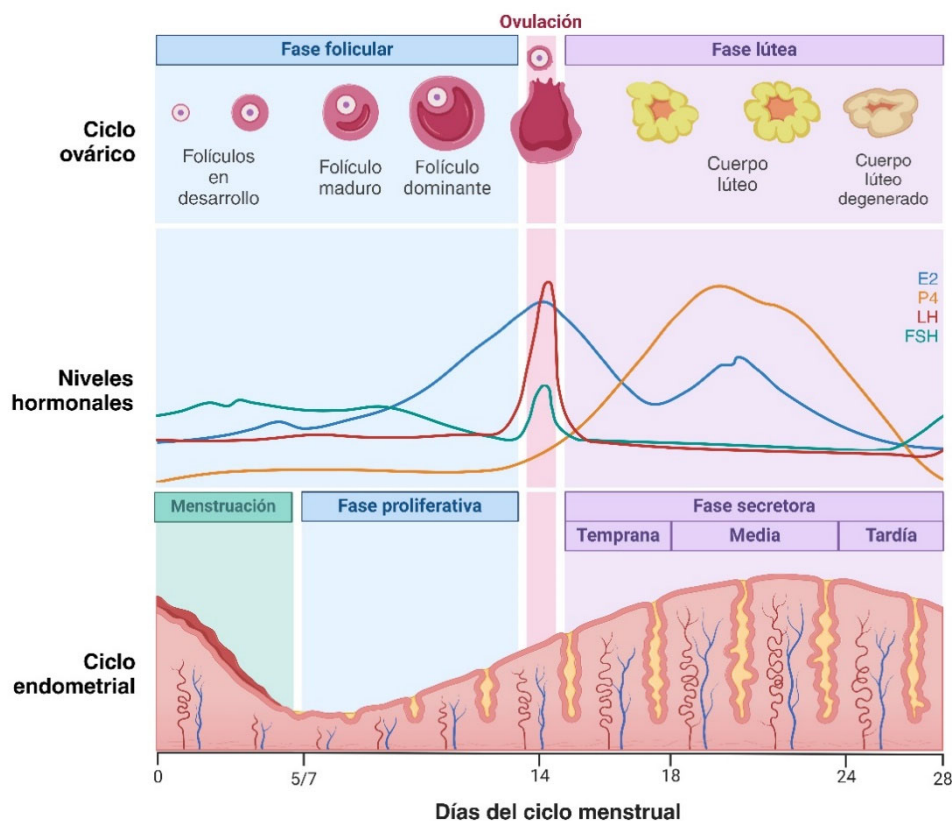


Figura 2. El ciclo menstrual. En la figura se esquematizan las fases del ciclo menstrual endometrial (menstruación, proliferativa y secretora) y ovárico (folicular y lútea) así como las concentraciones relativas

en suero de estradiol (E2), progesterona (P4), hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Figura creada con Biorender.com

2.2. Ventana de implantación, receptividad y regulación hormonal

Durante la fase secretora media, el endometrio sufre cambios morfológicos, histológicos, celulares, funcionales y en última instancia moleculares que permiten que adquiera su fenotipo receptivo característico y se encuentre en un estado óptimo para la implantación embrionaria, mantenimiento del embarazo y posterior desarrollo placentario (Noyes *et al.*, 1975; Talbi *et al.*, 2006). Al corto periodo de tiempo de entre 2 y 5 días dentro de la fase secretora media, en el cual el endometrio se encuentra en un estado de **máxima receptividad endometrial**, se le conoce como **ventana de implantación** (WOI, *window of implantation*) (Bergh and Navot, 1992; Harper, 1992; Wilcox *et al.*, 1999).

La reproducción humana es inesperadamente ineficiente en comparación con otras especies, ya que solo alrededor de un 25% de las concepciones naturales acaban en recién nacidos vivos (Zinaman *et al.*, 1996). La implantación embrionaria es un paso limitante que requiere de una comunicación coordinada y bidireccional entre el embrión y el endometrio. Aunque la calidad embrionaria es uno de los principales determinantes del éxito de este proceso, un endometrio competente es completamente necesario para conseguir la implantación y el desarrollo embrionario temprano (Somigliana *et al.*, 2018; Craciunas *et al.*, 2019; Pirtea *et al.*, 2021; Gill *et al.*, 2024).

Para asegurar la sincronía entre el embrión y el desarrollo endometrial, de forma que el óvulo recién fecundado llegue al endometrio en su momento de máxima receptividad y consiga implantar, se requiere de una rigurosa y coordinada señalización hormonal a lo largo de todas las fases del ciclo menstrual (de Ziegler *et al.*, 1998). De hecho, diversos estudios confirman que aquellas mujeres con niveles subóptimos de P4 en suero durante la fase secretora temprana y/o media ven reducidas sus probabilidades de conseguir y mantener un embarazo a término (Thomsen *et al.*, 2018), debido a cambios en sus perfiles de expresión génica que dan lugar a una reducción en la receptividad endometrial (Labarta *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2017).

A parte de la ya descrita relevancia de E2 y P4 en el correcto funcionamiento del ciclo menstrual y el desarrollo endometrial, mediante la modulación de la expresión génica de las células epiteliales y estromales, y la remodelación funcional y estructural que ocurre durante la deciduización, otras hormonas juegan un papel clave en este proceso. En los últimos años, la detección del receptor de andrógenos en tejido endometrial ha sentado las bases

para la demostración del papel crucial que los andrógenos poseen en la regulación del ciclo menstrual. Diversos estudios han demostrado que estas hormonas afectan al proceso de decidualización, reducen la proliferación, migración y supervivencia de células epiteliales, así como la diferenciación celular durante el embarazo y la regeneración durante la menstruación (Simitsidellis *et al.*, 2018; Gibson *et al.*, 2020). Además, la desregulación de sus niveles se ha asociado con enfermedades como la endometriosis y el cáncer endometrial (Simitsidellis *et al.*, 2018). Por su parte, los glucocorticoides, como el cortisol, también son importantes en la función endometrial y el mantenimiento del embarazo. Sin embargo, niveles elevados de estos esteroides pueden llegar a impedir la consecución de un embarazo (Whirledge and Cidlowski, 2017; Bhaumik *et al.*, 2023).

Lejos de actuar de forma independiente, muchos estudios han evidenciado la interconexión de todas estas hormonas (E2, P4, andrógenos y corticosteroides) y la regulación mutua de su actividad y sus niveles. De hecho, durante la fase secretora, cuando la producción de P4 es alta, se reduce la expresión de los receptores de estrógenos, disminuyendo así el ambiente estrogénico (Tseng and Gurpide, 1975). Por otro lado, mientras que los estrógenos aumentan la expresión del receptor de andrógenos, la progesterona la disminuye, regulando así la actividad androgénica endometrial (Simitsidellis *et al.*, 2018). La conexión de estas hormonas no se limita únicamente a su regulación a nivel de receptores, si no que se encuentran íntimamente relacionadas dado que son producidas en la misma ruta biosintética, la ruta de síntesis de hormonas esteroideas, siendo unas las precursoras de las otras (Bremer and Miller, 2014).

2.3. Mecanismos moleculares en la implantación y el desarrollo embrionario temprano

Aunque el riguroso control de las hormonas esteroideas sobre el desarrollo endometrial juega un papel clave en la sincronía endometrio-embrión, otros mecanismos moleculares, como los que se van a describir a continuación, son también imprescindibles para asegurar el buen funcionamiento de todos estos procesos.

Los primeros pasos del desarrollo embrionario tienen lugar en las trompas de Falopio; una vez el óvulo ha sido fecundado exitosamente por un espermatozoide, se suceden una serie de divisiones celulares que dan lugar a la formación del blastocisto (día 5-6 del desarrollo embrionario), compuesto por la masa celular interna, que dará lugar a las estructuras fetales, y el trofoectodermo, una capa de células que rodea a la masa celular interna y que dará lugar a la placenta (**Figura 3**). En este estadio, el embrión se desprende de la zona pelúcida (capa

protectora glicoproteica), en un proceso denominado *hatching*, y un subconjunto de células del trofoectodermo interactúa con las células endometriales del fundus uterino, mediando la adhesión al endometrio durante la implantación. Este proceso tiene lugar en tres fases secuenciales, que requieren de la correcta expresión de moléculas por parte del embrión, la adecuada progresión endometrial y alcance del estado de receptividad, y la comunicación coordinada entre ambos mediante la activación de diversas rutas de señalización (**Figura 3**) (Massimiani *et al.*, 2019; Ojosnegros *et al.*, 2021):

1. **Aposición:** La aposición constituye el primer contacto físico débil entre el blastocisto y el endometrio a través de las células del trofoectodermo, encontrando el blastocisto un sitio para implantar guiado por el endometrio. Las microvellosidades de la superficie apical del trofoectodermo interdigitan con los pinopodos localizados en la superficie apical del epitelio uterino, haciendo que las membranas de ambos se encuentren paralelas. Este primer contacto desencadena el diálogo materno-fetal, que promueve la proliferación estromal, inhibe la apoptosis endometrial e induce la decidualización y la permeabilidad vascular, promoviendo que el ambiente endometrial sea óptimo para las siguientes fases (**Figura 3A**).
2. **Adhesión:** La asociación entre el endometrio y el trofoectodermo se vuelve más fuerte con la interacción de las moléculas de adhesión (integrinas, cadherinas y selectinas). Esta unión estable promueve la activación de rutas de señalización esenciales para que continúe y aumente la decidualización. Una vez que se ha producido la adhesión, el epitelio se abre, permitiendo que el trofoectodermo lo atraviese (**Figura 3B**).
3. **Invasión:** El trofoectodermo invade el componente estromal endometrial para alcanzar el componente vascular y asegurar el suministro de sangre. Al hacerlo, las células trofoblásticas proliferan y se diferencian en tipos celulares específicos; el sincitiotrofoblasto, que constituye la interfaz entre el embrión y los vasos sanguíneos maternos, y el citotrofoblasto. Para que esto ocurra, el embrión debe cruzar una intrincada matriz compuesta por colágeno, lamininas y otras proteínas, la cual degrada parcialmente secretando diferentes tipos de proteinasas. Estos factores son secretados por diferentes tipos celulares de la superficie materno-fetal, tanto del trofoectodermo como del endometrio, promoviendo así la invasión, pero regulando también su extensión (**Figura 3C**).

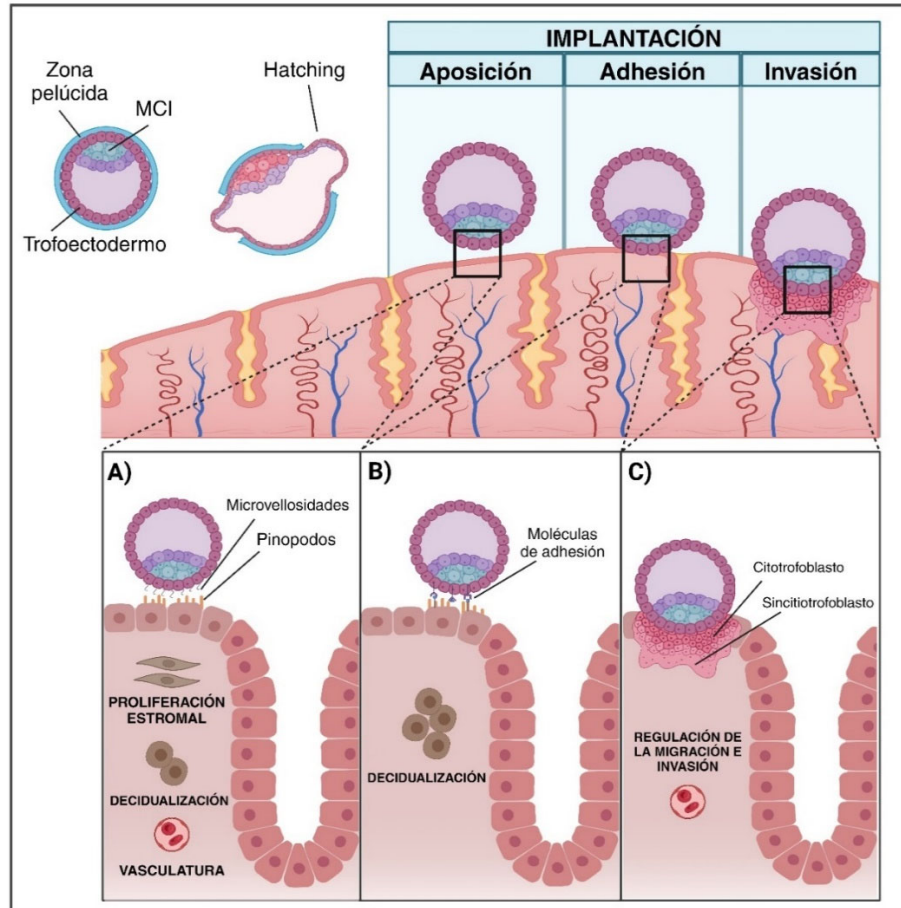


Figura 3. Mecanismos moleculares en la implantación y el desarrollo embrionario temprano. La implantación embrionaria ocurre en tres fases secuenciales: **A) aposición**, **B) adhesión** y **C) invasión**. Los principales mecanismos moleculares subyacentes se esquematizan en la figura. MCI: masa celular interna. Figura creada con Biorender.com

Culminada la implantación, el embrión comienza su desarrollo, que finalizará con un embarazo a término. La tolerancia inmune materno-fetal, proceso que hace referencia a los mecanismos llevados a cabo por la decidua para proteger al embrión del sistema inmune materno, es clave en el mantenimiento y continuidad del embarazo. En este proceso, las células T reguladoras producen citocinas inmunosupresoras, como la interleucina 10 (IL-10), para suprimir la respuesta inmune e inducir la inmunotolerancia. Otras células importantes son las NK, que ayudan y favorecen el embarazo aumentando la angiogénesis y reduciendo la inflamación, mediando así en el desarrollo placentario (Massimiani *et al.*, 2019).

Es de vital importancia estudiar y entender aquellos factores que puedan afectar al proceso de implantación endometrial y desarrollo temprano a través de alteraciones en sus mecanismos subyacentes (adhesión, sistema inmune, señalización), los cuales reducen las probabilidades de alcanzar un embarazo a término.

3. Esteroidogénesis y ruta de síntesis de hormonas esteroideas

Las **hormonas esteroideas**, o esteroides, son un grupo de moléculas derivadas del colesterol (ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano) que poseen un papel clave en dirigir procesos fisiológicos complejos en el cuerpo humano. Entre estos procesos destaca el metabolismo, la respuesta al estrés o la diferenciación sexual y reproducción, entre otros, alterando importantes procesos fisiopatológicos, y estando durante décadas en el punto de mira de la comunidad científica. En mamíferos, se han definido seis familias de hormonas esteroideas diferenciadas química y biológicamente: estrógenos, progestágenos, andrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y vitamina D (Acconcia and Marino, 2018). La **esteroidogénesis**, o biosíntesis de esteroides, es el proceso mediante el cual el colesterol es convertido en hormonas esteroideas biológicamente activas. Este proceso tiene lugar principalmente en las glándulas esteroidogénicas: glándulas adrenales, gónadas (ovarios y testículos) y placenta. Una vez producidos, estos esteroides son liberados al torrente sanguíneo, de forma que se diseminan por el organismo y puedan ejercer sus funciones en los órganos diana. Sin embargo, la producción de esteroides no se limita únicamente a las glándulas esteroidogénicas, sino que también pueden producirse en esos órganos y tejidos diana a partir de la transformación de precursores (Jones and Lopez, 2013; Bremer and Miller, 2014).

3.1. Síntesis de hormonas esteroideas en glándulas esteroidogénicas

La esteroidogénesis en las glándulas esteroidogénicas comienza con la entrada del colesterol a la célula y su transporte hasta la membrana mitocondrial externa. La liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) por parte de la hipófisis provoca su movilización y entrada a la ruta de síntesis de hormonas esteroideas; ahí es cuando la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) transfiere el colesterol a la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra localizada la enzima CYP11A1 (*Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1*), y se da el primer paso de la ruta: la conversión de colesterol en pregnenolona (**Figura 4**). Este paso inicial, altamente regulado y limitante, sólo puede ser realizado por ciertas células del organismo, como las células de Leydig en los testículos, células de la teca en los ovarios, células trofoblásticas en la placenta, y células del córtex en la glándula adrenal (Ghayee and Auchus, 2007; Jones and Lopez, 2013; Bremer and Miller, 2014).

El segundo paso dentro de la producción de esteroides conlleva la metabolización de la pregnenolona en diferentes intermediarios y esteroides activos (Ghayee and Auchus, 2007) (**Figura 4**). La producción de unas hormonas u otras por cada una de las glándulas esteroidogénicas responde a la expresión diferencial de enzimas; de hecho, incluso dentro de cada glándula, hay esteroides que sólo son sintetizados en un tipo celular concreto (Ghayee and Auchus, 2007; Schiffer *et al.*, 2019). Las glándulas adrenales están formadas por tres zonas funcionales diferenciadas que sintetizan un tipo hormonal concreto: la zona externa o zona glomerulosa sintetiza aldosterona; la zona media o zona fasciculata sintetiza cortisol; y la zona interna o zona reticularis sintetiza precursores androgénicos como la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Ghayee and Auchus, 2007; Schiffer *et al.*, 2019). Es decir, las glándulas adrenales se encuentran más centradas en la síntesis de corticosteroides, andrógenos y precursores androgénicos. Sin embargo, los testículos y los ovarios, que poseen limitada capacidad de sintetizar aldosterona o cortisol, priorizan la síntesis de andrógenos y estrógenos (Ghayee and Auchus, 2007). En el ovario, la esteroidogénesis también se encuentra compartimentalizada: las células de la teca producen androstenediona (A4), un andrógeno débil, a partir del colesterol, pasando por la 17-hidroxipregnenolona (17OHP5) y la DHEA, mientras que las células de la granulosa, que no pueden producir sus propios andrógenos, se encargan de utilizar esta A4 para transformarla en testosterona (T) y finalmente en E2 y estrona (E1). Por su parte, el cuerpo lúteo se encarga de la producción de P4 directamente a partir de la pregnenolona, que, además de servir de precursora para otros esteroides, viaja por el torrente sanguíneo hacia otros órganos como el útero y las glándulas mamarias (Jones and Lopez, 2013; Schiffer *et al.*, 2019).

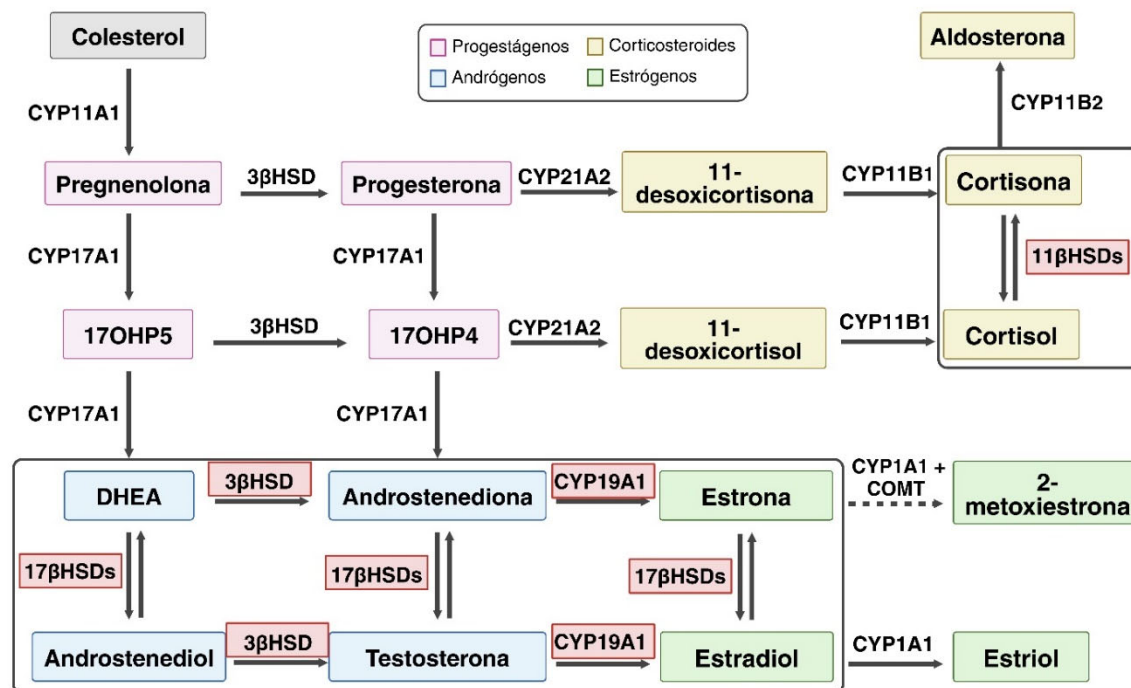


Figura 4. Versión resumida de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas. Las flechas continuas indican transformaciones directas entre hormonas, mientras que las líneas discontinuas indican transformaciones no directas, no mostrándose los intermediarios. Resaltadas en rojo se encuentran aquellas enzimas que se expresan en tejido endometrial según la literatura, y las transformaciones que se dan en endometrio están encuadradas. Los niveles androgénicos, estrogénicos y de corticosteroides en el microambiente endometrial se modifican por las conversiones de unos precursores en otros. 17OHP5: 17-hidroxipregnenolona; 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; 3βHSD: 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase; 11βHSD: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase; 17βHSD: 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase; COMT: Catechol-o-methyltransferase; CYP1A1: Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1; CYP11A1: Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1; CYP11B1: Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 1; CYP11B2: Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 2; CYP17A1: Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1; CYP19A1: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1; CYP21A2: Cytochrome P450 Family 21 Subfamily A Member 2; DHEA: dehidroepiandrosterona. Figura creada con Biorender.com con información extraída de Ghayee and Auchus 2007 y Bremer and Miller 2014.

En la biosíntesis de hormonas esteroideas están involucradas principalmente dos clases funcionales de enzimas: las enzimas de la familia del citocromo (CYP) 450 y las enzimas hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD) (Bremer and Miller, 2014). Las enzimas CYP se pueden dividir en tipo I, localizadas en la membrana mitocondrial interna (como es el caso de la anteriormente mencionada CYP11A1) y tipo II, localizadas en el retículo endoplásmico. Concretamente, en la esteroidogénesis participan 7 enzimas CYP: CYP11A1, CYP11B1 (*Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 1*), CYP11B2 (*Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 2*), CYP17A1 (*Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1*), CYP21A2 (*Cytochrome P450 Family 21 Subfamily A Member 2*) y CYP19A1 (*Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*) y CYP1A1 (*Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1*) (Bremer and Miller, 2014) (**Figura 4**). Las enzimas HSD también se dividen en dos superfamilias basándose en su plegamiento: las deshidrogenasas de cadena corta y las aldo-ceto reductasas. La función de las enzimas de ambas familias es la de catalizar la

conversión de un hidroxiesteroide en su homólogo cetoesteroide correspondiente y viceversa, regulando así su actividad en receptores esteroideos específicos (Schiffer *et al.*, 2019). Dentro de esta clase funcional, en la esteroidogénesis intervienen enzimas como las 3 β HSDs (3-*beta-hydroxysteroid dehydrogenases*), las 11 β HSDs (11-*beta-hydroxysteroid dehydrogenases*) y varias 17 β HSDs (17-*beta-hydroxysteroid dehydrogenases*) (Bremer and Miller, 2014) (**Figura 4**). Cabe destacar, como se puede observar en la Figura 4, que muchas de las reacciones catalizadas por las enzimas HSD son reversibles y pueden funcionar bidireccionalmente; sin embargo, la realidad es que, *in vivo*, una direccionalidad predomina frente a la otra (Bremer and Miller, 2014). Una excepción a esta regla es el caso de las dos isoformas de la enzima 3 β HSD (3 β HSD1 y 2), la cual se encarga, entre otras, de la transformación de pregnenolona en progesterona (**Figura 4**), y cuya reacción es irreversible (Schiffer *et al.*, 2019).

3.2. Síntesis de hormonas esteroideas en endometrio: intracrinología

A pesar de que tradicionalmente se ha descrito que la producción de esteroides activos está únicamente limitada a las glándulas esteroidogénicas, en los últimos años, un gran número de estudios ha demostrado que otros órganos o tejidos, como el cerebro, el intestino o incluso el endometrio, poseen la maquinaria enzimática necesaria para producir esteroides activos a partir de precursores esteroideos en sangre. Esta capacidad de transformación de los tejidos periféricos fue acuñada con el nombre de **intracrinología** (Labrie *et al.*, 1988). En estos tejidos, las hormonas ejercen su función directamente en la célula en la cual se han producido, sin ser liberados extracelularmente; esto hace de la actividad intracrina un sistema local más eficiente que la actividad endocrina (donde las hormonas son liberadas al torrente sanguíneo, se transportan y ejercen su función sobre un órgano o tejido distante), ya que se necesitan concentraciones hormonales mucho menores para ejercer la misma función, además del ahorro de tiempo que supone no tener que transportarlas (Labrie, 1991).

La expresión diferencial de enzimas esteroidogénicas en cada tejido periférico implica que la producción de hormonas específicas para el correcto funcionamiento de dicho tejido es diferente entre ellos, así como las rutas e intermediarios producidos. En concreto, en tejido endometrial, se ha descrito la expresión de enzimas 17 β HSDs tipo 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, y 14, así como sulfatasas (STS (*Steroid sulfatase*) y SULT1E1 (*Sulfotransferase family 1E member 1*)), la aromatasa (CYP19A1), 3 β HSDs, SRD5As (*Steroid 5 alpha-reductase*), AKR1C (*Aldo-keto reductase type 1C*), y 11 β HSD tipo 2, enzima encargada de la conversión de cortisona en cortisol y su inactivación, regulando los niveles corticosteroides endometriales

(Figura 4, enzimas marcadas en rojo). Algunos estudios también han reportado la detección de las enzimas encargadas de convertir el colesterol en DHEA (CYP11A1, CYP17A1 y StAR), proceso hasta ahora descrito únicamente para las glándulas esteroidogénicas, sugiriendo que el endometrio también sería capaz de producir esteroides activos a partir de colesterol, a pesar de que todavía ningún estudio ha identificado esteroidogénesis *de novo* en tejido endometrial (Konings *et al.*, 2018).

El esteroide DHEA es uno de los precursores androgénicos y estrogénicos principales en tejidos periféricos, debido a su elevada concentración tanto en sangre como en dichos tejidos. En el endometrio, debido a la expresión de las enzimas 3 β HSDs, este precursor inactivo se transforma en A4 y T, creando así un ambiente androgénico propio (Labrie *et al.*, 2017) (Figura 4). Los estrógenos también pueden transformarse y producirse en tejido endometrial a partir de la conversión de andrógenos (A4 y T) por la aromatasa (Gibson *et al.*, 2013) (Figura 4). Además, tanto los andrógenos como los estrógenos pueden producirse por la interconversión entre sus formas más activas (17 β -hidroxiesteroides, T y E1) y menos activas (ceto-esteroides, A4 y E1) mediante las enzimas 17 β HSDs: la tipo 1 cataliza la producción de T y E2 a partir de A4 y E1, respectivamente, mientras que la tipo 2 cataliza la conversión inversa (Gibson *et al.*, 2020) (Figura 4). Las formas 17 β -hidroxiesteroides son más activas debido a que poseen una mayor afinidad por los receptores que las formas ceto-esteroides. La actividad local de las enzimas 17 β HSDs determina la tasa de transformación de unas formas en otras y por tanto el balance estrogénico/androgénico en el microambiente endometrial (Konings *et al.*, 2018). Cabe destacar que, en endometrio, los sustratos empleados para estas conversiones varían en función de la fase del ciclo menstrual, dado que las enzimas expresadas en las células endometriales difieren entre fases (Hausknecht *et al.*, 1982; Mäentausta *et al.*, 1991; Gibson *et al.*, 2013).

La **intracrinología endometrial** es crucial para la generación de un microambiente endometrial adecuado que pueda soportar y nutrir al blastocisto implantado, llevando el embarazo a término. De hecho, se han asociado los niveles de P4 en el microambiente endometrial con su progresión a lo largo del ciclo menstrual y los desplazamientos de la ventana de implantación (Labarta *et al.*, 2021), siendo también los niveles de E1, E2 (concretamente el ratio E2:E1) y andrógenos en endometrio esenciales para el inicio y mantenimiento de la decidualización (Gibson *et al.*, 2013, 2016). Además, se han descrito alteraciones en el control intracrinológico y en los niveles de esteroides endometriales tanto en endometriosis como en cáncer endometrial (Gibson *et al.*, 2018, 2020; Konings *et al.*, 2018), recalcando de nuevo la idea de que una precisa regulación hormonal, tanto a nivel global como a nivel intracrino, es necesaria para el correcto funcionamiento endometrial.

Asimismo, numerosos estudios han reportado una falta de correlación entre los niveles de esteroides en sangre y endometrio (Huhtinen *et al.*, 2012, 2014; Labarta *et al.*, 2021). Concretamente, las concentraciones de estrógenos (E1 y E2) son hasta 5 veces mayores en tejido endometrial que en sangre durante la fase proliferativa y hasta 1.5 veces mayores en fase secretora, siendo por tanto sus concentraciones ciclo-dependientes (Huhtinen *et al.*, 2012, 2014). En cuanto a los andrógenos y precursores androgénicos, las concentraciones de DHEA también son mayores en tejido endometrial que en suero, al contrario de lo que ocurre para T y A4, cuyas concentraciones son menores en tejido endometrial y además no varían en respuesta a la fase del ciclo menstrual (Huhtinen *et al.*, 2014). Cuando hablamos de los progestágenos, los resultados no parecen tan claros; aunque en este mismo estudio Huhtinen y colaboradores reportaron no observar diferencias significativas en los niveles de P4 y P5 (y sus derivados 17-hidroxi) entre suero y endometrio (Huhtinen *et al.*, 2014), un estudio más reciente, llevado a cabo por Labarta y colaboradores en 2021, sí reportó diferencias, encontrándose una relación entre las concentraciones de P4 en el microambiente endometrial y su progresión, mientras que esta relación no aparecía con las concentraciones de P4 en suero (Labarta *et al.*, 2021).

El conjunto de estos hallazgos pone de manifiesto la necesidad de evaluar directamente los niveles de metabolitos esteroideos en el microambiente endometrial, aportando información directa de cómo podrían afectar a la fisiología endometrial y, por ende, a la implantación y el desarrollo embrionario.

4. El estrés como factor que afecta negativamente a la función endometrial

A lo largo de los años, diversos factores han sido evaluados por su efecto sobre la progresión y maduración endometrial, el proceso de implantación y los resultados reproductivos. En primer lugar, es conocido el papel clave que poseen unos adecuados niveles hormonales, tanto a nivel sistémico como la producción intracrina en el microambiente endometrial, sobre el control del ciclo menstrual y la implantación embrionaria. Ampliamente conocido es también el efecto de la estimulación ovárica sobre el transcriptoma endometrial, principalmente en la fase secretora media, pudiendo producir desplazamientos de la WOI que conlleven a fallos de implantación (Horcajadas *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2020b); así como los efectos negativos de las patologías endometriales sobre la función endometrial (Devesa-Peiro *et al.*, 2020). También se incluyen factores intrínsecos de la paciente como la edad o el índice de masa corporal (IMC), a pesar de que existen controversias en los resultados obtenidos con respecto a ambos. La edad afecta negativamente no sólo a nivel ovocitario sino también a nivel uterino

y endometrial, habiéndose evidenciado cambios en la expresión génica y en parámetros morfológicos y funcionales, que en conjunto conllevan una alteración de las tasas de éxito reproductivo (Devesa-Peiro *et al.*, 2022; Pathare *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023; Marti-Garcia *et al.*, 2024). En lo que respecta al IMC, se han observado desplazamientos de la ventana de implantación de hasta 1 día (Bellver *et al.*, 2021), alteraciones en los perfiles de expresión génica (Comstock *et al.*, 2017) y peores resultados reproductivos, con menores tasas de embarazo (Bellver *et al.*, 2007, 2010) y recién nacido vivo (Zheng *et al.*, 2024), en aquellas pacientes con elevados valores de IMC. Factores relacionados con el estilo de vida, como el consumo de alcohol y tabaco, también se han asociado con menores tasas de éxito en los tratamientos de reproducción asistida (TRA) (Soares *et al.*, 2007; Waylen *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2022). Finalmente, el estrés, un factor altamente presente en las mujeres que se enfrentan a la infertilidad (Bagade *et al.*, 2023) y a los TRA (Muñoz *et al.*, 2009), también ha sido relacionado con peores resultados reproductivos (Klonoff-Cohen *et al.*, 2001; Ebbesen *et al.*, 2009). Sin embargo, su efecto directo a nivel endometrial no ha sido todavía dilucidado.

4.1. Fisiología de la respuesta al estrés

El **estrés** podría definirse como un estado de homeostasis alterada que se desencadena cuando un individuo se expone de forma puntual, intermitente o prolongada a amenazas reales o percibidas como dañinas, tanto física como psicológicamente, que hacen que sea incapaz de adaptarse al ambiente que lo rodea. Ante este tipo de situaciones, los estímulos percibidos como amenazantes provocan la denominada **respuesta al estrés**, que implica un conjunto eficiente y altamente conservado de sistemas interrelacionados que tiene como objetivo mantener la integridad fisiológica del individuo incluso en las circunstancias más exigentes, recuperando así la homeostasis (Ising and Holsboer, 2006; Ulrich-Lai and Herman, 2009).

La respuesta más inmediata frente a una situación estresante viene dada por el sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático, que provoca alteraciones rápidas en los estados fisiológicos, como un aumento del ritmo cardíaco y de la presión sanguínea mediante la excitación del sistema cardiovascular. Seguidamente, se produce la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, que, en última instancia, provoca una elevación de los niveles de cortisol circulantes (aproximadamente en los 10-15 minutos posteriores). Más en detalle, cuando un individuo considera una situación como alarmante o estresante, el hipotálamo reacciona sintetizando la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual activa la liberación de ACTH por parte de la hipófisis. La ACTH viaja hasta la glándula adrenal

activándola, aumentando la síntesis de StAR y otras enzimas importantes en la ruta esteroidogénica, y promoviendo por tanto la producción pulsátil de glucocorticoides, especialmente cortisol, que serán liberados al torrente sanguíneo y repartidos por todo el organismo para activar el estado de alerta en otros sistemas, órganos o tejidos, y promover respuestas adaptativas que son beneficiosas y necesarias para el organismo, como la movilización de energía (**Figura 5**). La producción de glucocorticoides se encuentra auto-regulada a través de *feedback* negativo, lo cual, unido al proceso de degradación de los glucocorticoides liberados, provoca el retorno a los niveles basales de cortisol tras finalizar la exposición al estresor. De hecho, el éxito del afrontamiento del estrés radica en una regulación adecuada de la respuesta al estrés y una finalización eficaz de dicha regulación cuando el estímulo ha cesado o cuando el individuo se ha adaptado a la nueva situación (Ising and Holsboer, 2006; Ulrich-Lai and Herman, 2009; Herman *et al.*, 2016).

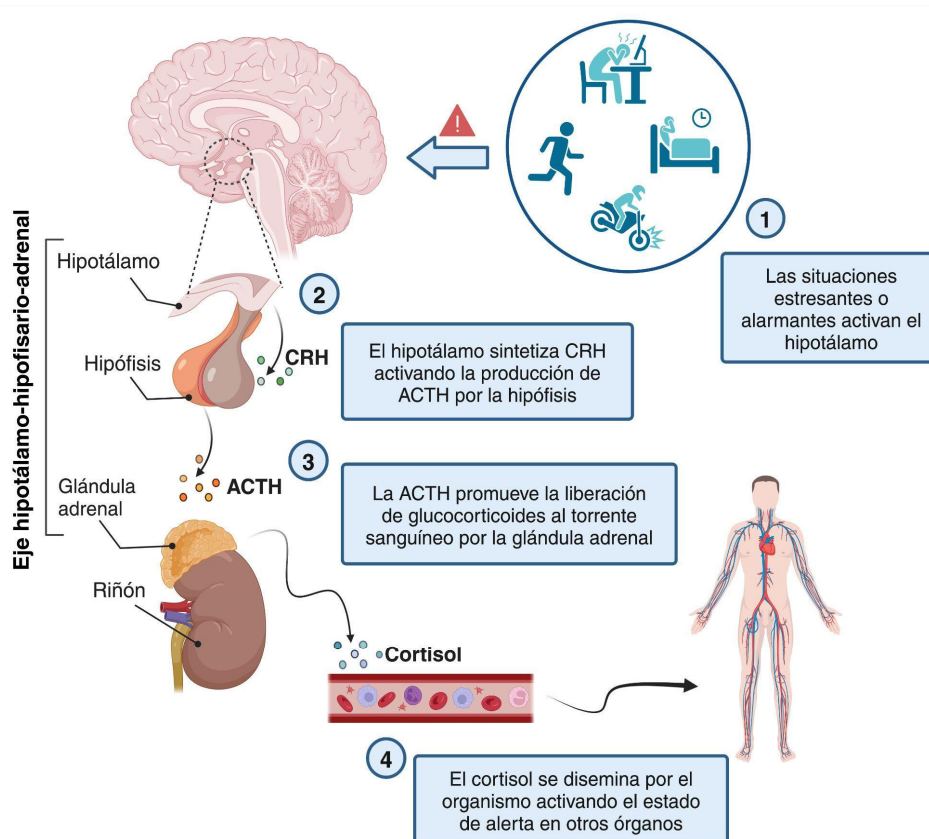


Figura 5. Fisiología de la respuesta al estrés. En la figura se esquematizan los pasos de la respuesta fisiológica al estrés que sigue a la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, y que finaliza con la liberación de glucocorticoides, principalmente cortisol, al torrente sanguíneo y su diseminación por el organismo. ACTH: hormona adrenocorticotropa; CRH: hormona liberadora de corticotropina. Figura creada con Biorender.com

Cabe destacar que el estrés es una variable compleja, multifactorial y subjetiva que varía entre individuos, de modo que una misma situación no resulta igual de estresante para todos. De hecho, las características propias tanto de los estresores como del individuo son las que

determinan la magnitud y la duración de la respuesta al estrés por parte del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. Factores que modifican esta respuesta podrían ser el sexo (marcado por las diferentes hormonas predominantes en mujeres (P4 y E2) y hombres (T), que son capaces de alterar el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, siendo mayor la variabilidad de la respuesta en mujeres que en hombres) o la edad (en la pubertad las respuestas son más acentuadas que en la adultez). Además, también es importante considerar el proceso de adaptación al estrés en respuesta a la exposición repetida a un mismo estresor, que va a depender tanto del individuo como de la severidad y duración del estímulo estresante. Tras esta adaptación, se observa una reducción en la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Herman, 2013; Herman *et al.*, 2016).

Mientras que el estrés a corto plazo es adaptativo y promueve la supervivencia del individuo, una activación prolongada del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal puede llegar a alterar gravemente la fisiología del individuo. Esta situación, caracterizada por un estado de angustia o sufrimiento que hace que una persona sea incapaz de adaptarse a una situación amenazante se define como **distrés emocional o estrés crónico**, y va acompañada de un trastorno psicológico que amenaza gravemente la homeostasis del individuo (Herman, 2013). Los **trastornos relacionados con el estrés**, son aquellas enfermedades cuya causa, inicio o desarrollo se encuentra sustancialmente influenciada por esta importante disrupción de la homeostasis individual (Ising and Holsboer, 2006). Dentro de estos trastornos, podemos encontrar desórdenes cardiovasculares, como hipertensión; trastornos psicológicos, como bipolaridad (Ising and Holsboer, 2006); o afecciones del sistema nervioso central, como alteraciones funcionales y estructurales en el hipocampo que puedan afectar a la memoria, la cognición y el aprendizaje, o incluso alteraciones en el número y la estructura de las neuronas (Yaribeygi *et al.*, 2017). También se ha demostrado que el estrés crónico y la depresión en pacientes oncológicos afecta al crecimiento y la propagación de los tumores (Moreno-Smith *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2020), lo cual está altamente ligado a los numerosos efectos que presenta el estrés sobre el sistema inmune (Yaribeygi *et al.*, 2017) y la inflamación (Vignjević Petrinović *et al.*, 2023). Dado que se ha reportado que los niveles de depresión y ansiedad en pacientes infértiles son similares a los de aquellas pacientes con otras condiciones, como cáncer o hipertensión (Domar *et al.*, 1993), es importante tener en cuenta los niveles de estrés en población infértil y su relación con la magnitud y el desarrollo de la infertilidad.

4.2. Estrés e infertilidad

La **infertilidad** es actualmente reconocida y definida por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico tras un año de relaciones sexuales regulares y sin protección, afectando a entre un 8 y un 12% de las parejas en edad reproductiva en todo el mundo (Vander Borgh and Wyns, 2018). Ésta puede ser categorizada como primaria cuando nunca se ha dado un embarazo, o secundaria cuando sí que se ha dado al menos un embarazo previo pero se es incapaz de lograr otro (Vander Borgh and Wyns, 2018). La infertilidad femenina se corresponde con entre un 20 y un 35% de los casos de infertilidad (Massimiani *et al.*, 2019).

La infertilidad impacta negativamente en la salud mental de las parejas que no logran concebir debido principalmente al desconocimiento de la causa de infertilidad, el deseo frustrado de ser padres, la presión social y el paso del tiempo (Muñoz *et al.*, 2009). Múltiples investigaciones han revelado una peor calidad de vida y una mayor incidencia de alteraciones de la salud mental (ansiedad, depresión, estrés) en mujeres infértiles en comparación con mujeres fértiles (Klemetti *et al.*, 2010; Masoumi *et al.*, 2016; Fallahzadeh *et al.*, 2019; Bagade *et al.*, 2023), siendo la prevalencia de dichas alteraciones en mujeres infértiles de en torno a un 40% (Chen *et al.*, 2004; Volgsten *et al.*, 2008; Sejbaek *et al.*, 2013; Salari *et al.*, 2024). La principal frustración viene dada por lo inesperado de la situación, dado que existe la creencia de que cualquier persona puede tener descendencia cuando lo desee, y que la infertilidad es algo que afecta a un porcentaje muy limitado de la población; esto último es consecuencia del silencio que rodea a las parejas infértiles, que en la mayoría de los casos no son capaces o no quieren comunicarlo de forma abierta (Llavona, 2008). Ciertamente, en un estudio reciente desarrollado por Nagórska y colaboradores, el 86% de los participantes sólo hablaban de su problema de infertilidad con su pareja, mientras que únicamente alrededor de un 30% se apoyaban en amigos o familia. Sorprendentemente, un 93,2% de los participantes no habían consultado nunca con un psicólogo, a pesar de que en esa población de estudio, el 95,2% presentaba niveles de estrés medio/alto (Nagórska *et al.*, 2021). Aunque la infertilidad afecta a ambos miembros de la pareja, es cierto que sus respuestas frente a la situación son diferentes, y, en cierta medida, para las mujeres la situación podría considerarse más estresante que para los hombres (Muñoz *et al.*, 2009; Nagórska *et al.*, 2021).

Además, los TRA son procedimientos estresantes tanto fisiológica como emocionalmente, estrés que se suma al ya inherente a la paciente por su condición de infertilidad. El enfrentarse a tratamientos totalmente nuevos y desconocidos, generándose nuevos miedos y preocupaciones relacionadas con los procedimientos médicos o los aspectos financieros, los tiempos de espera y la incertidumbre asociada, el temor al fracaso del tratamiento, y la

sucesión de pruebas de embarazo negativas y abortos, llevan al detrimento de la salud mental de la paciente y al desgaste de la pareja (Klonoff-Cohen and Natarajan, 2004; Muñoz *et al.*, 2009). De hecho, se ha evidenciado que entre un 25% y un 65% de los pacientes sometidos a TRA presenta síntomas clínicos de estrés, ansiedad y emociones negativas como desesperanza, baja autoestima y culpabilidad (Guerra, 2002; Nagórska *et al.*, 2021), habiendo calificado algunas pacientes la infertilidad y los tratamientos asociados como una de las experiencias más estresantes de sus vidas (Rockliff *et al.*, 2014). Además, diversos estudios han reportado que los niveles de estrés y ansiedad en pacientes son mayores una vez han comenzado el tratamiento que los niveles basales al acudir a la clínica (Boivin and Takefman, 1995; Klonoff-Cohen and Natarajan, 2004), estrés que va aumentando conforme se suceden los ciclos fallidos (Verhaak *et al.*, 2005, 2007). Dentro de los TRA, los momentos más estresantes para la paciente son el inicio del tratamiento, la punción ovárica, la transferencia embrionaria y la prueba de embarazo (Muñoz *et al.*, 2009).

Diversos estudios han demostrado que un aumento de los niveles de estrés, evaluado mediante cuestionarios psicológicos, se encuentra asociado con una reducción de las tasas de embarazo o aumento de las tasas de aborto (Klonoff-Cohen *et al.*, 2001; Smeenk *et al.*, 2001; Klonoff-Cohen and Natarajan, 2004; Ebbesen *et al.*, 2009; Matthiesen *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2017; Aimagambetova *et al.*, 2020). Asimismo, el estrés materno se ha asociado con complicaciones gestacionales y obstétricas, como bajo peso al nacer, parto prematuro y retraso del crecimiento intrauterino (Rondó *et al.*, 2003; Matsas *et al.*, 2023). Sin embargo, también hay estudios que no observan un aumento significativo del estrés en pacientes infértiles ni encuentran una relación con el éxito de los TRA (de Klerk *et al.*, 2008; Pasch *et al.*, 2012; Mirzaasgari *et al.*, 2023). Estas controversias en los resultados podrían ser debidas a la diversidad de cuestionarios psicológicos empleados para evaluar a las pacientes, el tamaño muestral, la diversidad de poblaciones, o a la tendencia de los individuos a subestimar y esconder los niveles de estrés reales (Rooney and Domar, 2018). Como bien apuntan Verhaak y colaboradores, no se puede afirmar que todas las mujeres infértiles o que están pasando por un tratamiento de fertilidad estén estresadas, pero sí que hay un número considerable de pacientes que desarrolla problemas emocionales relacionados con el estrés (Verhaak *et al.*, 2007). Esto va a depender tanto de las herramientas que posea cada individuo para lidiar con el problema como de la propia individualidad de la persona y de su capacidad para considerar una situación como estresante o no, lo que condicionará la magnitud y tipo de respuesta al estrés (Herman, 2013; Herman *et al.*, 2016).

A nivel fisiológico, el estrés prolongado y la producción continuada de glucocorticoides afectan a la adecuada regulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal a diversos niveles, pudiendo por tanto afectar a otras funciones directamente reguladas por este eje, como es la adecuada

progresión del ciclo menstrual y la producción hormonal (a través de la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal) (Li *et al.*, 2010), que, en última instancia, afectarían a la implantación y la consecución de un embarazo a término. Estudios en modelos animales ya evidenciaron una inhibición de la secreción de GnRH y FSH, y cambios en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de LH, dificultando la maduración de los folículos y afectando a la ovulación (Phogat *et al.*, 1999; Dobson and Smith, 2000). Estudios en pacientes de reproducción asistida también han evidenciado un menor recuento de ovocitos tras punción en mujeres estresadas (Gürhan *et al.*, 2009). Diversos estudios han reportado la expresión del receptor de glucocorticoides en el ovario, donde el cortisol regula directamente la síntesis de hormonas esteroideas (Whirledge and Cidlowski, 2013), destacando también la expresión de las enzimas 11 β HSDs, que regulan la actividad de los glucocorticoides localmente, y que, en global, mantienen el equilibrio entre aquellas concentraciones que activan funciones que promueven el embarazo (como la promoción del crecimiento y la invasión del trofoblasto), y altas concentraciones que pueden comprometer el embarazo (activación de la apoptosis y la respuesta inmune) (Michael and Papageorgiou, 2008). Pero además, también actúa alterando los niveles circulantes de otras hormonas esteroideas como la P4 (Herrera *et al.*, 2016). En resumen, el estrés continuado como consecuencia de la infertilidad y de los TRA, sumado al estrés de situaciones de la vida cotidiana, podría reducir las probabilidades de lograr un embarazo a término mediante alteraciones en los niveles hormonales, así como de funciones clave para la implantación embrionaria.

4.3. Evaluación psicológica y fisiológica del estrés: situación actual

A pesar de que se han publicado diversas guías de actuación a lo largo de los años por parte de las principales sociedades de medicina reproductiva [ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*), SEF (Sociedad Española de Fertilidad)] (Moreno *et al.*, 2007; Gameiro *et al.*, 2015), todavía existe una falta de estandarización a la hora de evaluar y tratar psicológicamente a las pacientes que inician un TRA, así como una falta de consenso sobre cuál es el seguimiento y apoyo que se debería realizar a lo largo del tratamiento para reducir abandonos y paliar el sufrimiento asociado a la acumulación de ciclos fallidos. Desde hace más de 30 años se han desarrollado y aplicado diversos programas de intervención psicológica para mujeres infértiles, lográndose mejoras en diversos parámetros de evaluación psicológica (Domar *et al.*, 1990; Galhardo *et al.*, 2013; Sahraian *et al.*, 2024) y, en algunos estudios, mejoras en los resultados de los tratamientos (Dolz and Garcia, 2002; Domar *et al.*,

2011; Clifton *et al.*, 2020), aunque la heterogeneidad de todos ellos, que emplean programas muy diversos, hace difícil su comparación (Kremer *et al.*, 2023).

Un estudio desarrollado por Pasch y colaboradores demostró cómo, a pesar de que más de la mitad de las pacientes sufrían de estrés y ansiedad, sólo alrededor de un 20%-25% había recibido apoyo psicológico o información de la posibilidad de recibirlo. Además, estos tratamientos no se habían dirigido específicamente a aquellas pacientes con mayor incidencia de problemas psicológicos, sino que se había hecho de forma homogénea para todas ellas (Pasch *et al.*, 2016). Estos resultados ponen de manifiesto la falta real de apoyo psicológico a las pacientes y, principalmente, la falta de foco en las pacientes que realmente lo necesitan. No se debería confiar en que las pacientes van a ser las que pidan la ayuda psicológica puesto que un elevado porcentaje de las parejas infértiles no se apoyan en familiares y amigos, y mucho menos en profesionales (Nagórska *et al.*, 2021). Se debería optar por un enfoque activo por parte de los profesionales, detectando qué pacientes son las que necesitan ayuda. De hecho, Gameiro y colaboradores, en 2013, ya reivindicaban que la optimización de los tratamientos y la transición hacia una medicina personalizada pasaría por la implementación de un cribado para seleccionar a aquellas pacientes con distrés psicológico, una recomendación de tratamiento personalizado según las necesidades de cada una de ellas, y la implementación de un flujo de trabajo en la práctica clínica habitual en el que en momentos estresantes concretos del tratamiento se proporcionase un mayor apoyo psicológico (Gameiro *et al.*, 2013). Estudios más recientes muestran cómo las pacientes siguen demandando la implementación de tratamiento psicosocial en las clínicas de reproducción asistida, principalmente enfocado a aquellas con síntomas de estrés o a aquellas con tratamientos previos fallidos (Sousa-Leite *et al.*, 2022; Sousa-Leite *et al.*, 2023), evidenciando que los tratamientos centrados en la salud mental de las pacientes continúan siendo a día de hoy un tema pendiente.

La caracterización y selección de las pacientes que se beneficiarían de estos tratamientos podría abordarse tanto desde la evaluación psicológica como por medio de la determinación de los desequilibrios fisiológicos que ocurren como consecuencia de una alteración psicológica, mediante la detección de biomarcadores moleculares específicos.

En el plano de la **evaluación psicológica** en el ámbito de la medicina reproductiva, se podría considerar la aplicación de dos tipos de cuestionarios de evaluación. Por un lado, se han desarrollado cuestionarios que evalúan el impacto de la infertilidad y los tratamientos en el bienestar de la paciente (**Tabla 1**). Éstos, han sido específicamente desarrollados en y para pacientes de medicina reproductiva, pero no evalúan otras dimensiones de su vida personal y profesional, sino que se centran únicamente en los tratamientos y la infertilidad. Por otro

lado, encontramos cuestionarios psicológicos más genéricos, ampliamente validados y empleados en psicología, que permiten evaluar el impacto de todos los aspectos de la vida de la paciente sobre su salud mental, y que, si bien han sido empleados en diversos estudios para evaluar a pacientes de reproducción asistida (Smeenck *et al.*, 2001; Pasch *et al.*, 2012; Aimagambetova *et al.*, 2020), no son específicos de esta población (**Tabla 1**).

Tabla 1. Cuestionarios psicológicos aplicables en la evaluación en medicina reproductiva.

Tipo cuestionario	Nombre	Contenido/aplicación	Referencia
Específico	SCREENFIV	Identificar a pacientes en riesgo de sufrir estrés durante el desarrollo del tratamiento	(Verhaak <i>et al.</i> , 2010)
Específico	The Fertility Quality of Life (FertiQoL) tool	Evaluar el impacto de la infertilidad y su tratamiento en la calidad de vida de las pacientes	(Boivin <i>et al.</i> , 2011)
Específico	The Fertility Problem Inventory	Evaluar el estrés específico de la infertilidad y los tratamientos	(Newton <i>et al.</i> , 1999)
Genérico	Inventario de Depresión de Beck	Detectar y evaluar la presencia y gravedad de la depresión	(Beck and Beamesderfer, 1974)
Genérico	Escala CES-D	Detectar la presencia de síntomas depresivos y su frecuencia	(Radloff, 1977)
Genérico	Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo	Evaluar el estrés y la ansiedad como estado (momentáneo) y como rasgo (a largo plazo)	(Spielberger <i>et al.</i> , 1983)

La tabla incluye información acerca del tipo de cuestionario (si es específico para la evaluación del impacto de la infertilidad y los tratamientos en pacientes de reproducción asistida o por el contrario es genérico, evaluando diferentes aspectos de la vida de las pacientes, pero que ha sido empleado en este tipo de población), nombre del cuestionario, y qué evalúa o qué aplicación tiene, así como la referencia a la publicación asociada.

En lo que concierne a los **biomarcadores de estrés**, las investigaciones realizadas y los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Investigaciones realizadas en biomarcadores de estrés.

Biomarcador	Muestra biológica	Resultado	Referencia
Cortisol	Orina	Mayor incidencia de abortos entre aquellas mujeres con mayores niveles de cortisol	(Nepomnaschy <i>et al.</i> , 2006)
Cortisol	Suero	Menores niveles de cortisol en mujeres con tratamientos exitosos	(An <i>et al.</i> , 2013)

Biomarcador	Muestra biológica	Resultado	Referencia
Cortisol	Pelo	Las concentraciones de cortisol en pelo predicen de forma significativa el embarazo clínico	(Massey <i>et al.</i> , 2016)
Cortisol	Saliva	Las concentraciones de cortisol en saliva no predicen el embarazo clínico	(Massey <i>et al.</i> , 2016)
Cortisol	Saliva	No se encuentra una relación entre el cortisol y la fecundidad	(Lynch <i>et al.</i> , 2014)
Cortisol	Saliva	Los niveles de cortisol no están asociados con los resultados reproductivos	(Cesta <i>et al.</i> , 2018)
Cortisol	Suero y endometrio	No se observan diferencias en los niveles de cortisol entre mujeres embarazadas y no embarazadas	(Stevens Brentjens <i>et al.</i> , 2023)
Alfa-amilasa	Saliva	Las mujeres con mayores concentraciones de alfa-amilasa presentan una reducción del 29% en la fecundidad	(Lynch <i>et al.</i> , 2014)
Alfa-amilasa	Saliva	Las concentraciones de alfa-amilasa están negativamente asociadas con la fecundidad en el primer ciclo	(Louis <i>et al.</i> , 2011)
Adrenalina	Orina	Las mujeres con tratamientos exitosos presentan menores concentraciones de adrenalina que aquellas que no logran un embarazo	(Smeenk <i>et al.</i> , 2005)

La tabla incluye información acerca del metabolito evaluado, muestra biológica en la que se evalúa, resultado de la investigación y si el estudio evidencia una relación entre los niveles del biomarcador y los resultados reproductivos o no, así como la referencia a la publicación asociada.

Como se puede observar en la **Tabla 2**, los investigadores han centrado sus esfuerzos en hallar biomarcadores en otras fuentes biológicas, pero no en endometrio. Dada la ya descrita falta de correlación entre niveles de esteroides entre suero y endometrio (Huhtinen *et al.*, 2012, 2014; Labarta *et al.*, 2021), y conociendo la existencia de una producción hormonal intracrinológica (Konings *et al.*, 2018), se requiere de estudios que evalúen los niveles hormonales directamente en este tejido, obteniendo así información directa de cómo el estrés induce alteraciones en el microambiente endometrial, y cómo éstas se relacionan con el potencial implantatorio endometrial en diferentes escenarios. Además, sería interesante realizar un estudio de forma holística, ya que los estudios desarrollados se centran en unas pocas moléculas, pero es realmente la interacción entre todas ellas, dado que están producidas dentro de la misma ruta metabólica, lo que le da sentido completo al

microambiente endometrial. Asimismo, sería también necesario determinar qué metodología de evaluación psicológica refleja mejor los cambios fisiológicos para establecer biomarcadores no invasivos asociados al pronóstico reproductivo.

5. Tecnologías de alto rendimiento y medicina de precisión

En las últimas décadas, el desarrollo de las tecnologías de alto rendimiento (*high-throughput technologies*) ha dado un giro a la forma de estudiar los procesos biológicos, pasando de la evaluación de moléculas aisladas al estudio de la totalidad de genes, transcritos, proteínas y metabolitos de un sistema biológico, disciplinas conocidas como genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, respectivamente. Estas disciplinas estudian un sistema biológico complejo desde un punto de vista holístico, ayudándonos a comprender cómo los cambios que se producen a nivel genético se pueden ver reflejados a nivel funcional, permitiendo así descifrar el fenotipo de una enfermedad o de un escenario fisiológico concreto (Fanos, 2016). El uso de las ómicas es esencial para la medicina personalizada o de precisión (Mirnezami *et al.*, 2012), también llamada medicina estratificada, la cual tiene en cuenta las variaciones individuales en la genómica, el perfil bioquímico, el ambiente y el estilo de vida para la toma de decisiones en cuanto al tratamiento y la prevención de una enfermedad, desarrollando nuevas taxonomías y estratificando a los pacientes en función de sus características diferenciales para aplicar el mejor tratamiento para cada uno de ellos (Jacob *et al.*, 2019) (**Figura 6**). El análisis e integración de toda la información de un sistema biológico generada con las ciencias ómicas, gracias al uso de herramientas bioinformáticas, ha dado el impulso a lo que se conoce como “La Era del Big Data” (Yu and Zeng, 2018).

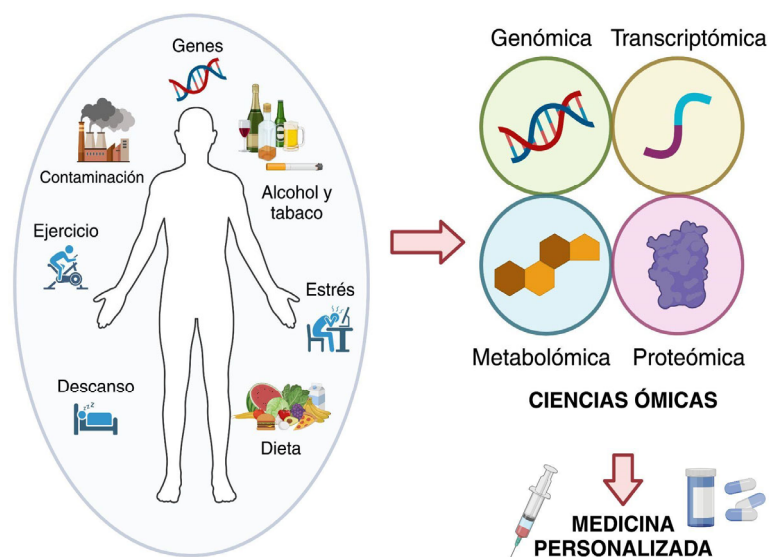


Figura 6. Ciencias ómicas, biología de sistemas y medicina personalizada. Las ciencias ómicas permiten el estudio global del organismo a diferentes niveles: DNA (genómica), RNA (transcriptómica), metabolitos (metabolómica) y proteínas (proteómica). El estudio global del organismo, teniendo en cuenta los diferentes factores que pueden dar lugar a variaciones en el mismo, permiten la individualización de los tratamientos, lo que se conoce como medicina personalizada. Figura creada con Biorender.com

El análisis mediante el uso de tecnologías de alto rendimiento puede realizarse siguiendo dos enfoques: no dirigido y dirigido. El primero de ellos no está limitado a ninguna molécula concreta y se centra en el perfilado completo de un tejido o condición específica; por tanto, es un enfoque útil para generar hipótesis y descubrir biomarcadores. Por el contrario, el análisis dirigido, como bien indica su nombre, está dirigido a un grupo concreto de moléculas previamente identificadas y se centra más en el análisis cuantitativo. Cabe destacar que esta última aproximación, debido a que trabaja con una menor cantidad de datos, requiere de un menor ajuste del p-valor, logrando así una mayor potencia estadística con una menor cantidad de muestras (Agrawala and Rana, 2021; Jin and Ma, 2021).

5.1. Espectrometría de masas para la definición de biomarcadores: análisis del perfil esteroideo

Diferentes metodologías para la identificación de biomarcadores metabólicos han sido desarrolladas e implementadas a lo largo de los años con numerosas aplicaciones, siendo una de los principales la detección temprana de enfermedades (cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas o autoinmunes) y el desarrollo de nuevos tratamientos, sin olvidarnos de otras como toxicología, medicina forense, nutrición y deporte, y control de calidad (Jin and Ma, 2021; Szeremeta *et al.*, 2021; Khoramipour *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2022; Lista *et al.*, 2023; Suri *et al.*, 2023). Entre las técnicas más empleadas encontramos la

resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS), entre otras.

La **espectrometría de masas** es una técnica analítica ampliamente utilizada en investigación biomédica y en el análisis clínico, gracias a su capacidad para detectar y cuantificar moléculas con gran precisión y sensibilidad. El proceso analítico basado en espectrometría de masas generalmente consta de cuatro etapas principales (**Figura 7A**) (Jacob *et al.*, 2019; Agrawala and Rana, 2021; Ratnasekhar, 2024): (1) **tratamiento de la muestra**, la cual consta de dos etapas: inactivación de la actividad metabólica celular (mediante el uso, entre otros, de la congelación a -80°C) hasta el día de la determinación y extracción de los metabolitos de la muestra, para lo cual existen diferentes técnicas según la naturaleza del compuesto y la matriz biológica; (2) **separación cromatográfica de compuestos**, para la que se pueden emplear la cromatografía de gases y la líquida. Mientras que la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) constituye la técnica de elección para el análisis de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular (cetonas, aldehídos, alcoholes), la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) constituye la técnica de elección para la determinación de compuestos menos volátiles. Una vez separados cromatográficamente, los compuestos se transfieren al espectrómetro de masas, formado, principalmente, por una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector (**Figura 7B**); (3) **ionización**, proceso que convierte las moléculas separadas en especies cargadas positiva o negativamente, lo que permitirá posteriormente poder separarlas en base a su relación masa/carga; (4) **separación de las moléculas ionizadas por el analizador y detección en base a su relación masa/carga**, generando un espectro de alta resolución. Existen diferentes tipos de analizadores de masas que pueden combinarse formando un **tándem (MS/MS)**. Posteriormente se realiza un análisis de datos para identificar los compuestos y su concentración, pasando siempre por un pre-procesado para corregir y maximizar los resultados.

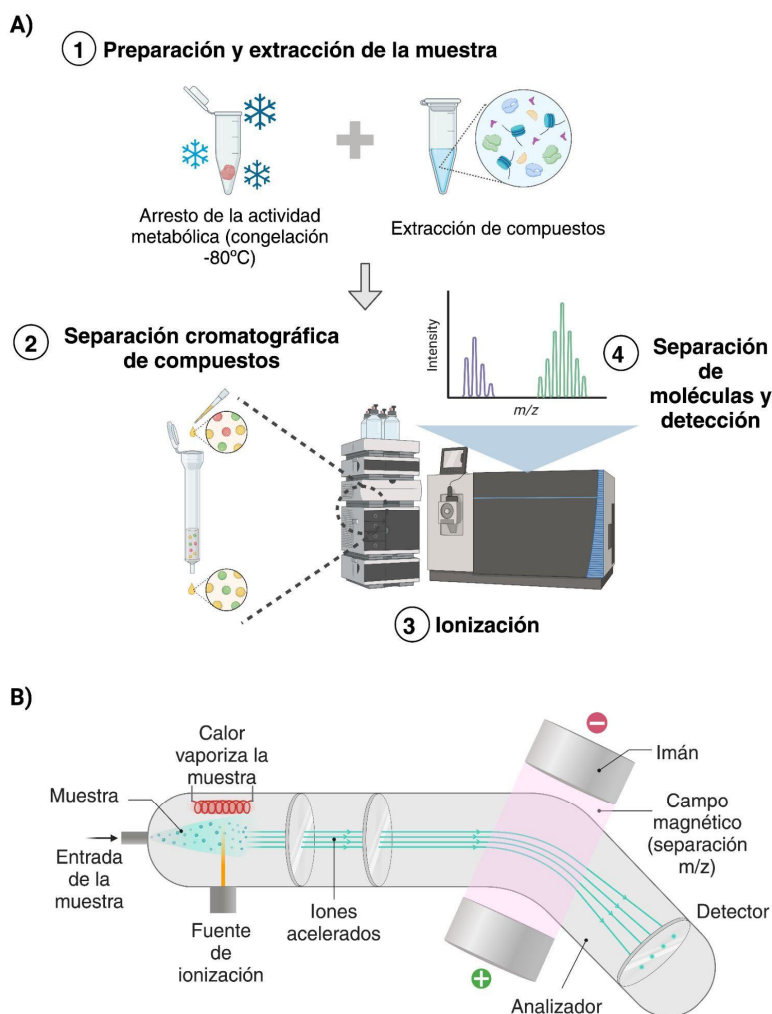


Figura 7. Espectrometría de masas. A) Flujo de trabajo en espectrometría de masas, formado por cuatro pasos principales: (1) preparación y extracción de la muestra, (2) separación cromatográfica de compuestos (en la imagen se representa un espectrómetro de masas unido a cromatografía líquida), (3) ionización y (4) separación de los compuestos en base a su relación masa/carga (m/z). B) Esquema de un espectrómetro de masas con sus tres componentes principales: fuente de ionización, analizador y detector. La muestra, una vez separada cromatográficamente, se introduce en el espectrómetro donde se ioniza gracias a la fuente de ionización. Los compuestos ionizados son sometidos a un campo magnético donde se separan en base a su relación m/z (analizador), para ser detectados finalmente en el detector. Figura creada con Biorender.com

La espectrometría de masas se ha empleado en los últimos años para el perfilado general del metaboloma esteroideo en diversos tejidos, como pelo (Gomez-Gomez and Pozo, 2020) y uñas (Voegel *et al.*, 2018), pero también en diferentes ámbitos de la medicina. Por ejemplo, para el diagnóstico de cáncer adrenocortical, se han evaluado esteroides en muestras de orina (Hines *et al.*, 2017) y suero (Fanelli and Di Dalmazi, 2019). También se ha evaluado el riesgo de recaída de cáncer endometrial tras cirugía (Audet-Delage *et al.*, 2018), así como para el diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico en muestras de suero (Handelsman *et al.*, 2017). Sólo unos pocos estudios han evaluado los esteroides en tejido endometrial (Huhtinen *et al.*, 2014; Labarta *et al.*, 2021; Stevens Brentjens *et al.*, 2023), siendo

inexistentes los que tratan de emplear esta metodología para definir biomarcadores asociados a estrés y pronóstico reproductivo de las pacientes de reproducción asistida.

5.2. Transcriptómica para el estudio del factor endometrial

El **análisis transcriptómico** es el estudio de los cambios en la expresión génica bajo determinadas condiciones fisiológicas o fisiopatológicas a través del análisis del transcriptoma (Velculescu *et al.*, 1997). El término **transcriptoma** fue acuñado por Charles Auffray en 1996 para referirse al conjunto total de especies de RNA que se transcriben en un determinado tipo celular, tejido u órgano, en un momento y bajo unas condiciones concretas (Velculescu *et al.*, 1997).

Las dos principales tecnologías de alto rendimiento utilizadas para estudiar el transcriptoma completo son los *microarrays* (también conocidos como chips de DNA) (Lockhart *et al.*, 1996) y las tecnologías de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), como la secuenciación de RNA (RNA-Sequencing, RNA-Seq) (Wang *et al.*, 2009), que permiten la secuenciación masiva, paralela y automatizada de millones de fragmentos en una sola tanda (Manzoni *et al.*, 2018).

La **secuenciación de RNA (RNA-seq)** permite determinar el orden de los nucleótidos de un fragmento de cDNA (DNA complementario) (Wang *et al.*, 2009), destacando frente a los *microarrays* por sus múltiples ventajas: presenta resolución a nivel de base, pudiendo detectar cambios en un sólo nucleótido (SNPs), isoformas y variantes alélicas; amplio rango de detección, lo que permite poder analizar genes con muy poca o con mucha expresión que no son detectables por otras técnicas, lo que también viene fomentado por el bajo ruido de fondo; lecturas cortas, lo que permite obtener información precisa; altos niveles de reproducibilidad; menor cantidad de RNA inicial necesaria; o que no es necesario disponer de un genoma de referencia, y, por lo tanto, se puede emplear para secuenciar *de novo* el genoma de especies sin secuenciar (San Segundo-Val and Sanz-Lozano, 2016). A pesar de sus múltiples ventajas, las cuales la convierten en una técnica de referencia y ampliamente utilizada, esta metodología también presenta algunas desventajas como el alto costo y la alta complejidad de datos generados, haciendo que su interpretación sea compleja (San Segundo-Val and Sanz-Lozano, 2016). Actualmente, hay disponibles diversas plataformas de referencia en RNA-seq, siendo Illumina® una de las más empleadas.

Los protocolos de secuenciación de Illumina® presentan una serie de pasos principales (Stark *et al.*, 2019) (**Figura 8**): (1) **Extracción del RNA**. El tipo de RNA a extraer (RNA total o algún tipo de RNA concreto) así como la cantidad inicial de RNA a emplear dependerá del protocolo

que se esté siguiendo; (2) **Transcripción reversa**. El RNA extraído se convierte a cDNA mediante la acción de la transcriptasa reversa; (3) **Unión de adaptadores**. Los adaptadores son secuencias que se unen a los extremos 3' y 5' de los fragmentos de cDNA y cuya función dependerá del protocolo aplicado; (4) **Amplificación** de los fragmentos de cDNA unidos a los adaptadores por PCR; (5) **Selección por tamaño** de los amplicones (150-200pb); (6) **Secuenciación**. Una vez generada la librería, ésta es introducida en el secuenciador para su secuenciación. Concretamente, los sistemas de Illumina® emplean secuenciación por síntesis.

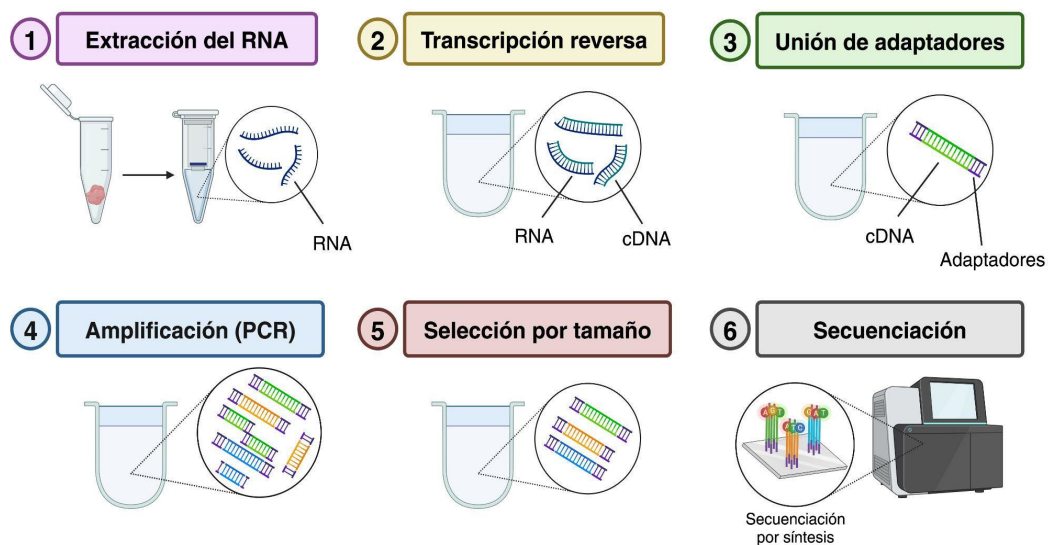


Figura 8. Principales pasos en los protocolos de RNA-Seq de Illumina®. Los protocolos comienzan con la extracción del RNA de la muestra biológica de elección (1), seguidos por la síntesis del DNA complementario (2), la unión de adaptadores a los extremos 3' y 5' de los fragmentos de cDNA (3), la amplificación de estos productos (4) y su selección por tamaño (5). Finalmente, la librería se introduce en el secuenciador para su secuenciación (6), en el caso de los protocolos de Illumina®, secuenciación por síntesis. Figura creada con Biorender.com

Una vez que el proceso de secuenciación ha finalizado, los datos generados deben ser preprocesados y posteriormente analizados mediante el empleo de herramientas bioinformáticas. La **bioinformática** es una disciplina científica que combina principalmente conocimientos computacionales, estadísticos y biológicos para llevar a cabo análisis *in silico* de datos masivos generados por las tecnologías de alto rendimiento (Yu and Zeng, 2018).

Los tres pasos principales en un análisis bioinformático consisten en (**Figura 9**): (1) **preprocesado y análisis exploratorio**: los datos son extraídos y normalizados, y los posibles *outliers* y efectos de tanda se identifican mediante el análisis de componentes principales (*principal component analysis*, PCA), el cual identifica las características que producen mayores variaciones en la expresión génica entre muestras (Jolliffe and Cadima, 2016) y permite su eliminación aplicando modelos lineales; (2) **Obtención de los genes de interés**:

el análisis de expresión diferencial (*differential expression analysis*, DEA) identifica genes cuya expresión se encuentra significativamente alterada entre condiciones y el análisis tiempo/dosis identifica genes cuyo patrón de expresión cambia de manera coordinada en determinados tiempos o bajo determinadas condiciones de tratamiento (Conesa *et al.*, 2006; Nueda *et al.*, 2014); (3) **Análisis funcional**: consiste en la identificación de los procesos moleculares y funciones biológicas que se encuentran significativamente alterados por los cambios en la expresión génica. Dentro del análisis funcional, podemos diferenciar entre el análisis de sobre-representación (*over-representation analysis*, ORA) y el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (*gene set enrichment analysis*, GSEA) (Dugourd and Saez-Rodriguez, 2019). Mientras que el ORA evalúa si una función biológica relacionada con un conjunto de genes es más prevalente que lo esperado por azar, el GSEA utiliza los niveles de expresión para identificar si un conjunto de genes involucrados en una función biológica determinada se encuentra sobre o infra regulado entre condiciones (Subramanian *et al.*, 2005; Dugourd and Saez-Rodriguez, 2019). Ambas metodologías hacen uso de bases de datos biológicas como Gene Ontology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa, 2000) para establecer la relación gen-función.

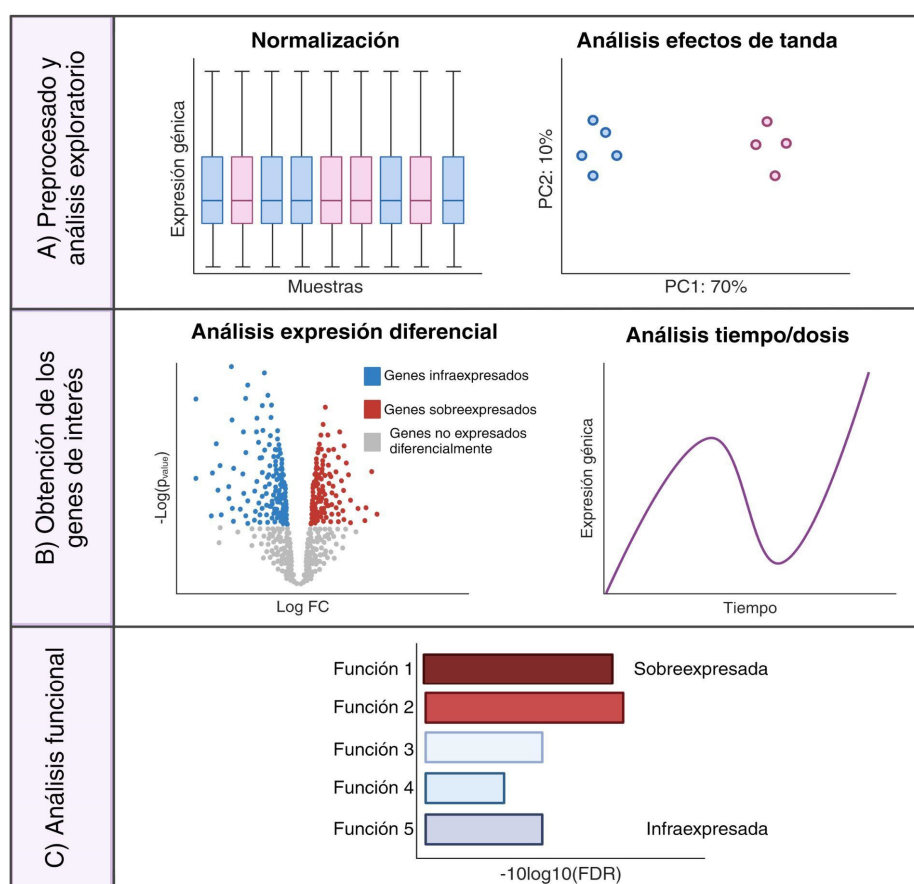


Figura 9. Aproximaciones bioinformáticas para el análisis de datos transcriptómicos. El análisis de los datos generados tras la aplicación de un protocolo de secuenciación del RNA consta de tres pasos principales: **A) Preprocesado y análisis exploratorio**, donde los datos son normalizados y corregidos; **B)**

Obtención de genes de interés, el cual conlleva análisis de expresión diferencial, en el que se analizan los genes diferencialmente expresados entre las condiciones de estudio, o análisis tiempo/dosis, el cual mide los cambios en la expresión génica a determinados tiempos y C) Análisis funcional, que analiza las funciones en las que están implicados los genes diferencialmente expresados entre las condiciones de estudio. Figura creada con Biorender.com.

5.3. Estrategias en investigación: Ciencia de día y ciencia de noche

El método científico tradicional, lo que se conoce como ciencia de día, está basado en la generación de una posible respuesta a partir de una pregunta de investigación (hipótesis), diseñándose experimentos para testar esa respuesta y, en función de los resultados, aceptando o rechazando dicha hipótesis si los resultados concuerdan con ella o la contradicen, respectivamente. Esta aproximación sigue una estructura deductiva, en la que tanto el diseño de los experimentos como su desarrollo están condicionados y dirigidos a la comprobación de una hipótesis dada (**Figura 10 izquierda**) (Yanai and Lercher, 2019). Sin embargo, las tecnologías de alto rendimiento, asociadas a la generación de una gran cantidad de datos, han abierto el abanico de posibilidades en su análisis, generando nuevas estrategias de investigación. La ciencia de noche se mueve entre un abanico de posibilidades, sin cerrarse a una hipótesis concreta, dejando que los propios datos generen nuevas hipótesis siguiendo una estructura inductiva (**Figura 10 derecha**) (Yanai and Lercher, 2019).

El principal problema de la ciencia de día radica en que, cuando nos focalizamos en una hipótesis concreta y centramos todos nuestros esfuerzos en diseñar experimentos que nos permitan validar esa idea, que nos refuercen que vamos por el camino correcto, nos estamos cerrando a la generación de nuevas hipótesis, limitando nuestra capacidad de creación. En la ciencia de noche, sin embargo, debemos tener una mentalidad de exploración, de hacer todas las comparaciones y análisis posibles con los datos, de darse de bruces contra callejones sin salida hasta encontrar un camino por el que seguir (Yanai and Lercher, 2020, 2021). Mientras que en la ciencia de día las ideas se comprueban, en la ciencia de noche se generan. Mientras que en la ciencia de noche se buscan correlaciones, en la ciencia de día se corrobora la causalidad. Ambas son complementarias, con sus fortalezas y sus limitaciones. Y, a pesar de que muchas de las ideas generadas en la ciencia de noche se acaben desechando y ni siquiera se prueben, este enfoque nos permite salirnos de la estructura, de lo fijo, de lo protocolario, y nos proporciona la libertad de crear, convirtiendo la ciencia en un arte en el que cualquier idea tiene cabida.

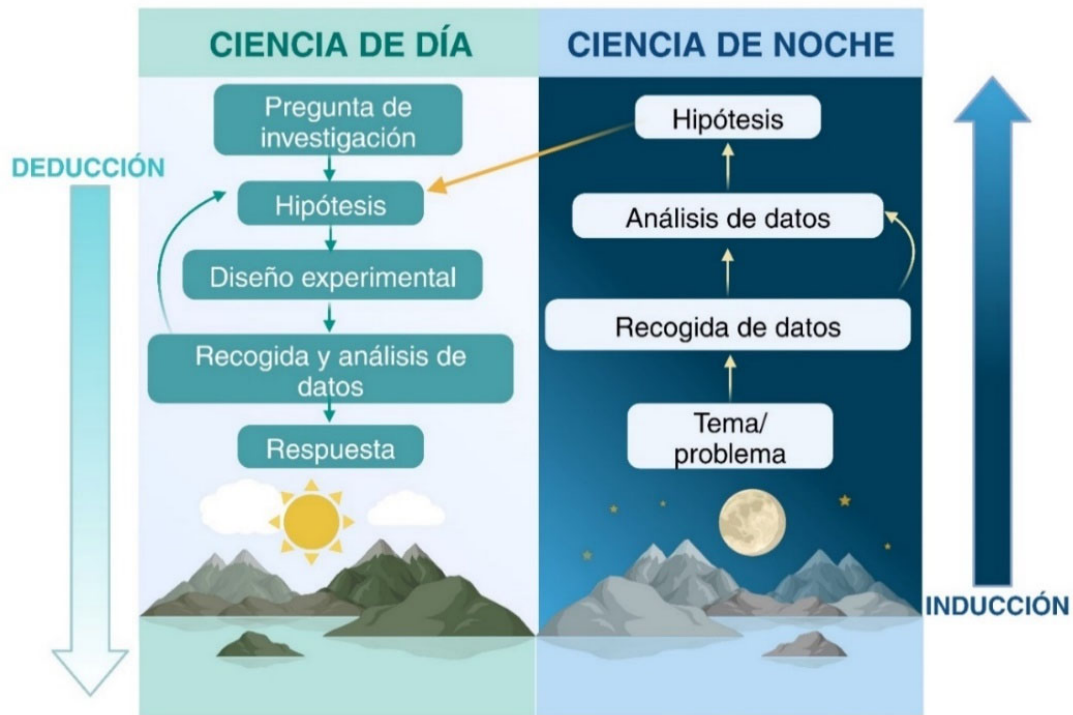


Figura 10. Estrategias de investigación: Ciencia de día vs ciencia de noche. Esquema de las dos estrategias de investigación principales. Mientras que la ciencia de día sigue un enfoque deductivo, con la generación de una hipótesis en base a una pregunta de investigación y centra sus análisis en la confirmación o el rechazo de dicha hipótesis, la ciencia de noche, con un enfoque inductivo, no se cierra a una hipótesis concreta, si no que contempla y analiza los datos en global para obtener diferentes vías o hipótesis que estudiar, generando así nuevo conocimiento. Figura adaptada de: (Devesa-Peiro, 2021).



HIPÓTESIS



HIPÓTESIS

Las investigaciones actuales muestran cómo el estrés psicológico es capaz de alterar la fisiología del individuo, habiéndose relacionado negativamente con la aparición y progresión de diversas enfermedades. Los niveles de hormonas esteroideas, así como un adecuado funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, son esenciales para la función reproductiva. Dada la naturaleza de la respuesta al estrés y su implicación directa con el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y la ruta de síntesis de hormonas esteroideas, la **hipótesis principal** de esta tesis es que el estrés podría estar alterando el estado molecular y comprometiendo la función endometrial afectando negativamente al éxito reproductivo.

La presente tesis doctoral, mediante el empleo de diversas aproximaciones [psicológica y molecular (metabolitos y transcriptoma)] propone una metodología que refleja los cambios fisiológicos a nivel endometrial causados por el estrés, permitiendo la identificación prematura de aquellas pacientes estresadas o con tendencia a estarlo para poder personalizar el tratamiento, avanzando hacia una medicina de precisión y mejorando el pronóstico reproductivo de estas pacientes.





OBJETIVOS



OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es caracterizar el efecto del estrés en la función endometrial a nivel molecular y psicológico, así como las consecuencias en el éxito reproductivo, en una población de pacientes infértiles.

De acuerdo con esto, los **objetivos específicos** son:

1. Definir qué biomarcadores de estrés (niveles hormonales endometriales o evaluación psicológica) se asocian con los resultados reproductivos.
2. Establecer un método no invasivo que refleje los cambios fisiológicos endometriales en respuesta al estrés mediante la correlación entre los resultados de la caracterización molecular y psicológica.
3. Identificar los mecanismos moleculares por los cuales el estrés afecta a la fisiología reproductiva.





MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

El reclutamiento de las participantes para este estudio prospectivo observacional se llevó a cabo entre los años 2018 y 2023 en la clínica IVIRMA Valencia (Valencia, España) trabajando de forma coordinada con su Departamento de expertos en medicina reproductiva, con su Departamento de psicología y con su Fundación de Investigación (Fundación IVI, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España).

En este estudio se reclutaron tres poblaciones diferentes con el objetivo de encontrar respuesta a diferentes preguntas de investigación (**Figura 11**).

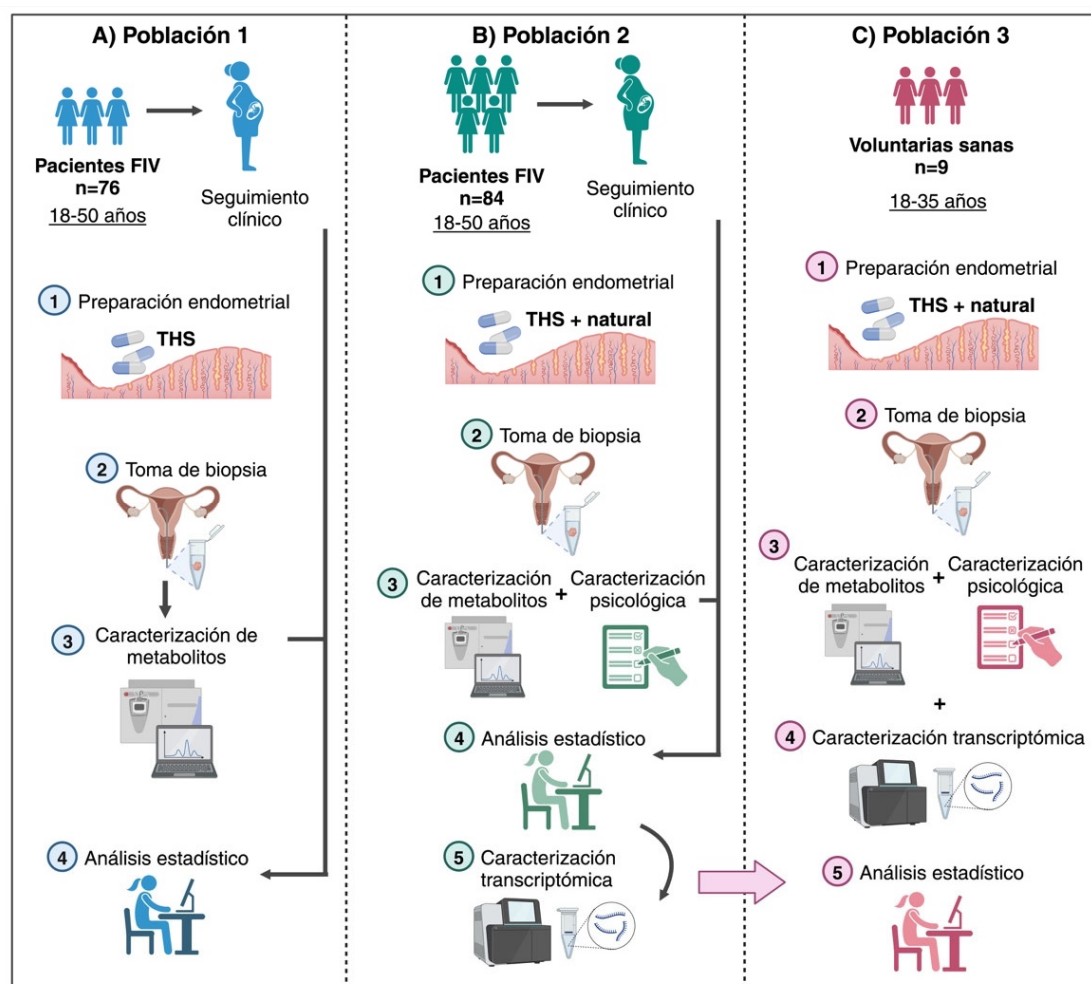


Figura 11. Diseño del estudio. En este estudio prospectivo observacional se reclutaron 3 poblaciones diferentes: **A) Población 1**, pacientes FIV a las cuales se les realizó una toma de biopsia endometrial empleada para caracterizarlas molecularmente y cuyos resultados se analizaron estadísticamente junto con los resultados del seguimiento clínico (primera transferencia embrionaria posterior a la biopsia). **B) Población 2**, pacientes FIV a las cuales se les realizó, además de los procedimientos de la población 1, una caracterización psicológica y un análisis transcriptómico. **C) Población 3**, compuesta por participantes voluntarias jóvenes (<35 años) y sanas empleadas como población de referencia para comparar sus

resultados con los de la población 2. Por ello, se les caracterizó molecular (metabolitos hormonas esteroideas y transcriptómica) y psicológicamente. THS: terapia hormonal sustitutiva. Figura creada con Biorender.com.

La primera de las poblaciones (**población 1, Figura 11A**), se reclutó con el objetivo de establecer la metodología de análisis y realizar una primera comparación entre los niveles de hormonas esteroideas medidos en biopsias endometriales de mujeres infértiles bajo un ciclo THS (caracterización de metabolitos por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (UPLC-MS/MS)) y los resultados reproductivos de la primera transferencia de embriones de buena calidad posterior al ciclo de la toma de la biopsia (seguimiento clínico).

La **población 2 (Figura 11B)** es la población principal de este estudio, y se reclutó con el objetivo de caracterizar el efecto del estrés en la función endometrial y el éxito reproductivo, ahondando en los mecanismos moleculares subyacentes. Para ello, a estas pacientes, además de realizarles una toma de biopsia endometrial (en ciclo natural y THS), una caracterización de metabolitos y un seguimiento clínico, se les caracterizó psicológicamente. Los resultados de las caracterizaciones molecular y psicológica, junto con los del seguimiento clínico, se emplearon para analizar la relación entre estrés, microambiente endometrial y resultados reproductivos. En base a estos resultados, se realizó una secuenciación de RNA (caracterización transcriptómica) para dar un sentido molecular a los cambios que estuvieran ocurriendo a nivel metabólico.

Por último, la tercera de las poblaciones, (**población 3, Figura 11C**), formada por voluntarias jóvenes (≤ 35 años) y sanas se caracterizó molecular y psicológicamente, y estos resultados se compararon con los de la población 2.

Para las dos primeras poblaciones (1 y 2), las pacientes debían de cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

- Tener programada la realización de una prueba de evaluación endometrial, bien por haber sufrido fallos de implantación previos o por recomendación médica;
- Tener embriones de buena calidad, ya sea por ser receptora de ovocitos de donante (< 35 años) o por tener genéticamente caracterizados sus embriones (*Preimplantation Genetic Testing*, PGT, embriones euploides);
- Edad entre 18 y 50 años;
- IMC entre 18 y 30 kg/m²;

Para la **población 3**, los criterios de inclusión fueron:

- Edad entre 18 y 35 años;
- IMC entre 18 y 30 kg/m²;
- Ciclos menstruales regulares;
- No haber recibido un tratamiento de estimulación ovárica en los últimos 3 meses.

Se excluyó de su participación en este estudio a aquellas mujeres:

- Que presentaran patologías ginecológicas no corregidas que pudieran comprometer su función endometrial (miomas submucosos o intramurales >4 cm que deformen la cavidad, adenomiosis, pólipos endometriales, malformaciones uterinas adquiridas o congénitas, endometriosis, endometritis o hidrosalpinx)
- Con enfermedades sistémicas, antiinflamatorias, autoinmunes y/o renales (trasplante renal, lupus); y/o trastornos endocrinos y/o metabólicos significativos (diabetes, hipertiroidismo, hipercolesterolemia, hipertensión).
- Que recibieran medicación concomitante que pudiera interferir con los objetivos del estudio por estar descrita como que afecta a los niveles de hormonas esteroideas (antidiabéticos orales e insulina, andrógenos y antiandrógenos, corticoides)
- Que recibieran medicación psiquiátrica (ej. antidepresivos, tranquilizantes).

2. Reclutamiento de pacientes y recogida de muestras biológicas

2.1. Aprobación ética y protección de datos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Valencia, España [1706-VLC-051-EL (población 1); 1805-FIVI-033-PD (poblaciones 2 y 3)]. Todas las participantes proporcionaron su consentimiento informado firmado previamente a su incorporación al estudio. La información clínica de las participantes necesaria para cumplir con los objetivos del estudio se recogió de los registros médicos electrónicos internos de acuerdo a la ley de protección de datos.

2.2. Preparación endometrial y obtención de biopsias

La preparación endometrial puede realizarse bajo un ciclo de terapia hormonal sustitutiva (THS), también llamado ciclo sustituido, o siguiendo el ciclo menstrual normal de la paciente, sin la adición de hormonas, lo que se conoce como ciclo natural.

Para el **ciclo THS**, se administró a las participantes valerato de estradiol a partir del primer o segundo día de menstruación (6mg/día de Meriestra, Novartis, Barcelona, España). Pasados 10 días de terapia estrogénica, y en caso de que el endometrio presentase un patrón trilaminar con grosor $>6,5$ mm, y la participante tuviese unos valores séricos de P4 <1 ng/mL y de E2 >100 pg/mL, se administró progesterona vaginal micronizada (400 mg/12 h de Utrogestan, SEID, Barcelona, España o Progeffik, Effik, Madrid, España) para el soporte de la fase lútea. En este tipo de ciclos, la toma de la biopsia endometrial se realizó 5 días después del inicio de la administración de P4 vaginal (**P+5**) (**Figura 12A**).

En el caso de un **ciclo natural**, es necesario tener una fecha de referencia en cuanto al momento de la ovulación, pudiendo ser ésta la fecha de administración de gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual se emplea para inducir la ovulación cuando el tamaño del folículo dominante supera los 17 mm, o la fecha del pico de LH. La toma de la biopsia endometrial en las participantes en ciclo natural se realizó 7 días después de la administración de hCG (**hCG+7**) o del pico de LH (**LH+7**) (**Figura 12B**).

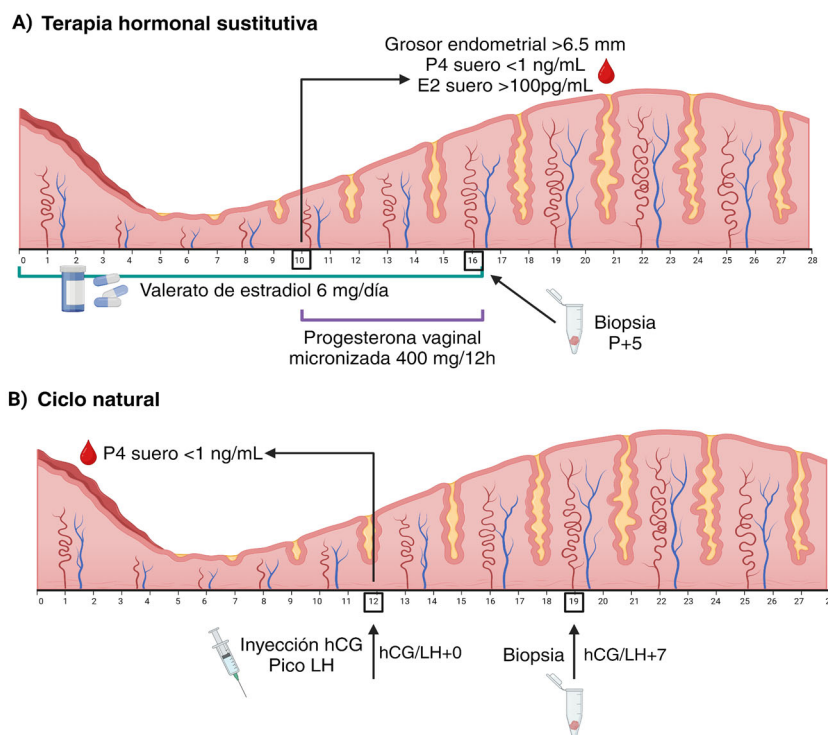


Figura 12. Tipos de preparación endometrial para la toma de una biopsia en un ciclo de evaluación.
A) Terapia hormonal sustitutiva. Se administran 6 mg/día de valerato de estradiol durante 10 días y,

seguidamente, se añade progesterona vaginal micronizada (400mg/12h) durante 5 días hasta la toma de la biopsia (día 16, P+5). **B) Ciclo natural.** Se considera como referencia el día del pico de LH o de la inyección de hCG (hCG/LH+0), tomándose la biopsia 7 días después (hCG/LH+7). E2: Estradiol; hCG: Gonadotropina Coriónica Humana; LH: Hormona Luteinizante; P4: Progesterona. Figura creada con Biorender.com.

El procedimiento de toma de biopsia se llevó a cabo bajo condiciones estériles tomando una porción de tejido del fundus uterino empleando un catéter Pipelle de Cornier® (Laboratorios CCD, París, Francia). El tejido sobrante no utilizado para la evaluación endometrial de la paciente se almacenó en un criotubo Nunc® (Thermo Scientific, Madrid, España) a -80°C en la clínica IVIRMA Valencia hasta su transporte a Fundación IVI.

2.3. Seguimiento clínico y clasificación de las participantes

Para aquellas participantes que se realizaron una transferencia con embriones de buena calidad en el ciclo posterior a la toma de la biopsia endometrial, la información clínica relativa a dicha transferencia se extrajo de los registros médicos electrónicos internos, de forma que se pudiera clasificar a las pacientes en función de su resultado reproductivo:

- Consideramos pacientes con **embarazo a término** a aquellas en las que se reportaba un recién nacido vivo (RNV).
- Consideramos pacientes con **embarazo no a término** a aquellas en las que se reportaba una prueba de embarazo negativa (β -hCG $\leq$ 10 IU/L) 14-16 días después de la transferencia embrionaria, aquellas con aborto bioquímico (definido por una prueba de embarazo positiva, pero ausencia de latido en ecografía en las primeras 10 semanas de gestación), o aborto clínico (pérdida de un embarazo a partir de la semana 10 de gestación después de haber evidenciado latido en ecografía).

Por otro lado, con esta información también se calcularon en cada una de las poblaciones la tasa de embarazo (proporción de embarazos clínicamente confirmados con respecto a todas las primeras transferencias embrionarias post-biopsia); tasa de RNV (proporción de RNV con respecto a todas las primeras transferencias post-biopsia); tasa de aborto clínico (proporción de abortos clínicos con respecto al total de las pruebas de embarazo positivas); y tasa de aborto bioquímico (proporción de aborto bioquímico con respecto al total de las pruebas de embarazo positivas).

3. Caracterización molecular: Determinación de los niveles de esteroides en tejido endometrial por UPLC-MS/MS

La determinación de los niveles endometriales de 12 metabolitos esteroideos [P4, cortisol, cortisona, A4, T, E1, 2-metoxiestrona (2-ME1), E2, estriol, DHEA, 17OHP5, y 17-hidroxiprogesterona (17OHP4)] se realizó mediante UPLC-MS/MS. Estos metabolitos fueron seleccionados por su papel clave en la reproducción y por estar todos ellos directamente relacionados en la ruta de síntesis de hormonas esteroideas.

Se introdujeron 50-100 mg de cada biopsia endometrial congelada en tubos de 2 mL con microesferas cerámicas CK14 (Precellys, Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francia). Por cada 50 mg de tejido, se añadieron 300 µL de acetato de etilo y posteriormente se homogeneizaron por duplicado en un sistema Precellys 24 Dual con enfriador Criolys (40 segundos, 6000 revoluciones por minuto (rpm), 4°C). Seguidamente, las muestras se centrifugaron (3000g, 5 minutos, 4°C) y se realizó una segunda extracción empleando en este caso 200 µL de acetato de etilo por cada 50 mg de tejido, para después llevar a cabo una evaporación completa en un concentrador Savant SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, USA). Finalmente, las muestras se reconstituyeron en 65 µL de agua: acetonitrilo (70:30 v/v), se centrifugaron (10000g, 10 minutos, 4°C), y los sobrenadantes obtenidos se filtraron para los siguientes análisis.

La concentración de los metabolitos previamente indicados se determinó empleando tres patrones internos (progesterona-D9, 17β-estradiol-13C3 y cortisona-d8; Sigma-Aldrich, Merck, Alemania) en un sistema UPLC Acquity (Waters, Reino Unido) equipado con una columna BEH C18 UPLC Acquity (1,7 µm, 2,1 x 100 mm; Waters). Como fases móviles, se emplearon agua y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%. El análisis de espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S con una fuente de ionización electrospray con modo de operación de monitoreo de reacciones múltiples e ion positivo.

4. Caracterización y clasificación psicológica de participantes empleando el cuestionario STAI

Las participantes a las que se les realizó evaluación psicológica fueron remitidas a la Unidad de Psicología de la Clínica IVI Valencia para rellenar la versión española del cuestionario psicológico **Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo (State-Trait Anxiety Inventory, STAI) (Apéndice A)** (Spielberger *et al.*, 1983), en base al cual se realizó posteriormente su clasificación. El cuestionario se rellenó para todas las participantes el mismo día de la toma de la biopsia o días después en el mismo ciclo.

El cuestionario STAI permite evaluar y medir de forma estandarizada la ansiedad como respuesta a los niveles de estrés crónico, siendo el más utilizado en la práctica clínica psicológica habitual por su validez, precisión y facilidad de aplicación. Comprende dos escalas separadas que miden dos conceptos diferenciados: la ansiedad como Estado y la ansiedad como Rasgo de personalidad. La ansiedad como Estado es momentánea, transitoria, caracterizada por sentimientos subjetivos de tensión y aprensión, mientras que la ansiedad como Rasgo es una condición más estable, instaurada en la personalidad como la propensión ansiosa que hace percibir a las personas y las situaciones como amenazantes. El cuestionario consta de un total de 40 ítems (20 para cada escala) que evalúan tensión, nerviosismo y preocupaciones utilizando una escala de 4 puntos; para la ansiedad como Estado, la escala va de 0 (nada) a 3 (mucho), mientras que para la dimensión Rasgo, va de 0 (casi nunca) a 3 (casi siempre). La puntuación para cada escala oscila entre 0 y 60, indicando puntuaciones más altas mayores niveles de ese aspecto de la ansiedad. Las puntuaciones directas obtenidas al evaluar a cada paciente no tienen interpretación por ellas mismas; por ello, el cuestionario va asociado a unos baremos de población general (en este caso la española) para poder comparar las puntuaciones directas con las puntuaciones típicas y transformarlas en percentiles (Spielberger *et al.*, 1983).

Los resultados derivados de los cuestionarios permitieron clasificar a las participantes en dos grupos en función de sus niveles de estrés: se consideró como estresadas a las que puntuaron por encima del percentil 60 y como no estresadas a aquellas que puntuaron por debajo del percentil 60. Se consideraron de forma independiente ambas escalas del cuestionario (Estado y Rasgo) pudiendo una paciente estar estresada de acuerdo a la escala Estado y no estarlo según Rasgo o viceversa.

5. Asociación de biomarcadores moleculares de estrés con el éxito reproductivo y correlación con las puntuaciones del cuestionario STAI

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software estadístico R en la versión 4.0.5 (R Core Team, 2021). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos p-valores ≤ 0.05 .

Se establecieron como puntos de corte poblacionales en las concentraciones de metabolitos el primer cuartil [Q1], la mediana [Q2], el tercer cuartil [Q3] y el máximo relativo para las comparaciones posteriores. Se empleó el test de Barnard (paquete *Barnard* v.1.8 (Erguler, 2016)) para comparar los niveles endometriales de metabolitos de las pacientes con respecto a los resultados reproductivos (poblaciones 1 y 2) y estrés (población 2).

Las correlaciones entre los niveles de metabolitos y la proporción de participantes estresadas/embarazadas se evaluaron mediante el test de correlación de Pearson.

Se evaluó la normalidad de las variables numéricas empleando un test de Shapiro-Wilk. Para la comparación de medianas/medias entre grupos, en el caso de las variables no paramétricas, se emplearon los tests de Wilcoxon y Kruskal Wallis. Para las variables paramétricas, se emplearon el test de la t y ANOVA. Para las variables categóricas se empleó el test de Fisher para evaluar las diferencias en proporciones.

6. Identificación de los mecanismos moleculares a través de los cuales el estrés afecta a la función endometrial

6.1. Procesamiento de las biopsias

Las muestras endometriales se procesaron en hielo, en condiciones libres de RNasa, añadiendo 1000 μ L de solución salina tamponada con fosfato de Dubelco (PBS®; Capricorn Scientific, Labclinics, Barcelona, España) al criotubo con la muestra, y depositando posteriormente el contenido en una placa de cultivo celular de 90 x 20 mm (SPL Life Sciences, Gyeonggi-do, Korea). Empleando dos cuchillas quirúrgicas estériles (No.24, Braun, Hessen, Alemania), se limpiaron las muestras, quitando los restos de sangre o moco y el líquido residual, quedando lista para la extracción de RNA.

6.2. Extracción de RNA y evaluación de la calidad

Las biopsias endometriales limpias se disgregaron manualmente con dos cuchillas quirúrgicas estériles (No.24, Braun, Hessen, Alemania) en condiciones libres de RNasa y en hielo. El RNA total de las muestras se extrajo con el kit miRNeasy Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Madrid, España).

La calidad del RNA extraído se evaluó empleando un espectrofotómetro Nanodrop One (AF-00342; Thermo Fisher Scientific, Valencia, España) y el sistema TapeStation 4200 (Agilent, Valencia, España). Se excluyeron del análisis transcriptómico aquellas muestras que no cumplieran con los siguientes criterios de calidad: ratio A260/280 ~2, ratio A260/A230 entre 1,8 y 2,2, *RNA Integrity Number* (RIN) ≥3 y DV200 ≥70%.

6.3. Generación de librerías y secuenciación

La generación de librerías y su secuenciación se llevó a cabo sólo para las muestras de las poblaciones 2 y 3. Las librerías de RNA se generaron siguiendo el protocolo comercial de *AmpliSeq for Illumina® Transcriptome Human Gene Expression Panel* (Illumina, 2022, 2021a).

Se realizaron dos tandas de secuenciación, en cada una de las cuales se utilizó como control positivo un RNA Humano Universal (Agilent, Valencia, España), como control negativo agua libre de RNasas, y dos muestras biológicas como réplicas técnicas entre tandas de secuenciación (control *intran*), de forma que se pudiera confirmar que los resultados entre tandas de secuenciación eran comparables. Se empleó el secuenciador NextSeq 500/550, con un diseño de extremos emparejados, 150 ciclos, y 10M de lecturas por muestra. Para validar el rendimiento de la secuenciación, se verificó que los grupos tuvieran una adecuada densidad (170-220 K/mm²), que más del 90% de los grupos pasaran el filtro, lo cual reflejaba una adecuada pureza de la señal, y que se obtuviera una producción estimada de 50-60 Gigabases con una alta calidad de lectura (>80% de datos >Q30).

6.4. Preprocesado y análisis exploratorio de datos transcriptómicos

Los datos de secuenciación en bruto fueron demultiplexados (asignados a su muestra de origen gracias al reconocimiento de las secuencias contenidas en los adaptadores) empleando bcl2fastq y su calidad fue evaluada utilizando FastQC (Andrews, 2020; Illumina, 2021b). Las lecturas de la librería de RNA-Seq se alinearon con secuencias de referencia

incluyendo los 20.802 transcritos específicos del panel AmpliSeq. Los alineamientos se llevaron a cabo utilizando la herramienta STAR (Spliced Transcripts Alignment Reference) (Dobin *et al.*, 2013), y seguidamente se cuantificaron empleando *featureCounts* (Liao *et al.*, 2014) con el objetivo de descartar recuentos de baja calidad ($Q < 30$).

Se evaluó el comportamiento de las muestras empleando un PCA (Jolliffe and Cadima, 2016) y se eliminaron los controles positivos y los controles *intran*. Se filtraron aquellos genes con una baja expresión en la mayor parte de las muestras (*Counts Per Million* (CPM) $< 1,5$ en más de un 95% de las muestras) utilizando el paquete *EdgeR* v.3.32.1 (Chen *et al.*, 2016). Una vez filtrados, los datos restantes se normalizaron con *Voom* (paquete *limma* v. 3.46.0) (Ritchie *et al.*, 2015).

Empleando un análisis de PVCA (*Principal Variance Component Analysis*) con el paquete *PVCA* (Bushel, 2020), se evaluaron los posibles efectos de tanda debidos a variables técnicas y clínicas/demográficas sobre el comportamiento transcriptómico de las muestras; en caso de evidenciarse un efecto de tanda, se corrigió empleando modelos lineales incluidos en el paquete *limma*.

6.5. Estudio del comportamiento génico en función de las concentraciones de hormonas esteroideas y los cuestionarios psicológicos

Se priorizaron aquellos metabolitos esteroideos endometriales que se encontraron significativamente afectados por el estrés y/o asociados con los resultados reproductivos para realizar los análisis relativos a los cambios en la expresión génica endometrial. Se realizó un análisis de tiempo-dosis para analizar qué genes variaban su expresión en función de las concentraciones de las hormonas esteroideas, o bien en función de las puntuaciones en el cuestionario STAI, empleando el paquete *maSigPro* v.1.62.0 (Conesa *et al.*, 2006; Nueda *et al.*, 2014), considerando como significativos aquellos genes con $p\text{-valor} < 0,001$. Posteriormente, se realizó una agrupación de dichos genes significativos en grupos de comportamiento utilizando técnicas de agrupamiento jerárquico, agrupando a aquellos con comportamientos similares.

Se realizó una anotación funcional de los genes significativos para analizar, por un lado, en qué funciones se encontraban principalmente involucrados aquellos genes que variaban su expresión con las variaciones en la variable a estudiar y, por otro lado, para observar qué funciones se encontraban más representadas en cada uno de los grupos de comportamiento. Para ello, se emplearon funciones biológicas anotadas en KEGG (Kanehisa, 2000) y GO

(Ashburner *et al.*, 2000), considerando para este último sólo aquellas asociaciones validadas experimentalmente, es decir, aquellas en las que hay evidencia de un experimento que apoya directamente la anotación de dicho gen. Además, únicamente se consideraron las funciones anotadas con más de 2 genes. Finalmente, se intersectaron tanto los genes como las funciones obtenidas entre los diferentes metabolitos/cuestionarios psicológicos analizados para evidenciar si alguno de ellos presentaba una regulación común empleando diagramas de Venn.

7. Estudio del efecto del cortisol en la expresión génica de células endometriales estromales en cultivo

Con el objetivo de evaluar y validar el efecto de diferentes concentraciones de cortisol en la expresión génica endometrial, se empleó una línea de células endometriales estromales humanas (HESC, del inglés *human endometrial stromal cells*), las cuales se incubaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, *Dubelcco's Modified Eagle Medium*) con suero fetal bovino y suplementado con 0.2% de fungizona y 0.2% de penicilina/estreptomicina.

Una vez alcanzada la confluencia, las células se cultivaron con dos concentraciones diferentes de cortisol (*hydrocortisone*, Sigma-Aldrich, nº cat.: H0888) (0.5 μ M y 10 μ M) o vehículo durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se extrajo el RNA con el kit miRNeasy Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Madrid, España). El cDNA se sintetizó utilizando el kit de reactivos *PrimeScript* (Perfect Real Time, Takara, Shiga, Japón) en un termociclador T3000 (Biometra, Dublín, Irlanda). La expresión génica de genes seleccionados se evaluó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando cebadores específicos (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (Tabla Suplementaria 1). Las reacciones se llevaron a cabo con cinco réplicas técnicas en un termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA) y utilizando el reactivo *Power-Up SYBR Green* (Thermo Fisher Scientific). Se empleó como gen *housekeeping* la β -actina, como control positivo un RNA Humano Universal (Agilent, Valencia, España), y agua libre de RNasas como control negativo. Los cálculos de expresión relativa se realizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen and Livak, 2008).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización demográfica y clínica de las poblaciones de pacientes FIV

La información relativa a las variables clínicas y demográficas de las pacientes FIV (poblaciones 1 y 2) se recoge en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Caracterización demográfica y clínica de las poblaciones de pacientes FIV.

Variable	Población 1		Población 2	
	N (%)	Media $\pm$ sd/ N (%)	N (%)	Media $\pm$ sd/ N (%)
Edad (años)	76 (100%)	39,55 $\pm$ 4,9	84 (100%)	39,10 $\pm$ 3,6
IMC (kg/m ²)	76 (100%)	24,32 $\pm$ 3,9	84 (100%)	22,87 $\pm$ 3,0
LE (mm)	74 (97,4%)	8,23 $\pm$ 1,4	55 (65,5%)	8,71 $\pm$ 1,5
Tipo de infertilidad	68 (89,5%)	Primaria: 50 (73,5%) Secundaria: 18 (26,5%)	74 (88,1%)	Primaria: 44 (59,5%) Secundaria: 30 (40,5%)
Tipo de ciclo biopsia	68 (89,5%)	THS: 68 (100%)	74 (88,1%)	Natural: 24 (32,4%) THS: 50 (67,6%)
Tipo de ciclo transferencia	68 (89,5%)	THS: 68 (100%)	72 (85,7%)	Estimulado: 2 (2,8%) Natural: 13 (18,1%) THS: 57 (79,2%)
Calidad embrión	66 (86,8%)	EBC: 60 (90,9%) ECI: 6 (9,1%)	72 (85,7%)	EBC: 65 (90,3%) ECI: 7 (9,7%)
Estado embrión	67 (88,2%)	Congelado: 52 (77,6%) Fresco: 15 (22,4%)	72 (85,7%)	Congelado: 47 (65,3%) Fresco: 25 (34,7%)

La tabla recoge las características demográficas y asociadas a la biopsia y la transferencia embrionaria para ambas poblaciones. Se muestra el total de participantes de las que se dispone de la información de ese parámetro (N) para cada una de las variables estudiadas, el porcentaje que representan con respecto al total de participantes reclutadas, la media y la desviación típica (standar deviation, sd) de las variables continuas y el número de pacientes y el porcentaje que representan para las variables categóricas. EBC: embriones de buena calidad; ECI: embriones de calidad incierta; IMC: índice de masa corporal; LE: grosor de la línea endometrial; THS: terapia hormonal sustitutiva.

Como se puede observar en la **Tabla 3**, mientras que la población 1 contó con un total de 76 participantes, en la población 2 se aumentó el tamaño muestral, contando con 84 participantes. Es importante destacar que para todas las participantes de la población 1 tanto la toma de la biopsia endometrial como la posterior transferencia embrionaria se realizaron bajo un ciclo THS, mientras en la población 2 se combinaron ambos tipos de preparaciones

endometriales (THS y ciclo natural modificado), lo que hace que los resultados no sean totalmente comparables. Es por esto que las poblaciones se analizaron de forma independiente.

2. Caracterización de metabolitos de la ruta de biosíntesis esteroidea de las poblaciones de pacientes FIV

La información relativa a la medición de metabolitos endometriales por UPLC-MS/MS de las pacientes FIV se recoge en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Caracterización metabolitos esteroideos de las poblaciones de pacientes FIV.

Metabolito	Población 1			Población 2		
	N (%)	Media $\pm$ sd	LOD	N (%)	Media $\pm$ sd	LOD
P4 (μ g/g)	75 (98,7%)	20,21 $\pm$ 41,5	0,1	76 (90,5%)	39,60 $\pm$ 98,3	0,5
E1 (ng/g)	54 (71,1%)	16,43 $\pm$ 14,1	1	79 (94%)	58,37 $\pm$ 46,1	0,3
E2 (ng/g)	48 (63,2%)	7,82 $\pm$ 23	0,5	50 (59,5%)	1,96 $\pm$ 5,1	0,1
Estriol (ng/g)	0	0	10	0	0	10
2-ME1 (ng/g)	0	0	0,5	0	0	0,5
A4 (ng/g)	76 (100%)	1,93 $\pm$ 3,5	0,1	70 (83,3%)	2,35 $\pm$ 11,6	0,05
T (ng/g)	73 (96,1%)	0,45 $\pm$ 0,6	0,1	66 (78,6%)	0,36 $\pm$ 0,3	0,05
17OHP4 (ng/g)	62 (81,6%)	2,19 $\pm$ 3,2	0,1	57 (67,9%)	2,15 $\pm$ 3,8	0,05
17OHP5 (ng/g)	0	0	10	0	0	10
DHEA (ng/g)	-	-	-	79 (94%)	35,16 $\pm$ 26,9	0,3
Cortisona (ng/g)	76 (100%)	81,34 $\pm$ 50,8	2	79 (94%)	70,67 $\pm$ 31,7	0,1
Cortisol (ng/g)	76 (100%)	10,65 $\pm$ 15,2	0,5	78 (92,9%)	5,89 $\pm$ 5,7	0,1

La tabla recoge los resultados de la medición de metabolitos endometriales por UPLC-MS/MS para ambas poblaciones. Se muestra el total de participantes de las que se dispone de la información (N) para cada metabolito, el porcentaje que representan con respecto al total de participantes reclutadas, así como la media y la desviación típica (standard deviation, sd) para cada uno de los metabolitos. Además, se muestra el límite de detección (LOD) del aparato UPLC-MS/MS para cada metabolito en cada población. 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; 17-OHP5: 17-hidroxipregnenolona; 2-ME1: 2-metoxiestrona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; P4: progesterona; T: testosterona.

De los 12 metabolitos evaluados en este estudio, 3 no fueron detectados en tejido endometrial empleando UPLC-MS/MS en ninguna de las dos poblaciones: 17OHP5, 2-ME1 y estriol. Esto es debido a que sus concentraciones se encontraban por debajo del límite de detección (LOD), que se define como el mínimo nivel al cual se detecta señal atribuible a la presencia del analito, y que depende de la técnica, el equipo y el analito. El LOD para 17OHP5, 2-ME1

y estriol fue de 10 ng/g, 0,5 ng/g y 10 ng/g, respectivamente. Por lo tanto, podríamos suponer que sus concentraciones en endometrio están por debajo de dichos valores. Además, para la población 1 no se evaluó la concentración de DHEA en tejido endometrial (**Tabla 4**).

Como se puede observar en la **Tabla 4**, no todos los metabolitos fueron detectados en las muestras endometriales de todas las pacientes, ya que en algunos casos se encontraban por debajo del LOD para ese metabolito. Además, en la población 2 se descartaron 5 de las 84 muestras de tejido endometrial debido a cantidad insuficiente de tejido, ausencia de tejido en el tubo, o rotulado inadecuado del mismo, siendo 79 las pacientes disponibles para la determinación hormonal endometrial.

3. Los niveles endometriales de hormonas esteroideas afectan a las probabilidades de lograr un embarazo a término

En la población 1, 68 de las 76 pacientes reclutadas se realizaron una transferencia embrionaria posterior a la toma de la biopsia, lo que supone una tasa de abandono del tratamiento del 10,5%. De las pacientes que sí se realizaron una transferencia, 30 (44,1%) lograron un embarazo a término. Las tasas de embarazo, RNV, aborto clínico y aborto bioquímico para esta población fueron del 61,67%, 44,12%, 9,52% y 19,05%, respectivamente. En la población 2, 74 de las 84 pacientes se realizaron una transferencia embrionaria posterior a la biopsia, logrando 47 de ellas (63,5%) un embarazo a término. La tasa de abandono del tratamiento en esta población fue del 11,9%. Las tasas de embarazo y RNV para esta población fueron del 53,57% y 25%, respectivamente, no habiendo sufrido ninguna de las pacientes un aborto clínico o bioquímico en la primera transferencia posterior a la biopsia. La **Tabla 5** contiene la información relativa a la influencia de las variables clínicas y demográficas de cada población en los resultados reproductivos.

Tabla 5. Influencia de variables clínicas y variables relativas a la transferencia embrionaria en los resultados reproductivos en las poblaciones 1 y 2.

Población 1				
Variable	N (%)	ET (n=30, 44,1%)	ENT (n=38, 55,9%)	p-valor
Edad (años)	68 (100%)	<35 = 3 (10%) [35,44] = 23 (76,7%) >45 = 4 (13,3%)	<35 = 5 (13,2%) [35,44] = 25 (65,8%) >45 = 8 (21,1%)	0,685
IMC (kg/m ²)	68 (100%)	<25 = 16 (53,3%) [25,30[= 12 (40%) ≥30 = 2 (6,7%)	<25 = 27 (71,1%) [25,30[= 8 (21,1%) ≥30 = 3 (7,9%)	0,269

Población 1				
Variable	N (%)	ET (n=30, 44,1%)	ENT (n=38, 55,9%)	p-valor
LE (mm)	66 (97,1%)	[5,9-9] = 21 (72,4%) >9 = 8 (27,6%)	[5,9-9] = 28 (75,7%) >9 = 9 (24,3%)	0,784
Tipo de infertilidad	68 (100%)	Primaria = 21 (70%) Secundaria = 9 (30%)	Primaria = 29 (76,3%) Secundaria = 9 (23,7%)	0,590
Tipo de ciclo biopsia	68 (100%)	THS = 30 (100%)	THS = 38 (100%)	1
Tipo de ciclo transferencia	68 (100%)	THS = 30 (100%)	THS = 38 (100%)	1
Calidad embrión	66 (97,1%)	EBC = 27 (93,1%) ECI = 2 (6,9%)	EBC = 33 (89,2%) ECI = 4 (10,8%)	0,688
Estado embrión	67 (98,5%)	Congelado = 24 (80%) Fresco = 6 (20%)	Congelado = 28 (75,7%) Fresco = 9 (24,3%)	0,773
Población 2				
Variable	N (%)	ET (n=47, 63,5%)	ENT (n=27, 36,5%)	p-valor
Edad (años)	74 (100%)	<35 = 5 (10,6%) [35,40] = 17 (36,2%) >40 = 25 (53,2%)	<35 = 3 (11,1%) [35,40] = 10 (37%) >40 = 14 (51,9%)	1
IMC (kg/m2)	74 (100%)	<22 = 20 (42,6%) [22,25] = 17 (36,2%) >25 = 10 (21,3%)	<22 = 12 (44,4%) [22,25] = 9 (33,3%) >25 = 6 (22,2%)	1
LE (mm)	49 (66,2%)	[6,9] = 18 (69,2%) >9 = 8 (30,8%)	[6,9] = 17 (73,9%) >9 = 6 (26,1%)	0,761
Tipo de infertilidad	74 (100%)	Primaria = 31 (66%) Secundaria = 16 (34%)	Primaria = 13 (48,1%) Secundaria = 14 (51,9%)	0,149
Tipo de ciclo biopsia	74 (100%)	Natural = 19 (40,4%) HRT = 28 (59,6%)	Natural = 5 (18,5%) HRT = 22 (81,5%)	0,072
Tipo de ciclo transferencia	72 (97,3%)	Estimulado = 2 (4,4%) Natural = 8 (17,8%) THS = 35 (77,8%)	Estimulado = 0 (0%) Natural = 5 (18,5%) THS = 22 (81,5%)	0,777
Calidad embrión	72 (97,3%)	EBC = 42 (93,3%) ECI = 3 (6,7%)	ECB = 23 (85,2%) ECI = 4 (14,8%)	0,413
Estado embrión	72 (97,3%)	Congelado = 22 (48,9%) Fresco = 23 (51,1%)	Congelado = 25 (92,6%) Fresco = 2 (7,4%)	0,0001** *

Para cada variable, se indica el número de pacientes con información disponible y el porcentaje que representan en la totalidad de la población, así como el p-valor obtenido en el test de Fisher para cada comparación. Se destaca en negrita los resultados estadísticamente significativos, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos ($***p \leq 0,001$). EBC: embriones de buena calidad; ECI: embriones de calidad incierta; ET: embarazo a término; ENT: embarazo no a término; IMC: índice de masa corporal; LE: grosor de la línea endometrial; THS: terapia hormonal sustituida.

Para la población 1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables demográficas y clínicas evaluadas entre ambos grupos de pacientes, demostrando la homogeneidad de la población con respecto a embarazo y la no existencia de posibles sesgos en los resultados (**Tabla 5**). Cabe destacar que en esta población se incluyó a una pequeña cantidad de pacientes (n=5) con IMC ≥ 30 , a pesar de ser este uno de los criterios de exclusión. Sin embargo, y dado que la proporción entre los grupos de embarazo a término y no embarazo a término es la misma, esto no estaría afectando a futuros resultados. Para la población 2, se observa como sólo 2 de las 27 pacientes (7,4%) que no lograron un embarazo a término transfirieron sus embriones en fresco, diferencia estadísticamente significativa al compararla con el grupo de las pacientes que lograron un embarazo a término, en el que un 51,1% de las transferencias de embriones (n=23) fueron en fresco (p-valor=0,0001) (**Tabla 5**). El resto de las variables demográficas y clínicas evaluadas para esta población fueron comparables entre ambos grupos.

Dado que la población 2 engloba a pacientes que realizaron dos tipos de preparaciones endometriales de forma previa a la toma de la biopsia, se evaluó, en primer lugar, si para las pacientes a incluir en este análisis (aquellas con resultado reproductivo y valor detectable para cada uno de los metabolitos, n=70) el tipo de preparación endometrial influía en la concentración de metabolitos esteroideos en endometrio. Las concentraciones endometriales de P4 fueron significativamente mayores en aquellas pacientes sometidas a una THS (55,71 $\mu\text{g/g}$) al compararlas con las pacientes en ciclo natural (0,39 $\mu\text{g/g}$) (p-valor=1,28e-7). Contrariamente, para la DHEA las concentraciones endometriales fueron significativamente mayores en las pacientes en ciclo natural (42,82 ng/g vs 33,18 ng/g, p-valor=0,029) (**Tabla 6**). El resto de metabolitos considerados no presentaron diferencias significativas en sus concentraciones entre ciclo natural y THS. Debido a la presencia de estas diferencias significativas, para ambos metabolitos, los análisis posteriores se realizaron considerando de forma independiente cada tipo de preparación endometrial.

Tabla 6. Influencia del tipo de preparación endometrial previa a la toma de la biopsia en la concentración de hormonas esteroideas en tejido endometrial para los análisis relativos a los resultados reproductivos en la población 2.

Metabolito	N	Ciclo natural (n=20, 28,6%)	Ciclo sustituido (n=50, 71,4%)	p-valor
P4 ($\mu\text{g/g}$)	67 (95,7%)	0,07 (0,015-2,55)	10,30 (0,06-627,95)	1,28e-7***
E1 (ng/g)	70 (100%)	39,80 (26-336)	45,50 (31-191,20)	0,091
E2 (ng/g)	43 (61,4%)	0,70 (0,40-2,80)	1,15 (0,20-36,50)	0,100
A4 (ng/g)	62 (88,6%)	0,50 (0,40-3,50)	0,50 (0,10-97,30)	0,317

Metabolito	N	Ciclo natural (n=20, 28,6%)	Ciclo sustituido (n=50, 71,4%)	p-valor
T (ng/g)	57 (81,4%)	0,30 (0,10-0,90)	0,30 (0,10-2,20)	0,442
DHEA (ng/g)	70 (100%)	33,95 (17,80-152)	25,50 (9,10-153)	0,029*
17OHP4 (ng/g)	49 (70%)	1,10 (0,30-7,30)	1,10 (0,20-26,90)	0,983
Cortisona (ng/g)	70 (100%)	61,50 (16-142)	68,50 (12-171)	0,435
Cortisol (ng/g)	69 (98,6%)	5,20 (1,80-30,90)	3,70 (0,80-26,70)	0,323

Para cada metabolito, se indica el número de pacientes en los que se ha detectado dicho metabolito y el porcentaje que representan con respecto al total de pacientes con resultado reproductivo y valor detectable para los metabolitos endometriales, así como la media y la desviación típica (sd) para cada uno de ellos en cada tipo de preparación endometrial y el p-valor obtenido en el test de Wilcoxon para cada comparación. Se destaca en negrita los resultados estadísticamente significativos, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E2: estradiol; E1: estrona; P4: progesterona; T: testosterona.

Concentraciones elevadas de estrona y bajas de andrógenos y corticosteroides favorecen la consecución de un embarazo a término en las pacientes FIV

Con el objetivo de evaluar la relación existente entre los niveles endometriales de las hormonas esteroideas medidas y las probabilidades de lograr un embarazo a término, se aplicó un test de Wilcoxon para comparar la mediana de la concentración de metabolitos entre el grupo de pacientes que lograron un embarazo a término y las que no para ambas poblaciones. Para la población 1 se observó una diferencia significativa en las concentraciones de E2, siendo estas superiores en aquellas pacientes que no lograron un embarazo a término (**Tabla 7**). Sin embargo, para la población 2 no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos (**Tabla 7**).

Tabla 7. Los niveles de estradiol endometrial se encuentran relacionados con el éxito reproductivo.

Metabolito	Población 1			
	N (%)	ET (n=30, 44,1%)	ENT (n=38, 55,9%)	p-valor
P4 (µg/g)	66 (97,1%)	2,73 (0,21-169,68)	3,35 (0,15-202,57)	0,207
E1 (ng/g)	49 (72,1%)	5,60 (1,24-83,78)	5,47 (0,50-17,84)	0,866
E2 (ng/g)	42 (61,8%)	1,48 (0,57-134,83)	2,26 (0,47-81,55)	0,050*
A4 (ng/g)	68 (100%)	0,58 (0,22-16,18)	0,80 (0,14-20,42)	0,170
T (ng/g)	65 (95,6%)	0,26 (0,10-4,90)	0,32 (0,05-1,61)	0,680
17OHP4 (ng/g)	57 (83,8%)	0,57 (0,14-13,83)	1,66 (0,19-14,52)	0,098
DHEA (ng/g)	-	-	-	-
Cortisona (ng/g)	68 (100%)	68,58 (21,64-162,79)	66,04 (26,40-344,56)	0,690
Cortisol (ng/g)	68 (100%)	4,91 (0,64-51,07)	3,99 (0,50-66,72)	0,849

Población 2				
Metabolito	N (%)	ET (n=44, 62,9%)	ENT (n=26, 37,1%)	p-valor
P4 (µg/g)	Nat = 17 (24,3%)	0,05 (0,02-2,55)	0,51 (0,07-1,31)	0,102
	THS = 50 (71,4%)	12,38 (0,10-274,06)	5,11 (0,06-627,95)	0,444
E1 (ng/g)	70 (100%)	42,50 (26-336)	43 (31,60-191,20)	0,385
E2 (ng/g)	43 (61,4%)	1,20 (0,20-36,50)	0,85 (0,20-4,50)	0,199
A4 (ng/g)	62 (88,6%)	0,50 (0,10-6,80)	0,50 (0,20-97,30)	0,797
T (ng/g)	57 (81,4%)	0,30 (0,10-2,20)	0,30 (0,10-0,70)	0,249
17OHP4 (ng/g)	49 (70%)	1 (0,20-6,70)	1,35 (0,20-26,90)	0,146
DHEA (ng/g)	Nat = 20 (28,6%)	34,50 (21-152)	28,55 (17,80-42,30)	0,256
	THS = 50 (71,4%)	22,15 (9,10-94)	28 (9,50-153)	0,162
Cortisona (ng/g)	70 (100%)	66,50 (16-142)	65,50 (12-171)	0,932
Cortisol (ng/g)	69 (98,6%)	3,60 (0,80-30,90)	4,60 (0,80-26,70)	0,625

Para cada metabolito, se indica el número de pacientes en los que se ha detectado dicho metabolito y el porcentaje que representan en la totalidad de pacientes con resultado reproductivo disponible, así como la mediana y el rango (mínimo-máximo) para cada uno de ellos en cada grupo y el p-valor obtenido en el test de Wilcoxon para cada comparación. Para aquellos metabolitos afectados por el tipo de preparación endometrial (Tabla 6), los resultados se muestran de forma independiente para cada tipo de ciclo. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en **negrita**, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0.05$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; ENT: embarazo no a término; ET: embarazo a término; Nat: ciclo natural; P4: progesterona; T: testosterona; THS: terapia hormonal sustitutiva.

No obstante, dada la presencia de valores extremos en la distribución de metabolitos en nuestras poblaciones, se optó por realizar otro tipo de análisis que incluyera a aquellos grupos minoritarios (grupos extremos) que se corresponden con las pacientes con una mayor desregulación en los perfiles hormonales del microambiente endometrial. A tal efecto, se aplicó una comparación de proporciones [proporción de pacientes que logran un embarazo a término con respecto a las que no] usando el test de Barnard en función de diferentes puntos de corte o niveles de metabolitos [la concentración equivalente a Q1, la mediana de la concentración, el Q3 y el valor de concentración máximo relativo]. En las **Tablas Suplementarias 2** (población 1) y **3** (población 2) se recogen los resultados obtenidos tras aplicar el test de Barnard para todos los metabolitos.

Como se observa en la **Figura 13**, en la población 1 el 100% de las pacientes (n=4) con concentraciones endometriales de E1 $\geq 21,21$ ng/g y el 87,5% de las pacientes (n=7) con concentraciones endometriales de E2 $< 1,15$ ng/g lograron un embarazo a término en la primera transferencia embrionaria que se realizó posterior al ciclo de la biopsia (p-valores=0,026 y 0,047, respectivamente). Contrariamente, el 76,5% de las pacientes con

concentraciones endometriales de A4 superiores a 1,35 ng/g (n=19) no lograron un embarazo a término en la misma transferencia embrionaria (p=0,05) (**Figura 13**).

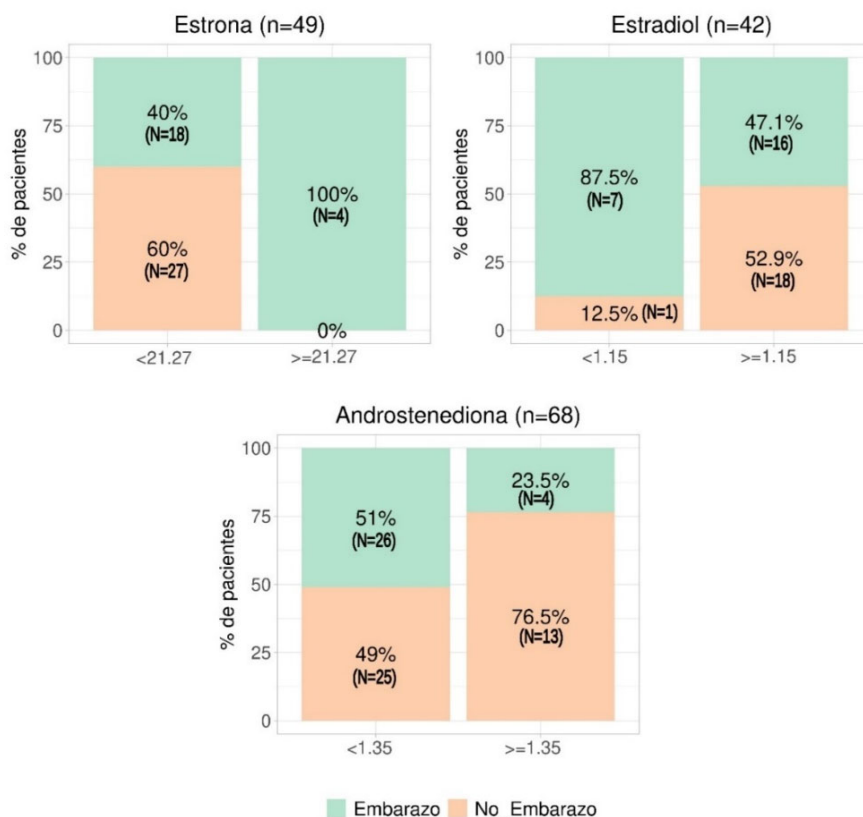


Figura 13. Los niveles endometriales de estrona, estradiol y androstenediona están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 1. Representación gráfica de las diferencias de proporciones significativas entre los niveles endometriales de metabolitos y los resultados reproductivos en la población 1. Los gráficos de barras representan las diferencias de proporciones significativas recogidas en la Tabla Suplementaria 2 para estrona (máximo relativo), estradiol (Q1) y androstenediona (Q3). Las barras verdes se corresponden con la proporción de pacientes que lograron un embarazo a término en la primera transferencia embrionaria posterior a la biopsia mientras que las barras naranjas con las que no lo lograron.

En la **Figura 14** se representan gráficamente los resultados significativos resultantes de aplicar el test de Barnard para la población 2. En concreto, el 80% de las pacientes con concentraciones endometriales de cortisol $\geq 13,9$ ng/g (n=4) no lograron un embarazo a término en la primera transferencia embrionaria posterior a la toma de la biopsia (p=0,029), lo que conlleva un riesgo relativo un 132% superior de no lograr un embarazo a término si el cortisol endometrial se encuentra por encima de ese valor (p-valor=0,0028). Por el contrario, el 78,9% (n=15) de las pacientes con concentraciones endometriales de E2 > 1 ng/g, el 77,8% (n=21) de las pacientes con concentraciones de 17OHP4 $\leq 1,1$ ng/g y el 72% de las pacientes bajo un ciclo de THS con concentraciones de DHEA ≤ 25 ng/g (n=18) lograron un embarazo a término en esa primera transferencia embrionaria (p-valores=0,035, 0,016 y 0,013, respectivamente) (**Figura 14**).

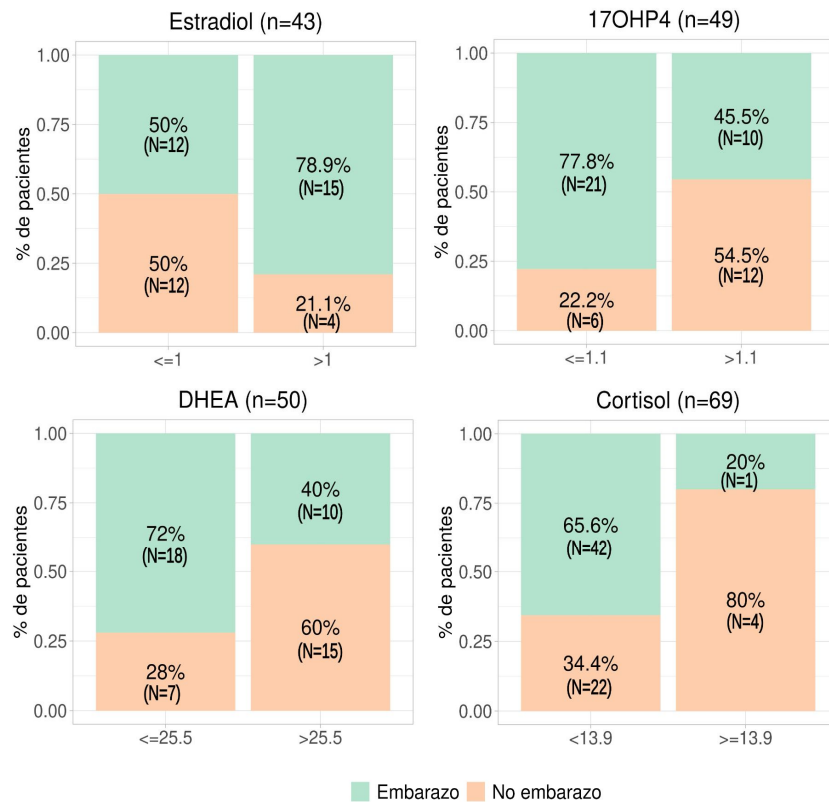
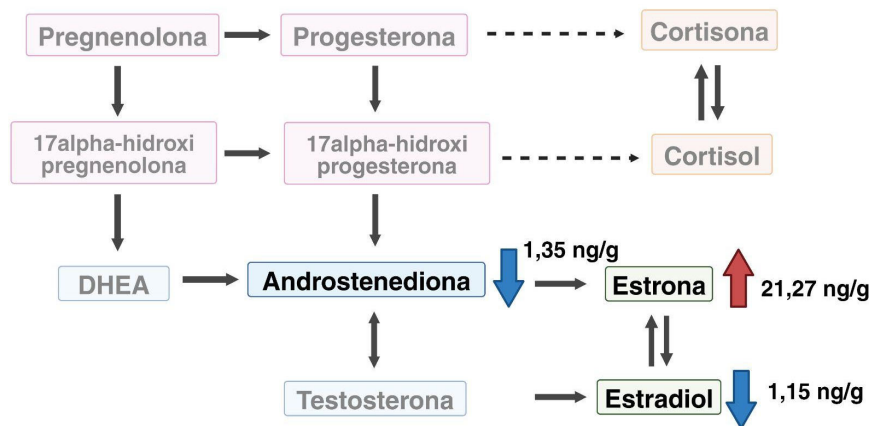


Figura 14. Los niveles endometriales de estradiol, 17OHP4, DHEA y cortisol están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 2. Representación gráfica de las relaciones significativas entre los niveles endometriales de metabolitos y los resultados reproductivos en la población 2. Los gráficos de barras representan las relaciones significativas recogidas en la Tabla Suplementaria 3 para cortisol (máximo relativo), estradiol, 17OHP4 y DHEA (mediana). Las barras verdes se corresponden con la proporción de pacientes que lograron un embarazo a término en la primera transferencia embrionaria posterior a la biopsia mientras que las barras naranjas con las que no lo lograron. 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; DHEA: dehidroepiandrosterona.

El análisis de correlación entre los niveles endometriales de estas hormonas y la proporción de pacientes con embarazo a término mostró una alta correlación en la mayoría de los casos, no alcanzando la significatividad estadística en ninguno de ellos (cortisol: $\text{cor}=-0,922$, $\text{p-valor}=0,078$; E1: $\text{cor}=0,913$, $\text{p-valor}=0,087$; 17OHP4: $\text{cor}=-0,845$, $\text{p-valor}=0,155$; A4: $\text{cor}=-0,811$, $\text{p-valor}=0,189$; DHEA: $\text{cor}=-0,777$, $\text{p-valor}=0,223$), lo que podría ser debido al bajo tamaño muestral de algunos de los grupos.

Como se ilustra en la **Figura 15**, los perfiles del microambiente endometrial relacionados significativamente con la consecución de un embarazo a término en las poblaciones 1 (**Figura 15A**) y 2 (**Figura 15B**) presentan similitudes y diferencias.

A) Población 1



B) Población 2

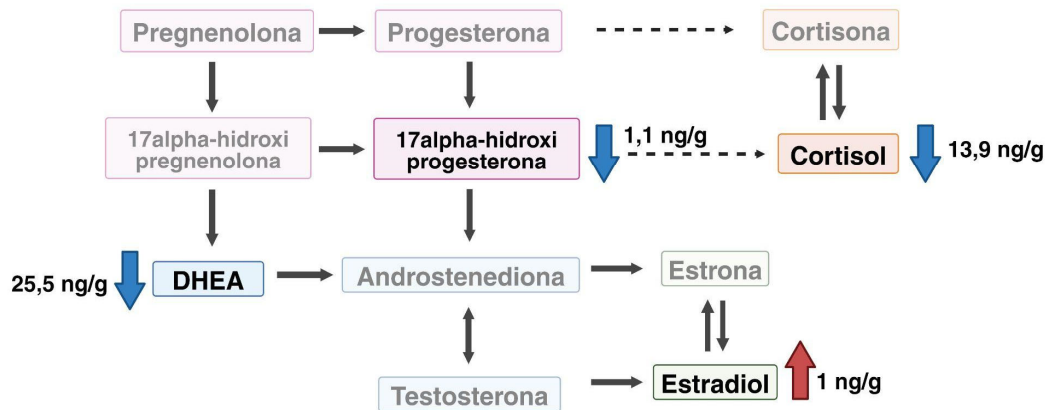


Figura 15. Los estrógenos, andrógenos y corticosteroides en el microambiente endometrial juegan un papel clave para la consecución de un embarazo a término. La figura representa una versión reducida de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas para **A) población 1** y **B) población 2**. En ambas, se destacan aquellos metabolitos del microambiente endometrial significativamente relacionados con un aumento de las probabilidades de lograr un embarazo a término. Las flechas azules indican que el metabolito se encuentra disminuido en aquellas pacientes que lograron un embarazo a término, mientras que las flechas rojas significan que se encuentra aumentado. Junto a las flechas, se indica el punto de corte para cada metabolito en el cual se ha observado la diferencia significativa. Las líneas discontinuas reflejan la presencia de un paso intermedio entre ambos metabolitos. DHEA: dehidroepiandrosterona.

Por un lado, en ambos perfiles se destaca la necesidad de unos niveles bajos de andrógenos, como A4 y DHEA, para lograr un resultado satisfactorio tras la transferencia embrionaria (Figura 15). En endometrio, la DHEA, la cual se considera un andrógeno débil, es el principal responsable de la creación de su propio ambiente androgénico y estrogénico, ya que puede convertirse en ambos gracias a la expresión de dichas enzimas en tejido endometrial (Labrie *et al.*, 2017). Por tanto, la estricta regulación de sus niveles y su tasa de conversión es esencial para asegurar el buen funcionamiento endometrial. La comunidad científica ha analizado extensamente a lo largo de los años el papel de esta hormona durante el proceso de implantación y la consecución del embarazo. Diversos estudios han reportado el efecto

positivo de la suplementación con DHEA, logrando un aumento de las tasas de implantación y embarazo (Fusi *et al.*, 2013; Chern *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2023), y un aumento de los niveles de expresión de HOXA-10 (*Homeobox A10*) (Çelik *et al.*, 2017) en pacientes con baja respuesta ovárica, así como una disminución de las tasas de aborto en pacientes con bajos niveles de E2 en suero durante el embarazo (Boyle *et al.*, 2023). Además, estudios *in vitro* han demostrado un aumento de la decidualización de fibroblastos de mujeres de edad avanzada tras suplementación con DHEA (Gibson *et al.*, 2018). Sin embargo, en nuestro estudio, reportamos un aumento de las tasas de embarazo en aquellas pacientes con niveles endometriales de DHEA <25,5 ng/g. Las diferencias en estos resultados pueden deberse a varias razones. Por un lado, los resultados de nuestro estudio se han obtenido al analizar el subgrupo de pacientes en cuya preparación endometrial se había empleado un ciclo THS, mientras que en los estudios citados se emplean diferentes pacientes en diferentes tipos de preparación endometrial. Por otro lado, en dichos estudios se está evaluando el efecto de la suplementación con DHEA en pacientes de determinadas condiciones, como son mujeres con baja respuesta ovárica o edad avanzada. Labrie y colaboradores reportaron un descenso de hasta un 60% en los niveles de DHEA a partir de la menopausia (Labrie *et al.*, 2017). Por lo tanto, puede ser que dichas pacientes se beneficien de la suplementación con DHEA debido a que sus niveles basales de esta hormona sean mucho más bajos de lo recomendado para la consecución de un embarazo. De hecho, en dichos estudios no se está evaluando realmente la concentración de DHEA, si no la suplementación con DHEA, pero no se conoce si el beneficio que se está reportando es debido a la DHEA en sí o a su conversión en andrógenos y/o estrógenos, y son estos últimos los que realmente aportan el beneficio. Nuestro estudio es el primero en evaluar los niveles de DHEA directamente en tejido endometrial y correlacionarlos con los resultados reproductivos, evidenciando que se requiere de la presencia de este precursor en endometrio, pero que sus concentraciones se encuentren dentro de unos límites. De hecho, en nuestro estudio también reportamos la necesidad de unos niveles bajos de A4, andrógeno directamente producido a partir de la DHEA, para la consecución de un embarazo. Ampliamente conocido es el efecto negativo de unos niveles elevados de andrógenos, los cuales se han reportado en endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (Giudice, 2006; Shang *et al.*, 2012) y de mujeres con endometriosis (Huhtinen *et al.*, 2014), y que podrían estar alterando el microambiente endometrial haciendo que éste sea menos favorable para la implantación (Yusuf *et al.*, 2023), dados los efectos negativos que posee la A4 sobre las células endometriales, reduciendo la proliferación celular y la actividad secretora y aumentando la apoptosis (Tuckerman *et al.*, 2000; Park and Han, 2013). Nuestros resultados destacan la necesidad de un adecuado control en la producción intracrinológica de andrógenos para la implantación y la consecución de un embarazo a término no sólo en mujeres con patologías, si no también en mujeres sanas.

En relación con estos resultados, en la población 1 también observamos que los niveles altos de E1 son favorables para el embarazo (**Figura 15A**). Este es el primer estudio en reportar que los niveles de E1 y A4 en el microambiente endometrial están asociados al éxito reproductivo (**Figura 15A**). Estudios previos ya habían reportado la expresión de la aromatasa (CYP19A1) a nivel endometrial (Konings *et al.*, 2018), siendo la conversión de A4 en E1 mediada por esta enzima una de las principales vías para la creación del ambiente estrogénico endometrial (Gibson *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren que aquellas mujeres que no logran un embarazo a término podrían presentar deficiencias en la expresión de esta enzima, llevando a la acumulación de A4 dada su no conversión a E1. Diversos autores han evaluado el uso del inhibidor de la aromatasa para aumentar las tasas de embarazo en aquellos grupos de pacientes con alteraciones en la síntesis de andrógenos y/o estrógenos, y mientras que algunos estudios reportan tasas de embarazo y recién nacido vivo similares (Miller *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2023), otros reportan aumentos en las tasas de aborto (Tiboni *et al.*, 2008). Por tanto, se requiere de estudios adicionales que evalúen si la expresión de la aromatasa endometrial podría ser una de las causas de las diferencias en los niveles de esteroides en el microambiente endometrial que llevan a una reducción del éxito reproductivo.

Por otro lado, en la población 2, también se muestra la necesidad de unos valores bajos de cortisol para lograr un embarazo a término (**Figura 15B**). Esta hormona ha sido ampliamente evaluada en el ámbito reproductivo por su relación directa con el estrés, habiéndose observado una relación entre sus niveles en suero y pelo y una reducción de las tasas de embarazo en algunos estudios (An *et al.*, 2013; Massey *et al.*, 2016), mientras que en otros no se ha encontrado dicha relación (Lynch *et al.*, 2014; Cesta *et al.*, 2018). Sin embargo, su estudio en el microambiente endometrial es limitado, siendo éste el primer estudio en reportar un acusado incremento en el riesgo de no lograr un embarazo a término en aquellas pacientes con niveles endometriales altos de cortisol.

Finalmente, en ambas poblaciones observamos la importancia de los niveles de E2 en el microambiente endometrial (**Figura 15**). El estudio del E2 en relación con la implantación y el embarazo a lo largo de los años ha sido amplio. Sin embargo, a pesar de la importancia de los estrógenos en el control del ciclo menstrual y adecuado desarrollo endometrial, existen controversias acerca de cómo los niveles de E2, antes de la transferencia embrionaria o durante el embarazo, afectan a los resultados reproductivos. Mientras que algunos estudios apuntan hacia un incremento de las tasas de aborto o un descenso de las tasas de embarazo con un aumento de los niveles de E2 en suero (Steward *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2022; Chen, 2023), otros no observan diferencias (Özdemir *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2023) o incluso evidencian un peor pronóstico reproductivo con niveles bajos de este metabolito en suero

(Zhang *et al.*, 2021). Dada la no correlación entre los niveles de E2 en suero y endometrio (Huhtinen *et al.*, 2012, 2014), los resultados a nivel endometrial, que afectarían de forma directa a la implantación y el embarazo, podrían no coincidir con los reportados en suero, siendo este el primer estudio en evidenciar esta relación. Sin embargo, nos encontramos con una contradicción en cuanto a los requerimientos de niveles de E2 entre ambas poblaciones; mientras que en la población 1 concentraciones de E2 <1.15 ng/g favorecen el embarazo (**Figura 15A**), en la población 2 encontramos que son precisamente las concentraciones de E2 >1 ng/g las que favorecen el embarazo (**Figura 15B**). Estos resultados pueden hacer pensar que los niveles de E2 necesarios para lograr un embarazo a término se encuentran entre ambos valores; es decir, se requeriría de concentraciones endometriales de E2 entre 1 y 1.15 ng/g para potenciar el éxito reproductivo. Ese rango de variación podría estar influenciado por el tipo de preparación endometrial que se lleve a cabo. Igualmente, más estudios son necesarios para confirmar cuáles serían los niveles endometriales adecuados, dada la escasez de literatura disponible al respecto.

A pesar de que ambas poblaciones de pacientes FIV son muy similares en cuanto a sus características, los resultados no se replican de forma completa, evidenciándose asociaciones significativas en una de las poblaciones que no se observan en la otra. La no obtención de asociaciones significativas no es indicativa de que no existan, si no de que la potencia estadística para dicha comparación no es suficiente para obtenerlas dada la variabilidad poblacional presentada. Sin embargo, un tamaño muestral mayor podría permitir que esas relaciones se evidenciaran. Por tanto, podemos resaltar aquellos resultados obtenidos, pero no podemos asegurar que, tras un aumento del tamaño muestral, los resultados en ambas poblaciones no fueran los mismos. También es importante destacar que la preparación endometrial en ambas poblaciones difiere, ya que mientras que en la población 1 la totalidad de las pacientes se encontraban bajo un ciclo THS, lo que aumenta su homogeneidad, en la población 2 algunas de ellas realizaron un ciclo natural, pudiendo ser esta otra causa de las diferencias en los resultados obtenidos, a pesar de no haberse evidenciado un efecto significativo del tipo de preparación endometrial en los niveles endometriales de la mayoría de los metabolitos.

Con todos estos resultados, en ambas poblaciones se evidencia, por primera vez en la literatura científica, el relevante papel de los estrógenos, andrógenos y corticosteroides en el microambiente endometrial para su adecuado funcionamiento. Contrariamente, en un estudio reciente en el que se evaluaron diferentes hormonas esteroideas en endometrio y su relación con las tasas de embarazo no se observaron diferencias significativas entre las pacientes que lograron un embarazo y aquellas que no (Stevens Brentjens *et al.*, 2023). Mientras que en nuestro estudio las pacientes se encuentran mayoritariamente en un ciclo TSH, que minimiza

la variabilidad hormonal entre pacientes, Stevens Brentjens y colaboradores emplean únicamente muestras tomadas en fase lútea de un ciclo natural, lo cual podría explicar las diferencias en los resultados.

4. El cuestionario STAI es un método no invasivo que refleja los cambios fisiológicos endometriales en respuesta al estrés

La población 2 se caracterizó psicológicamente mediante ambas dimensiones del cuestionario STAI, por lo que los resultados recogidos en la totalidad de este apartado van a hacer referencia únicamente a las participantes de dicha población.

De las 84 pacientes reclutadas, 58 completaron la evaluación psicológica de forma satisfactoria. De estas, 23 (39,7%) puntuaron por encima del percentil 60 en la dimensión Estado y fueron caracterizadas como estresadas (**Tabla 8**), mientras que 11 (19%) se clasificaron como estresadas al analizar la dimensión Rasgo (**Tabla 9**), y tan sólo 7 (12,1%) puntuaron por encima del percentil 60 para ambos tests. Por ende, en nuestra población y para ambas dimensiones del cuestionario, encontramos una mayor proporción de pacientes no estresadas (87,9%). La incidencia de la ansiedad y el estrés en nuestra población se encuentra en el límite inferior de lo reportado en otros estudios anteriores, en los que se habla de incidencias que varían entre un 25% y un 65% en mujeres infértiles sometidas a TRA (Guerra, 2002; Nagórska *et al.*, 2021). Aunque esta incidencia no es elevada, nuestro estudio confirma que sí que existe un porcentaje de pacientes que están estresadas y que podrían ver aumentadas sus tasas de éxito en los tratamientos siguiendo un abordaje psicológico adecuado y personalizado. Es importante también destacar que, del 11,9% de las pacientes que abandonaron el tratamiento en esta población, un 40% lo hizo antes incluso de realizar la evaluación psicológica, un 30% presentó puntuaciones superiores a 60 en el cuestionario psicológico y un 30% presentó puntuaciones muy cercanas a 60, aunque inferiores. Diversos estudios han reportado que una de las principales razones por la cual las pacientes abandonan los tratamientos es el factor psicológico, incluyendo depresión, ansiedad y estrés (Gameiro *et al.*, 2012). La identificación temprana de las pacientes con riesgo de abandono del tratamiento por causas psicológicas permitiría la aplicación de tratamientos preventivos y la reducción de las tasas de abandono en los tratamientos.

En las **Tablas 8 y 9** se puede apreciar la uniformidad de los grupos resultantes de la caracterización psicológica para las dimensiones Estado y Rasgo, respectivamente, no

evidenciándose diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas que puedan sesgar los resultados.

Tabla 8. Influencia de variables demográficas y variables clínicas en la caracterización psicológica por el test STAI dimensión Estado.

Variable	N (%)	Estresada (n=23, 39,7%)	No estresada (n=35, 60,3%)	p-valor
Edad (años)	58 (100%)	<35 = 3 (13%) [35,40] = 8 (34,8%) >40 = 12 (52,2%)	<35 = 4 (11,4%) [35,40] = 10 (28,6%) >40 = 21 (60%)	0,865
IMC (kg/m ²)	58 (100%)	<22 = 8 (34,8%) [22,25] = 10 (43,5%) >25 = 5 (21,7%)	<22 = 17 (48,6%) [22,25] = 10 (28,6%) >25 = 8 (22,9%)	0,456
LE (mm)	40 (69%)	[6,9] = 13 (72,2%) >9 = 5 (27,8%)	[6,9] = 13 (59,1%) >9 = 9 (40,9%)	0,510
Tipo de infertilidad	58 (100%)	Primaria = 17 (73,9%) Secundaria = 6 (26,1%)	Primaria = 21 (60%) Secundaria = 14 (40%)	0,398
Tipo de ciclo biopsia	58 (100%)	Natural = 5 (21,7%) Sustituido = 18 (78,3%)	Natural = 11 (31,4%) Sustituido = 24 (68,6%)	0,552
Tipo de ciclo transferencia	52 (89,7%)	Estimulado = 1 (5%) Natural = 3 (15%) Sustituido = 16 (80%)	Estimulado = 1 (3,1%) Natural = 5 (15,6%) Sustituido = 26 (81,2%)	1,000
Calidad embrión	52 (89,7%)	ECB = 18 (90%) ECI = 2 (10%)	ECB = 28 (87,5%) ECI = 4 (12,5%)	1,000
Estado embrión	52 (89,7%)	Congelado = 15 (75%) Fresco = 5 (25%)	Congelado = 20 (62,5%) Fresco = 12 (37,5%)	0,383
Resultado reproductivo	52 (89,7%)	ET = 12 (60%) ENT = 8 (40%)	ET = 22 (68,8%) ENT = 10 (31,2%)	0,561

Para cada variable, se indica el número de pacientes con información disponible para dicha variable y el porcentaje que representan en la totalidad de la población, así como el p-valor obtenido en el test de Fisher para cada comparación. ECB: embriones de buena calidad; ECI: embriones de calidad incierta; ENT: embarazo no a término; ET: embarazo a término; IMC: índice de masa corporal; LE: grosor de la línea endometrial.

Tabla 9. Influencia de variables demográficas y variables clínicas en la caracterización psicológica por el test STAI dimensión Rasgo.

Variable	N (%)	Estresada (n=11, 19%)	No estresada (n=47, 81%)	p-valor
Edad (años)	58 (100%)	<35 = 2 (18,2%) [35,40] = 2 (18,2%) >40 = 7 (63,6%)	<35 = 5 (10,6%) [35,40] = 16 (34%) >40 = 26 (55,3%)	0,511
IMC (kg/m ²)	58 (100%)	<22 = 3 (27,3%) [22,25] = 5 (45,5%) >25 = 3 (27,3%)	<22 = 22 (46,8%) [22,25] = 15 (31,9%) >25 = 10 (21,3%)	0,481
LE (mm)	40 (69%)	[6,9] = 5 (71,4%) >9 = 2 (28,6%)	[6,9] = 21 (63,6%) >9 = 12 (36,4%)	1,000
Tipo de infertilidad	58 (100%)	Primaria = 7 (63,6%) Secundaria = 4 (36,4%)	Primaria = 31 (66%) Secundaria = 16 (34%)	1,000
Tipo de ciclo biopsia	58 (100%)	Natural = 3 (27,3%) Sustituido = 8 (72,7%)	Natural = 13 (27,7%) Sustituido = 34 (72,3%)	1,000

Variable	N (%)	Estresada (n=11, 19%)	No estresada (n=47, 81%)	p-valor
Tipo de ciclo transferencia	52 (89,7%)	Estimulado = 0 (0%) Natural = 0 (0%) Sustituido = 10 (100%)	Estimulado = 2 (4,8%) Natural = 8 (19%) Sustituido = 32 (76,2%)	0,255
Calidad embrión	52 (89,7%)	EBC = 9 (90%) ECI = 1 (10%)	EBC = 37 (88,1%) ECI = 5 (11,9%)	1,000
Estado embrión	52 (89,7%)	Congelado = 6 (60%) Fresco = 4 (40%)	Congelado = 29 (69%) Fresco = 13 (31%)	0,711
Resultado reproductivo	52 (89,7%)	ET = 8 (80%) ENT = 2 (20%)	ET = 26 (61,9%) ENT = 16 (38,1%)	0,462

Para cada variable, se indica el número de pacientes con información disponible para dicha variable y el porcentaje que representan en la totalidad de la población, así como el p-valor obtenido en el test de Fisher para cada comparación. EBC: embriones de buena calidad; ECI: embriones de calidad incierta; ENT: embarazo no a término; ET: embarazo a término; IMC: índice de masa corporal; LE: grosor de la línea endometrial.

Esta población comprende dos tipos de protocolos de preparación endometrial previa a la toma de la biopsia, por lo que se evaluó si, para las pacientes a incluir en este análisis (aquellas con evaluación psicológica disponible y valor detectable para cada uno de los metabolitos, n=58), existía influencia del protocolo de preparación endometrial sobre la concentración de hormonas esteroideas en el microambiente endometrial. Las concentraciones de progesterona eran mayores en pacientes bajo un ciclo de THS (58,60 µg/g) en comparación con aquellas en ciclo natural (0,30 µg/g) (p-valor=1,494e-8), y los niveles de DHEA mayores en las pacientes en ciclo natural (43,89 ng/g vs 32,75 ng/g, p-valor=0,036) (**Tabla 10**). Por tanto, y para ambas dimensiones del test STAI, los análisis posteriores se realizaron considerando a las pacientes de ambos tipos de preparación endometrial por separado para ambos metabolitos.

Tabla 10. Influencia del tipo de preparación endometrial previa a la toma de la biopsia en la concentración de hormonas esteroideas en tejido endometrial para los análisis relativos a la caracterización psicológica.

Metabolito	N (%)	Ciclo natural (n=16, 27,6%)	Ciclo sustituido (n=42, 72,4%)	p-valor
P4 (µg/g)	55 (94,8%)	0,048 (0,015-1,31)	12,37 (0,087-627,95)	1,494e-8***
E1 (ng/g)	58 (100%)	37,05 (26-336)	43 (31-143)	0,095
E2 (ng/g)	34 (58,6%)	0,70 (0,40-2,80)	1,70 (0,20-36,50)	0,318
A4 (ng/g)	50 (86,2%)	0,50 (0,40-2,20)	0,35 (0,10-97,30)	0,317
T (ng/g)	48 (82,8%)	0,40 (0,10-0,90)	0,30 (0,10-2,20)	0,539
DHEA (ng/g)	58 (100%)	31,55 (17,80-152)	22,95 (9,10-153)	0,036*
17OHP4 (ng/g)	42 (72,4%)	1,10 (0,30-7,30)	0,95 (0,20-26,90)	0,944
Cortisona (ng/g)	58 (100%)	63,50 (16-142)	73 (12-171)	0,787
Cortisol (ng/g)	57 (98,3%)	5,20 (1,90-30,90)	3,20 (0,80-26,70)	0,079

Para cada metabolito, se indica el número de pacientes en los que se ha detectado dicho metabolito y el porcentaje que representan con respecto al total de pacientes con caracterización psicológica y valor detectable para los metabolitos endometriales, así como la mediana y el rango (mínimo-máximo) para cada uno de ellos en cada tipo de preparación endometrial y el p-valor obtenido en el test de Wilcoxon para cada comparación. Se destaca en **negrita** los resultados estadísticamente significativos, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; E1: estrona; E2: estradiol; DHEA: dehidroepiandrosterona; P4: progesterona; T: testosterona.

El estrés puntual o agudo altera las concentraciones endometriales de cortisol y estrógenos

Al realizar una comparación de medianas entre los grupos de pacientes estresadas o no estresadas según la dimensión Estado (**Tabla 11**), se observaron unos niveles endometriales de cortisol, biomarcador por excelencia del estrés, significativamente mayores en aquellas pacientes estresadas en comparación con aquellas no estresadas (5,4 ng/g vs 3,45 ng/g, p-valor=0,05), además de unos niveles significativamente mayores de E1 endometrial en aquellas pacientes estresadas (47 ng/g vs 39 ng/g, p-valor=0,0486) (**Tabla 11**).

Tabla 11. El estrés agudo (determinado por las puntuaciones de STAI Estado) provoca aumentos en las concentraciones endometriales de cortisol y estrona.

Metabolito	N (%)	Estresada (n=23, 39,7%)	No estresada (n=35, 60,3%)	p-valor
P4 (µg/g)	Nat = 13 (22,4%)	0,07 (0,02-0,40)	0,04 (0,02-1,30)	0,943
	THS = 42 (72,4%)	10,81 (0,09-628)	12,37 (0,10-274,10)	0,930
E1 (ng/g)	58 (100%)	47 (31-143)	39 (26-336)	0,049*
E2 (ng/g)	34 (58,6%)	0,90 (0,40-2,30)	1,70 (0,20-36,50)	0,220
A4 (ng/g)	50 (86,2%)	0,45 (0,10-97,30)	0,50 (0,10-6,80)	1,000
T (ng/g)	48 (82,8%)	0,30 (0,10-0,80)	0,30 (0,10-2,20)	0,633
DHEA (ng/g)	Nat = 16 (27,6%)	31,10 (21-42,30)	34 (17,80-152)	0,495
	THS = 42 (72,4%)	27 (9,40-153)	21 (9,10-94)	0,104
17OHP4 (ng/g)	42 (72,4%)	1,10 (0,20-26,90)	1,05 (0,20-7,30)	0,453
Cortisona (ng/g)	58 (100%)	66 (12-160)	74 (16-171)	0,962
Cortisol (ng/g)	57 (98,3%)	5,40 (1,10-26,70)	3,45 (0,80-30,90)	0,050*

Para cada metabolito, se indica el número de pacientes en los que se ha detectado dicho metabolito y el porcentaje que representan en la totalidad de pacientes caracterizadas psicológicamente, así como la mediana y el rango (mínimo-máximo) para cada uno de ellos en cada grupo y el p-valor obtenido en el test de Wilcoxon para cada comparación. Para aquellos metabolitos afectados por el tipo de preparación endometrial (Tabla 10), los resultados se muestran de forma independiente para cada tipo de ciclo. Se destaca en **negrita** los resultados estadísticamente significativos, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0,05$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; Nat: ciclo natural; T: testosterona; THS: terapia hormonal sustitutiva; P4: progesterona.

Posteriormente, se compararon las proporciones de pacientes estresadas con respecto a las concentraciones de los metabolitos aplicando el test de Barnard. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla Suplementaria 4**. Específicamente, en la **Figura 16** observamos cómo el 80% de las pacientes con concentraciones endometriales de cortisol $\leq 2,5$ ng/g (n=12) no estaban estresadas, mientras que el 80% de las pacientes con concentraciones $>12,6$ ng/g (n=4) sí lo estaban (p-valor=0,038 para ambas comparaciones); es decir, la proporción de pacientes estresadas era mayor cuanto mayor era la concentración de cortisol. De hecho, aquellas pacientes clasificadas como estresadas según el test STAI Estado presentaban un 491% mayor riesgo de tener el cortisol alto en el microambiente endometrial (p-valor=0,05). Por otro lado, el 86,7% de las pacientes con niveles de E1 en el microambiente endometrial $\leq 35,6$ ng/g (n=13) y el 72,4% de las pacientes con concentraciones $\leq 41,7$ ng/g (n=21) no estaban estresadas, siendo por tanto mayor la proporción de pacientes no estresadas entre las concentraciones más bajas de E1 (p-valor=0,011 y 0,035, respectivamente). Además, la mayor proporción de pacientes no estresadas (88,9%, n=8) se observó cuando las concentraciones de E2 fueron >2 ng/g (p-valor=0,036) (**Figura 16**).

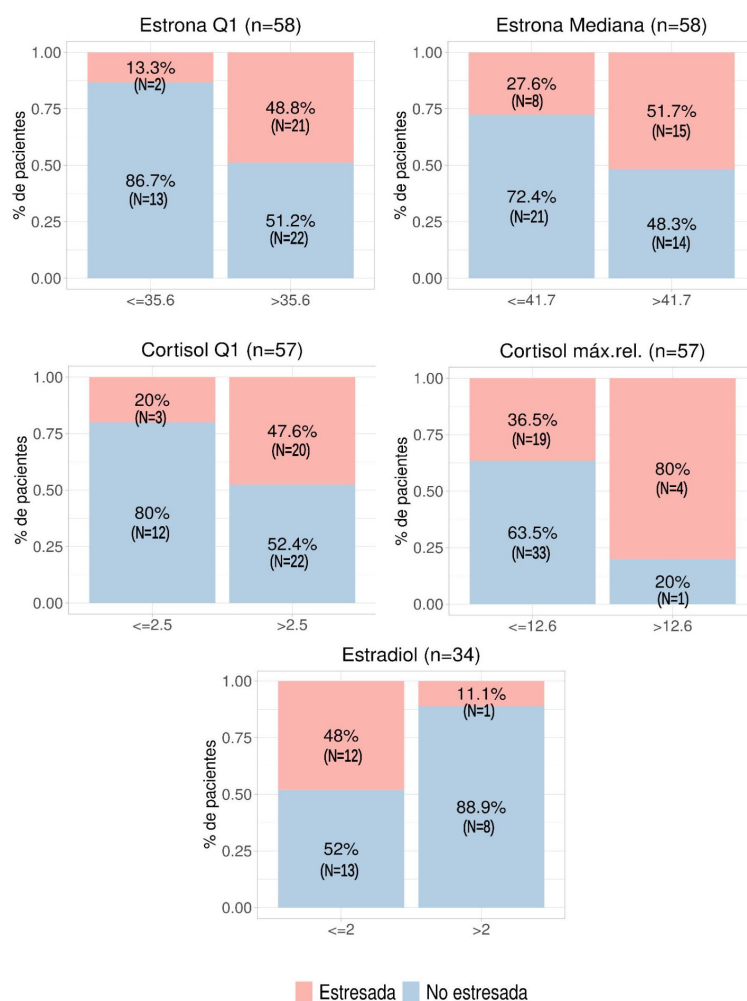


Figura 16. El estrés agudo (evaluado con las puntuaciones de STAI Estado) afecta a las concentraciones de cortisol y estrógenos. Los gráficos de barras representan las relaciones significativas

recogidas en la Tabla Suplementaria 4 para estrona (Q1 y mediana), cortisol (Q1 y máximo relativo), y estradiol (Q3). Las barras azules se corresponden con la proporción de pacientes no estresadas mientras que las barras rosas con las estresadas.

El análisis de correlación entre los niveles endometriales de las hormonas y las puntuaciones del cuestionario STAI Estado evidenció una correlación positiva y significativa con los niveles de cortisol ($\text{cor}=0,977$, $\text{p-valor}=0,023$) y una correlación negativa y significativa con los niveles de E2 ($\text{cor}=-0,995$, $\text{p-valor}=0,006$). Además, también se observó una correlación positiva, aunque no significativa, con las concentraciones de E1 ($\text{cor}=0,874$, $\text{p-valor}=0,126$), es decir, un aumento de la proporción de pacientes estresadas con aumentos en la concentración de E1, o lo que es lo mismo, menores niveles de E1 en aquellas pacientes no estresadas (**Figura 17**). Dada esta fuerte asociación, esta tesis propone, por primera vez en la literatura científica, que la evaluación de las pacientes mediante el cuestionario STAI podría servir como una herramienta no invasiva que reflejase los cambios fisiológicos que tienen lugar en el endometrio frente a una situación de estrés, los cuales se encuentran íntimamente relacionados con las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

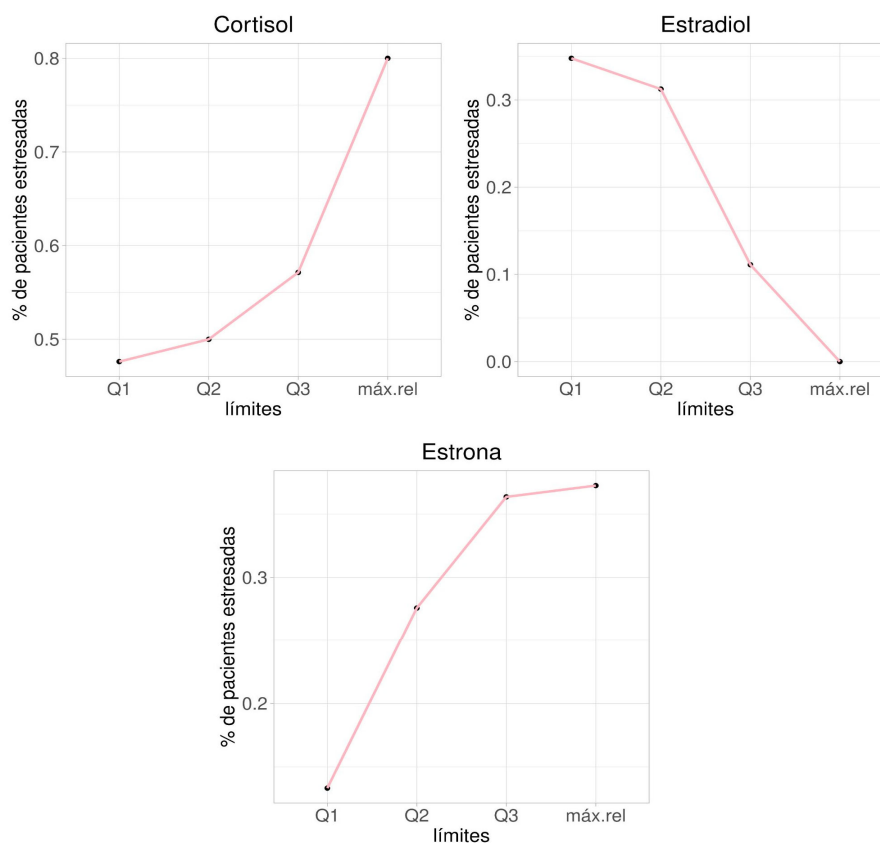


Figura 17. Las puntuaciones del cuestionario STAI Estado están altamente correlacionadas con los niveles de cortisol, estradiol y estrona en el microambiente endometrial. Los gráficos representan la tendencia de la proporción de pacientes estresadas según la dimensión Estado del cuestionario STAI en cada uno de los puntos de corte de los metabolitos.

El estrés prolongado afecta a las concentraciones endometriales de estrona y DHEA

Atendiendo a la caracterización psicológica por la dimensión Rasgo, se observaron diferencias significativas en los niveles endometriales de DHEA en aquellas pacientes que siguieron un ciclo natural en su preparación endometrial, siendo significativamente mayores en las pacientes no estresadas (34 ng/g vs 25 ng/g, p-valor=0,043). Se observaron también mayores concentraciones endometriales de E1 en aquellas pacientes no estresadas (43 ng/g vs. 38 ng/g, p-valor=0,050) (**Tabla 12**).

Tabla 12. El estrés prolongado (determinado por las puntuaciones de STAI Rasgo) provoca disminuciones en las concentraciones endometriales de estrona y DHEA.

Metabolito	N (%)	Estresada (n=11, 19%)	No estresada (n=47, 81%)	p-valor
P4 (µg/g)	Nat = 13 (22,4%)	0,04 (0,01-0,08)	0,06 (0,02-1,30)	0,573
	THS = 42 (72,4%)	4,39 (0,09-53,40)	12,97 (0,40-628)	0,148
E1 (ng/g)	58 (100%)	38 (26-47)	43 (27-336)	0,050*
E2 (ng/g)	34 (58,6%)	1,80 (0,40-2,10)	0,95 (0,20-36,50)	0,748
A4 (ng/g)	50 (86,2%)	0,30 (0,10-0,90)	0,50 (0,10-97,30)	0,056
T (ng/g)	48 (82,8%)	0,30 (0,10-0,50)	0,30 (0,10-2,20)	0,652
DHEA (ng/g)	Nat = 16 (27,6%)	25 (21-26)	34 (17,80-152)	0,043*
	THS = 42 (72,4%)	22,50 (14,80-28)	22,95 (9,10-153)	0,344
17OHP4 (ng/g)	42 (72,4%)	0,85 (0,20-1,90)	1,20 (0,20-26,90)	0,453
Cortisona (ng/g)	58 (100%)	79 (21-113)	72 (12-171)	0,513
Cortisol (ng/g)	57 (98,3%)	3 (1,10-20,30)	4,70 (0,80-30,90)	0,944

Para cada metabolito, se indica el número de pacientes en los que se ha detectado dicho metabolito y el porcentaje que representan en la totalidad de pacientes caracterizadas psicológicamente, así como la mediana y el rango (mínimo-máximo) para cada uno de ellos en cada grupo y el p-valor obtenido en el test de Wilcoxon para cada comparación. Para aquellos metabolitos afectados por el tipo de preparación endometrial (Tabla 10), los resultados se muestran de forma independiente para cada tipo de ciclo. Se destaca en **negrita** los resultados estadísticamente significativos, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (*p≤ 0,05). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; Nat: ciclo natural; T: testosterona; THS: terapia hormonal sustitutiva; P4: progesterona.

La diferencia de concentraciones observada para la DHEA fue corroborada tras realizar el test de Barnard, no así para la E1. Los resultados de estos y otros metabolitos se recogen en la **Tabla Suplementaria 5**. Concretamente, como muestra la **Figura 18**, el 100% de las pacientes con concentraciones endometriales de DHEA >26 ng/g (n=10) no estaban estresadas, en comparación con aquellas pacientes con valores de DHEA ≤26 ng/g, el 50% de las cuales (n=3) se clasificaron como estresadas según las puntuaciones de la dimensión Rasgo (p-valor=0,013).

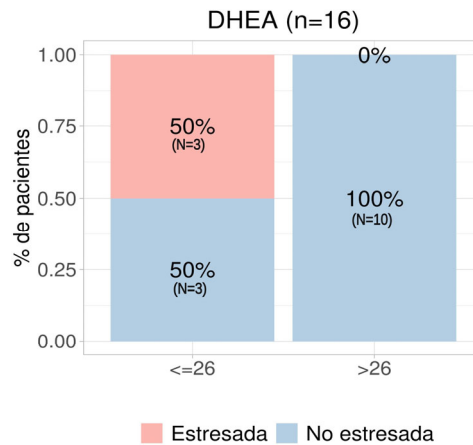


Figura 18. El estrés prolongado (evaluado con las puntuaciones de STAI Rasgo) afecta a las concentraciones de DHEA. El gráfico de barras representa la relación significativa recogida en la Tabla Suplementaria 5 para DHEA. Las barras azules se corresponden con la proporción de pacientes no estresadas mientras que las barras rosas con las estresadas.

El análisis de correlación entre los niveles endometriales de las hormonas y el estrés evidenció una fuerte correlación negativa, aunque no significativa, con los niveles de E1 ($\text{cor} = -0,909$, $\text{p-valor} = 0,091$), concordando con los resultados obtenidos en los que se evidenciaban mayores niveles de E1 en aquellas pacientes no estresadas.

Cada tipo de estrés afecta mayoritariamente a una región diferente de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas

En los últimos años, el estudio del efecto del estrés psicológico en la función reproductiva ha aumentado. Diversos estudios han evaluado el efecto del estrés en la concentración de biomarcadores clásicos y su repercusión en las tasas de embarazo (Ebbesen *et al.*, 2009; An *et al.*, 2013; Massey *et al.*, 2016; Aimagambetova *et al.*, 2020). También se han desarrollado estudios que han evaluado cambios moleculares directos en el endometrio que podrían ser consecuencia del estrés (Wu *et al.*, 2021). Sin embargo, a día de hoy ningún estudio se ha centrado en evaluar los cambios en la concentración de hormonas en el microambiente endometrial normal como consecuencia del estrés. Un único estudio similar ha sido llevado a cabo recientemente en lesiones endometrióticas, evidenciando alteraciones en metabolitos como arginina o serina entre pacientes estresadas y no estresadas (Lu *et al.*, 2023). En nuestro estudio, evidenciamos por primera vez que el estrés en pacientes FIV, evaluado mediante el cuestionario STAI, produce alteraciones en el microambiente endometrial. En la **Figura 19** se recoge un resumen de aquellos metabolitos endometriales significativamente asociados con el estrés y su comparación entre ambos tipos de estrés, el estrés agudo y el estrés a largo plazo, definidos por las puntuaciones de los cuestionarios STAI Estado y Rasgo, respectivamente.

O diagrama ilustra o eixo HPA, mostrando a síntese de hormônios e os níveis de cortisol e estradiol. A síntese começa com a Pregnenolona, que é convertida em Progesterona. A Progesterona pode ser convertida em Cortisona ou em 17alpha-hidroxi progesterona. A 17alpha-hidroxi progesterona pode ser convertida em Cortisol ou em Androstenediona. A Androstenediona pode ser convertida em Testosterona ou em Estrona. A Estrona pode ser convertida em Estradiol. Os níveis de cortisol e estradiol são mostrados com setas indicando a direção da mudança.

```

graph TD
    Pregnenolona --> Progesterona
    Progesterona -.-> Cortisona
    Progesterona --> 17alpha_hidroxi_progesterona[17alpha-hidroxi progesterona]
    17alpha_hidroxi_progesterona -.-> Cortisol
    17alpha_hidroxi_progesterona --> Androstenediona
    Androstenediona --> Estrona
    Androstenediona <--> Testosterona
    Estrona <--> Estradiol
    Cortisol --> Cortisol_Level[2,5 ng/g  
12,6 ng/g]
    Estradiol --> Estradiol_Level[2 ng/g]
    Cortisol_Level --> Cortisol_Level
    Estradiol_Level --> Estradiol_Level
  
```

Os níveis de cortisol e estradiol são mostrados com setas indicando a direção da mudança:

- Cortisol: 2,5 ng/g (seta vermelha apontando para cima) e 12,6 ng/g (seta vermelha apontando para cima).
- Estradiol: 2 ng/g (seta azul apontando para baixo).

```
graph TD; P[Pregnenolona] --> Pr[Progesterona]; P -.-> C[Cortisona]; Pr --> C; Pr --> PhP[17alpha-hidroxi progesterona]; PhP -.-> Co[Cortisol]; P --> PhPn[17alpha-hidroxi pregnenolona]; PhPn --> DHEA[DHEA]; PhP --> And[Androstenediona]; DHEA --> And; And --> E[Estrona]; And --> T[Testosterona]; E --> E2[Estradiol]; T --> E2; DHEA -- 26 ng/g --> DHEA; E --> E2; style DHEA fill:#add8e6; style And fill:#add8e6; style E fill:#add8e6; style T fill:#add8e6; style E2 fill:#add8e6; style P fill:#f0f0f0; style Pr fill:#f0f0f0; style PhPn fill:#f0f0f0; style PhP fill:#f0f0f0; style C fill:#f0f0f0; style Co fill:#f0f0f0;
```

Por un lado, el presente estudio demuestra de forma pionera que los incrementos en los niveles circulantes de cortisol que ocurren como consecuencia de la respuesta fisiológica al estrés (Herman *et al.*, 2016) también se ven reflejados en el microambiente endometrial (**Figura 19A**).

80

produce una desviación de la producción del estrógeno más activo (E2) hacia la producción del estrógeno menos activo (E1). En línea con estos resultados, otros estudios han reportado menores concentraciones de E2 en saliva (Roney and Simmons, 2015) y suero (Schliep *et al.*, 2015), así como de E1 conjugada en orina (Schliep *et al.*, 2015) en mujeres estresadas, incluso una reducción de la síntesis de E2 en células de la granulosa sometidas a estrés (Li *et al.*, 2016; Sammad *et al.*, 2022), evidenciando alteraciones en la función endocrinológica y la producción hormonal, que podrían repercutir directamente en la función reproductiva. Sin embargo, este es el primer estudio que reporta dicho efecto a nivel endometrial.

Además, en aquellas pacientes que sufren de un estrés constante y estable este estudio evidencia una disminución significativa de las concentraciones endometriales del precursor androgénico y estrogénico DHEA (**Figura 19B**). Diversos estudios han evidenciado una mejora en los síntomas depresivos acompañado de un aumento de los niveles plasmáticos de andrógenos tras la administración de suplementos de DHEA (Schmidt *et al.*, 2005; Peixoto *et al.*, 2020). En línea con estos resultados, algunos estudios reportan que los niveles de DHEA en suero son menores en pacientes con depresión (Zhu *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017) o ansiedad (Lennartsson *et al.*, 2013; Leff-Gelman *et al.*, 2020). Sin embargo, otros estudios contradicen estos resultados, ya que reportan que las pacientes con mayor ansiedad o estrés presentan mayores niveles de DHEA en saliva (Mulligan *et al.*, 2020) o suero (Lennartsson *et al.*, 2012). Nuestros resultados demuestran de forma pionera que aquellas pacientes sometidas a estrés prolongado presentan menores concentraciones de DHEA en tejido endometrial. El estrés altera el metabolismo de la pregnenolona adrenal, reduciéndose la producción de andrógenos y aumentándose la de glucocorticoides (Campagne, 2002). De hecho, en pacientes estresadas se ha observado un mayor ratio cortisol/DHEA que en controles (Markopoulou *et al.*, 2009; Leff-Gelman *et al.*, 2020). Además, se ha evidenciado un descenso en las concentraciones de cortisol tras la administración de DHEA (Kroboth *et al.*, 2003). En concordancia con estos estudios hemos reportado, por primera vez en endometrio, un aumento de los niveles de cortisol y un descenso de los de DHEA en pacientes estresadas, demostrando que, en el microambiente endometrial, la sobreproducción de cortisol también va acompañada de una reducción en la producción de DHEA, lo que en consecuencia podría alterar los niveles de andrógenos y estrógenos, esenciales para la consecución y el mantenimiento de un embarazo.

En conjunto, estos resultados evidencian cómo cada tipo de estrés afecta en mayor medida a partes diferentes de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas, alterando el estrés puntual más a los niveles de corticosteroides y estrógenos, y el estrés a largo plazo a los precursores androgénicos. Sin embargo, el no encontrar diferencias significativas en otros metabolitos no significa que no existan, sino que el tamaño muestral y poder estadístico podrían no ser

suficientes para observarlas. Por tanto, no podemos afirmar que cada tipo de estrés afecte exclusivamente a una parte de la ruta, pero sí que cada uno lo hace en mayor medida que el otro.

Dado que estos cuatro metabolitos esteroideos endometriales (cortisol, estrona, estradiol y DHEA) fueron los únicos reportados como tanto significativamente asociados con el estrés como con la consecución de un embarazo a término en el presente estudio, éstos fueron los seleccionados para la realización de los análisis transcriptómicos.

5. Los cambios en los niveles de esteroides endometriales y el estrés afectan a la expresión génica y la función endometrial

La calidad del RNA extraído (n=50, ya que de 29 muestras no quedó suficiente cantidad de tejido para realizar la extracción de RNA), se evaluó atendiendo a los ratios A260/A280 y A260/A230, RIN y DV200, siguiendo los criterios especificados en la sección metodológica. En la mayoría de las muestras, el RNA extraído se encontraba dentro de los rangos de calidad establecidos (A260/280 ~2, A260/A230=1,8-2,2), encontrando ratios ligeramente fuera de los límites en 5 de ellas (10%). Sin embargo, esta alteración no se vió reflejada en un descenso de la integridad del RNA, ya que en todas ellas los valores de RIN y DV200 se encontraban dentro de unos límites adecuados (RIN $\geq$ 3 y DV200 $\geq$ 70%). Una única muestra presentó unos valores de RIN inferiores a los límites marcados (2,7); a pesar de esto, y dado que sus niveles de DV200 eran adecuados (74,63%), se decidió incluir en la generación de librerías y posterior secuenciación, no viéndose reflejado esto en una alteración de los parámetros de secuenciación, dado el buen funcionamiento del protocolo de secuenciación seleccionado con muestras de calidad limitada.

Atendiendo al análisis exploratorio de los datos, el comportamiento transcriptómico de las muestras en el PCA mostró una distinción entre las muestras de las pacientes y los controles positivos empleados en ambas tandas de secuenciación, tal y como se esperaba (**Figura 20A**), así como un comportamiento similar y casi superpuesto entre las réplicas técnicas, demostrando la reproducibilidad de la técnica (**Figura 20B**).

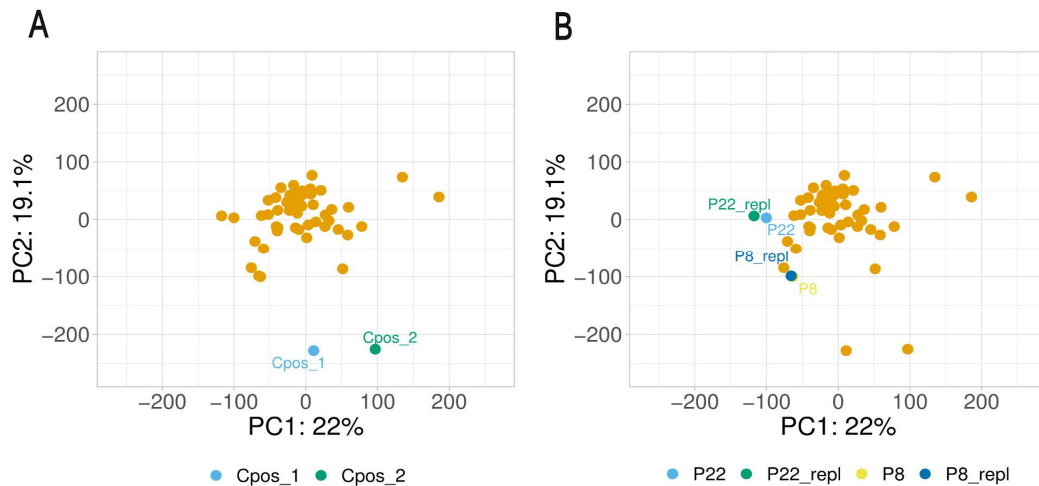


Figura 20. Comportamiento transcriptómico de los controles positivos y las réplicas técnicas empleadas en el protocolo de secuenciación de RNA. A) Gráfico del PCA con las 54 muestras. El PCA incluye los 20.802 genes detectados por el panel empleado y las 54 muestras (incluyendo réplicas técnicas y controles positivos de ambas tandas de secuenciación). Los controles positivos están resaltados en color azul (control positivo tanda 1) y verde (control positivo tanda 2), mientras que el resto de muestras aparecen coloreadas en naranja. **B) Gráfico del PCA posterior a la eliminación de los controles (52 muestras).** Las réplicas técnicas están resaltadas en color azul claro y verde para la muestra P22, y en azul oscuro y amarillo para la muestra P8, mientras que el resto de muestras aparecen coloreadas en naranja. En ambos gráficos, el eje X representa la variabilidad (%) de los datos en la primera componente (PC1) y el eje Y en la segunda componente (PC2).

De los 20.802 genes medidos por el panel de secuenciación seleccionado, 754 fueron eliminados por no ser detectados en ninguna muestra y 4.835 por tener un número bajo de conteos, quedando 15.213 genes para los subsiguientes análisis.

Después del proceso de normalización, se evaluó el efecto que podrían tener variables técnicas y clínicas/demográficas en el comportamiento transcriptómico de las muestras. Se observó en el PVCA (**Figura 21A**) como el RIN aportaba un 10% de la variabilidad total, lo que también se reflejó en el PCA (**Figura 21B**). Este efecto de tanda fue corregido con métodos lineales antes de la realización de los análisis posteriores (**Figura 21B**). Ninguna de las variables restantes produjo un efecto de tanda significativo en el comportamiento transcriptómico de las muestras no requiriendo de su corrección.

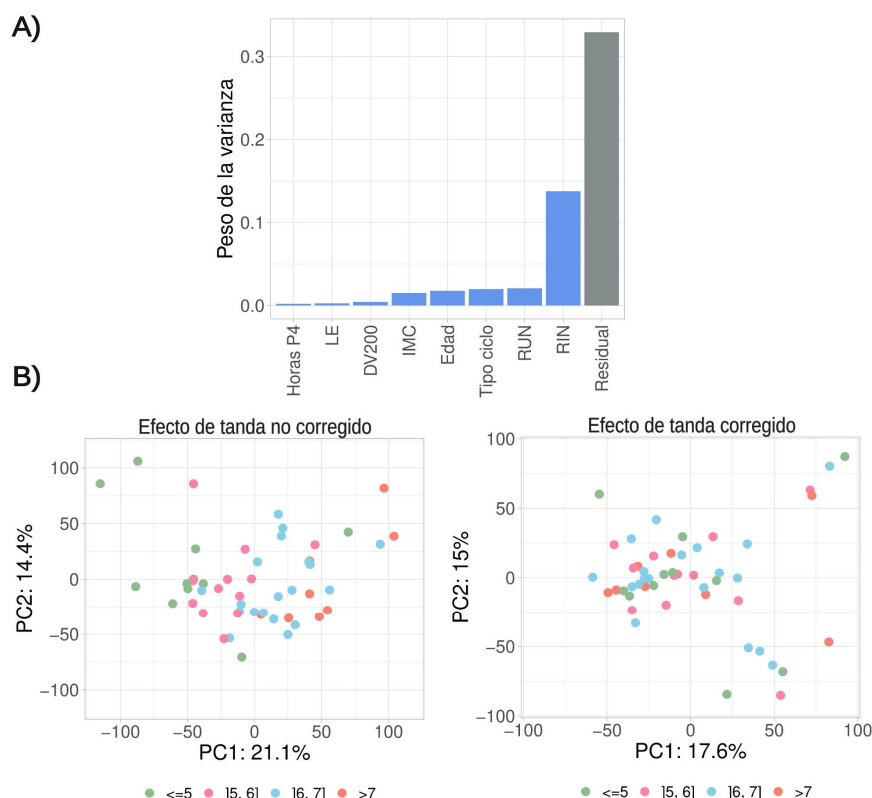


Figura 21. Corrección del efecto del RIN en el comportamiento transcriptómico de las muestras. A) PVCA. En el gráfico de barras se representa el peso que tiene cada una de las variables analizadas en el total de la varianza, evidenciando un efecto del RIN superior al 10%. **B) PCA RIN.** En la izquierda, el gráfico de análisis de componentes principales (PCA) incluyendo las 50 muestras de las pacientes de la población 2 secuenciadas muestra una clara agrupación en función del RIN. En la derecha, el gráfico PCA posterior a la corrección del efecto del RIN en el comportamiento transcriptómico de las muestras muestra cómo efectivamente las muestras ya no se agrupan en función de su valor de RIN. En ambos gráficos, los puntos de color verde representan las muestras con $RIN \leq 5$, los de color rosa entre 5 y 6, los azules entre 6 y 7, y los rojos >7 . El eje X representa la variabilidad (%) de los datos en la primera componente (PC1) y el eje Y en la segunda componente (PC2).

Incrementos en las concentraciones de cortisol en el microambiente endometrial afectan a funciones clave para la implantación embrionaria

De las 50 muestras secuenciadas, 36 tenían información de la concentración de **cortisol** para analizar el efecto de su concentración en la expresión génica endometrial, observando 182 genes (**Tabla suplementaria 6**) que cambiaban significativamente su expresión con incrementos en las concentraciones. Estos genes se encontraban principalmente involucrados en funciones como regulación de la transcripción, señalización y metabolismo (**Figura 22**). Otras funciones a destacar, aunque representadas en menor medida, fueron respuesta inmune, respuesta a estímulos (incluido estrés), apoptosis y adhesión, entre otras (**Figura 22**).

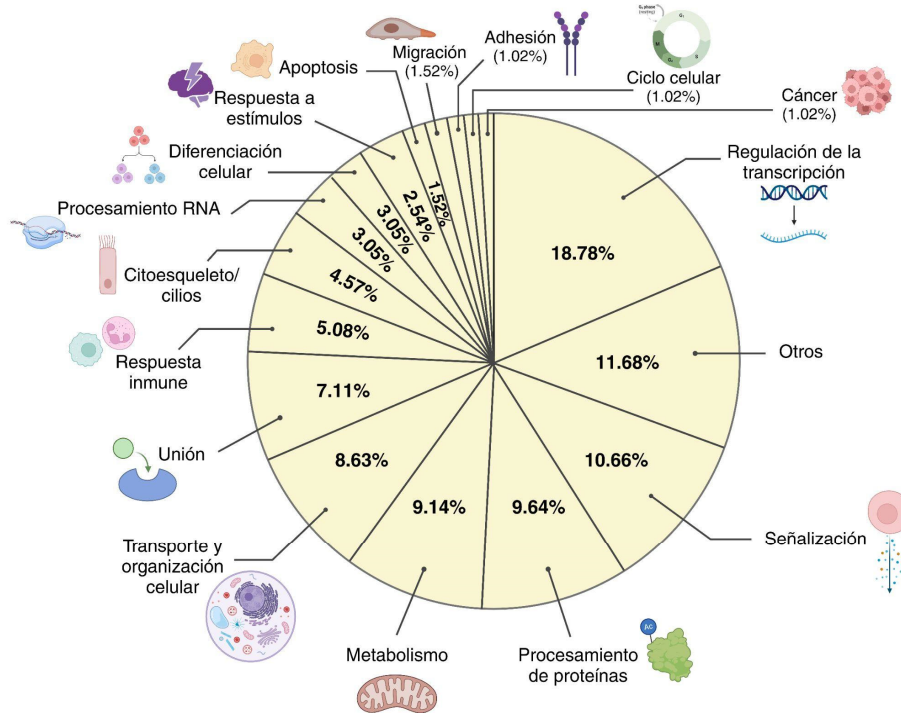


Figura 22. Funciones en las que están implicados los genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de cortisol. Gráfico de sectores o circular (pie chart) en el que se recoge la proporción que representa cada función con respecto al total de funciones anotadas (197 funciones) para los genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de cortisol (182 genes). Figura creada con Biorender.com.

Los genes se agruparon de acuerdo a su comportamiento en dos grupos (**Tabla suplementaria 6**): en el primero, 87 genes aumentaban su expresión conforme aumentaban las concentraciones de cortisol (**Figura 23A**), mientras que en el segundo se agruparon 95 genes cuya expresión disminuía con aumentos en las concentraciones de dicha hormona (**Figura 23B**).

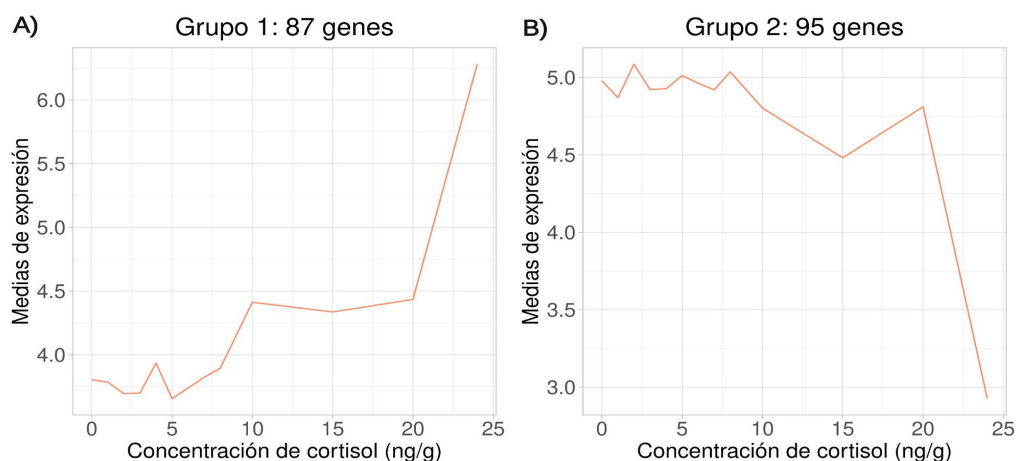


Figura 23. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de cortisol. Grupos de comportamiento génico en función del aumento en las concentraciones de cortisol: **A) Genes que aumentaban su expresión y B) Genes que disminuían su expresión.**

La comparación de las funciones subyacentes a cada grupo mostró que los genes que aumentaban su expresión (grupo 1) se encontraban involucrados de forma exclusiva en la

adhesión, y de forma mayoritaria en apoptosis, respuesta inmune, señalización y transporte y organización celular; por su parte, los genes que disminuían su expresión con aumentos en la concentración de cortisol (grupo 2) regulaban exclusivamente funciones como ciclo celular, diferenciación y migración celular, procesamiento del RNA y respuesta a estímulos, incluyendo la respuesta al estrés. Además, estos genes se encontraban mayoritariamente involucrados en la formación y regulación de cilios y citoesqueleto y regulación de la transcripción.

La apoptosis ha sido ampliamente estudiada por su relación con la implantación y el desarrollo embrionario temprano, a pesar de lo cual los mecanismos moleculares exactos subyacentes a ambos procesos siguen sin comprenderse completamente. Durante la implantación, el embrión invade el endometrio materno para formar una unión fuerte y alcanzar el componente vascular (Massimiani *et al.*, 2019; Ojosnegros *et al.*, 2021). Para que eso ocurra, el epitelio endometrial en el área de implantación, gracias a la apoptosis, se desintegra completamente, mientras que el componente estromal requiere de un control mayor del proceso apoptótico (Boeddeker and Hess, 2015). La apoptosis tiene un papel clave en procesos como la deciduización, invasión, y remodelación de las arterias uterinas y, por tanto, también en el desarrollo embrionario temprano y la comunicación materno-fetal (Chen *et al.*, 2024). Además, diversos estudios han revelado una asociación entre abortos, fallos de implantación y complicaciones gestacionales como la preeclampsia con alteraciones en el control y el equilibrio del proceso apoptótico (apoptosis excesiva o insuficiente) (Boeddeker and Hess, 2015; Chen *et al.*, 2024). En línea con nuestros resultados, Chan y colaboradores evidenciaron un aumento en la apoptosis de cultivos primarios de células deciduales de tercer trimestre tras ser tratadas con cortisol (Chan *et al.*, 2007). Según lo reportado por diversos autores, en un ciclo menstrual normal se producen incrementos en la apoptosis durante la fase secretora tardía, alcanzando su máxima extensión durante la menstruación (Shikone *et al.*, 1997; Vaskivuo *et al.*, 2000). Aunque se requiere de la apoptosis para la implantación y el desarrollo embrionario temprano, una apoptosis exacerbada durante la fase secretora media, fomentada por un aumento en los niveles de cortisol endometriales, podría llevar a la eliminación excesiva de células endometriales epiteliales dificultando así la implantación embrionaria. De hecho, se han reportado aumentos en el número de células apoptóticas en endometrio y una senescencia estromal acelerada en aquellas mujeres con fallos de implantación recurrente y desplazamientos de la ventana de implantación (Meresman *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2016), apoyando esta última hipótesis.

La apoptosis también juega un papel clave en la regulación de la tolerancia inmune materno-fetal, regulando el número de células inmunes deciduales activadas y protegiendo así al embrión del sistema inmune materno (Boeddeker and Hess, 2015; Chen *et al.*, 2024). Las

células inmunes endometriales presentan numerosas funciones, como la coordinación de la invasión del trofoblasto durante la implantación y la remodelación de las arterias, así como la tolerancia al embrión recién implantado a la vez que se asegure la defensa de éste frente a patógenos. Sin embargo, alteraciones en la regulación y el equilibrio inmune se han relacionado con abortos, preeclampsia o embarazo pretérmino, entre otras condiciones (Yang *et al.*, 2023). Los glucocorticoides presentan principalmente propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias. Sin embargo, concentraciones elevadas de cortisol pueden llevar a su acumulación y la sobreproducción de citocinas proinflamatorias que podrían acabar comprometiendo la respuesta inmune (Morey *et al.*, 2015). De hecho, diversos estudios llevados a cabo en animales y humanos han evidenciado que, en respuesta al estrés y el aumento en los niveles generales de cortisol que éste conlleva en todo el organismo, la respuesta inmune se altera, llegando a causar inflamación crónica y desórdenes autoinmunes (Padgett and Glaser, 2003; Shimba and Ikuta, 2020). En concordancia con estos resultados, en esta tesis doctoral, los resultados obtenidos evidencian que, frente a aumentos en los niveles de cortisol, potencialmente causados por aumentos en el estrés en las pacientes infértiles, se produce un aumento de la respuesta inmune endometrial, lo cual podría estar afectando negativamente a la consecución de un embarazo a término. En esta línea, un estudio reciente ha observado diferencias en las poblaciones de células inmunes endometriales entre mujeres sufriendo ansiedad durante el embarazo y aquellas que no la sufrían (Sherer *et al.*, 2022). A pesar de toda esta evidencia, el equilibrio entre los efectos positivos y negativos de los glucocorticoides no está del todo definido. Por tanto, se requiere de más estudios que evalúen algo tan complejo como es el sistema inmune, ya que los efectos del estrés sobre éste van a depender de la individualidad del organismo y de la presencia o ausencia de determinados factores de riesgo, como la edad (Morey *et al.*, 2015).

Por otro lado, coincidiendo con nuestros resultados de una disminución en la expresión de genes que median la migración y diferenciación celular con aumentos en las concentraciones de cortisol, se ha demostrado, en células madre endometriales en cultivo, que el cortisol suprime funciones clave de éstas como la regeneración, diferenciación y migración (Park *et al.*, 2021). Las células madre endometriales, localizadas en la capa basal endometrial, son las principales responsables de la regeneración cíclica del endometrio posterior a la descamación que ocurre durante la menstruación, siendo por tanto cruciales para la adecuada proliferación endometrial durante la fase secretora (Simón *et al.*, 2009). La evidencia de reducciones en el número de células madre endometriales en mujeres con aborto recurrente (Lucas *et al.*, 2016), hace hincapié en su importancia para la implantación embrionaria y el mantenimiento del embarazo.

En línea con lo anterior, otra función que destaca, siendo también clave en la proliferación endometrial, es la regulación del ciclo celular. Estudios realizados en ratonas expuestas a glucocorticoides han demostrado una reducción en la proliferación celular endometrial, acompañada de una reducción en la receptividad endometrial por la desregulación de genes importantes en el proceso de implantación embrionaria como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) o la mucina 1 (MUC1) (Nanjappa *et al.*, 2015; Shariati *et al.*, 2019). También se ha reportado una inhibición de la proliferación, migración e invasión de los trofoblastos en ratonas expuestas a glucocorticoides durante la placentación temprana, que conlleva a una reducción del tamaño de la placenta y del feto y un aumento de la preeclampsia (Zhang *et al.*, 2016). Todos estos estudios ponen de manifiesto el efecto de los glucocorticoides en la reducción de la proliferación celular y la regeneración endometrial, potenciando el establecimiento de una relación entre el estrés y la función endometrial, como se hace de forma pionera en esta tesis doctoral.

Otra función también importante en el proceso de implantación embrionaria es la regulación de la formación de cilios y la organización del citoesqueleto. Las células epiteliales endometriales cambian su morfología en función de la fase del ciclo menstrual, regulando la presencia o ausencia de cilios o pinopodos que protuyen hacia el lumen uterino y que están implicados en el proceso de reconocimiento y aposición entre el endometrio y el embrión (Massimiani *et al.*, 2019; Ojosnegros *et al.*, 2021), siendo mayor el número de células ciliadas durante la fase proliferativa que durante la fase secretora (Masterton *et al.*, 1975; Bartosch *et al.*, 2011; Luddi *et al.*, 2020). Bahar y colaboradores observaron diferencias importantes a este nivel entre mujeres fértiles y mujeres con fallo de implantación, caracterizándose las primeras por ausencia de cilios y presencia de pinopodos, y ocurriendo lo contrario en las pacientes infértiles (Bahar *et al.*, 2015). Sin embargo, estos resultados contrastan con los de otros estudios en los que se ha reportado una regulación a la baja de procesos ciliares y organización de microtúbulos y citoesqueleto en pacientes con endometriosis o fallo de implantación recurrente (Koot *et al.*, 2016; Devesa-Peiro *et al.*, 2020). En esta misma línea, una revisión reciente recoge que entre aquellas pacientes que sufren de discinesia ciliar primaria, una enfermedad genética que afecta a la estructura y motilidad de los cilios, la principal causa de infertilidad podría estar relacionada con la dificultad de transportar el embrión a través de las trompas de falopio y el endometrio hasta el sitio de implantación (Newman *et al.*, 2023), recalcando que, aunque en menor cantidad que durante la fase proliferativa, la presencia de células ciliadas durante la WOI es necesaria para la consecución de un embarazo. En concordancia con estos últimos estudios, en esta tesis se ha reportado, por primera vez en la literatura científica, un descenso en la expresión de genes relacionados con cilios y citoesqueleto con mayores concentraciones de cortisol en el microambiente

endometrial, lo cual podría estar implicado en un descenso en las tasas de implantación en estas pacientes.

En resumen, en esta tesis doctoral se evidencia, por primera vez en muestras endometriales de pacientes infértiles, que niveles altos de cortisol en el microambiente endometrial, potencialmente inducidos por el estrés, reducen la expresión de genes involucrados en funciones relacionadas con la regulación del ciclo celular y la regeneración y proliferación endometrial, y aumentan la expresión de genes que median la apoptosis y la respuesta inmune, dando una posible explicación a la reducción en las tasas de embarazo en dicho grupo de pacientes, lo que también se reporta de forma pionera en el presente estudio. Un estudio reciente ha evidenciado un descenso de la proliferación y un aumento de la apoptosis y la respuesta inmune en células de la granulosa bovina expuesta a estrés agudo (Sammad *et al.*, 2022), concordando con nuestros resultados y señalando que el estrés presenta un efecto similar a nivel ovárico y endometrial, impidiendo la concepción a varios niveles.

La estrona como nueva hormona clave en la respuesta al estrés regulando la producción esteroidea intracrinológica endometrial

Pasando a la regulación génica endometrial por parte de la **estrona**, 48 muestras habían sido secuenciadas y poseían una concentración de estrona detectable por UPLC-MS/MS. 501 genes se encontraban significativamente influenciados por incrementos en los niveles endometriales de este metabolito (**Tabla Suplementaria 7**). Estos genes se anotaron en 865 funciones, las cuales fueron agrupadas y representadas en el gráfico de sectores de la **Figura 24**. Las funciones principales en las que se encontraban implicados estos genes fueron metabolismo y señalización, y más concretamente, el metabolismo y la síntesis de hormonas esteroideas y las rutas de señalización y producción de estrógenos y GnRH. Estos genes también se encontraban implicados en la respuesta a estímulos, concretamente la respuesta a E2 y la respuesta a estrés, inmunidad y adhesión. Además, algunos de estos genes destacaron por su papel en importantes trastornos del sistema nervioso y enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson, entre otras (**Figura 24**).

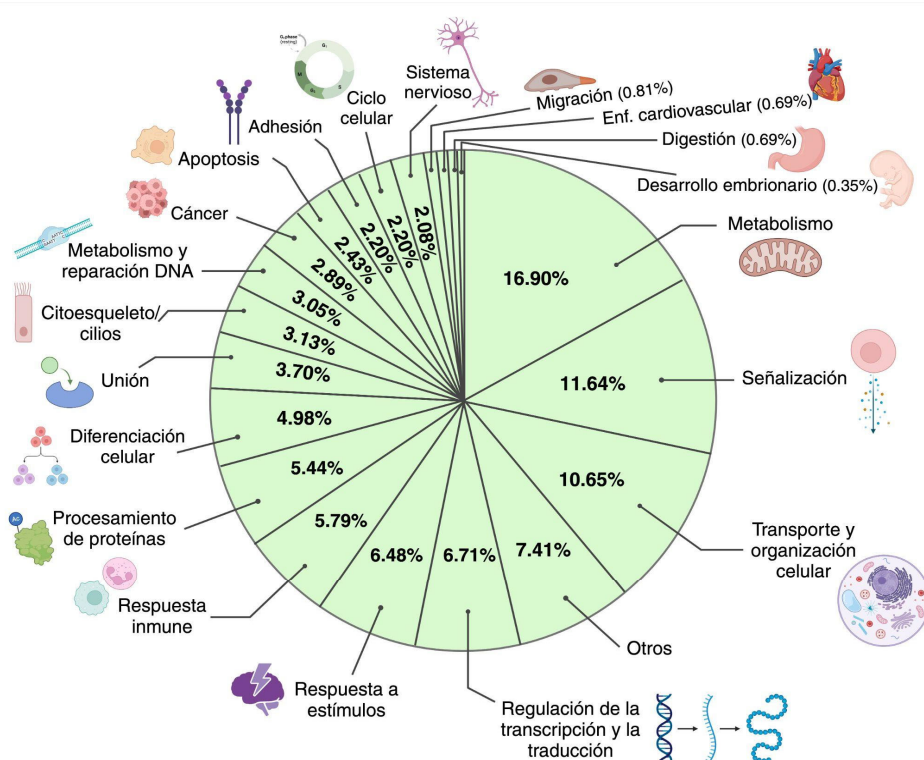


Figura 24. Funciones en las que están implicados los genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estrona. Gráfico de sectores o circular (pie chart) en el que se recoge la proporción que representa cada función con respecto al total de funciones anotadas (865 funciones) para los genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de cortisol (501 genes). Figura creada con Biorender.com.

Los 501 genes se agruparon de acuerdo a su comportamiento (**Tabla Suplementaria 7**): un grupo (grupo 1) conteniendo 217 genes que aumentaban su expresión conforme aumentaban las concentraciones de E1 (**Figura 25A**), y un segundo grupo (grupo 2) con 284 genes que la disminuían (**Figura 25B**).

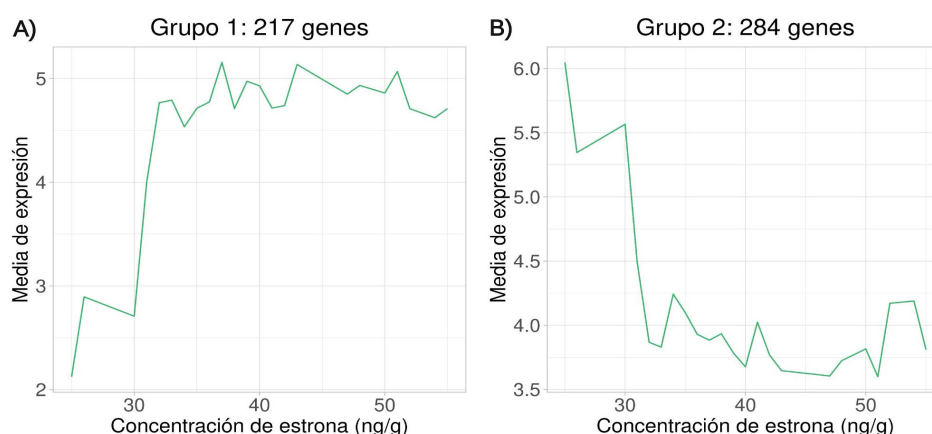


Figura 25. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de estrona. Grupos de comportamiento génico en función del aumento en las concentraciones de estrona: **A) Genes que aumentaban su expresión** y **B) Genes que disminuían su expresión**.

El análisis detallado de las funciones subyacentes a cada grupo de genes y su comparación reveló que aquellos genes que aumentaban su expresión (grupo 1) se encontraban

involucrados de forma mayoritaria en transporte y organización celular, diferenciación y metabolismo. Cabe destacar que, dentro de las funciones metabólicas, todos aquellos genes implicados en el metabolismo de hormonas esteroideas se encontraban únicamente en este grupo. Por otra parte, los genes que disminuían su expresión (grupo 2) se encontraban mayoritariamente involucrados en la respuesta inmune, la respuesta a estímulos, procesamiento de proteínas, ciclo celular y apoptosis. Además, las funciones de migración celular y desarrollo embrionario se encontraban únicamente representadas en este grupo, no estándolo en el grupo 1. Sin embargo, funciones importantes como la regulación del sistema nervioso y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, la señalización, destacando las rutas de señalización y producción de estrógenos y GnRH, y la respuesta a estrés y otros estímulos, entre otras, se encontraban representadas de igual forma en ambos grupos, aunque implicando a genes diferentes.

Por su relevancia en relación al tema de la presente tesis destaca el metabolismo y síntesis de hormonas esteroideas. Concretamente, aumentos en la concentración de E1 aumentan la expresión a nivel endometrial de genes que sintetizan enzimas clave en dicha ruta metabólica como *SULT1E1* o *StAR*, entre otras. Diversos estudios ya habían reportado la expresión de *SULT1E1* a nivel endometrial (Rižner *et al.*, 2017; Cornel *et al.*, 2019), siendo una de las responsables del control de los niveles estrogénicos endometriales produciendo las formas activas a partir de sus formas sulfatadas. La expresión de *StAR* a nivel endometrial también ha sido anteriormente reportada en algunos estudios (Attar *et al.*, 2009; Sinreih *et al.*, 2017), poniendo en duda la creencia de que la esteroidogénesis *de novo* está limitada únicamente a las glándulas esteroidogénicas. A pesar de que nuestro estudio no es pionero en la identificación de la expresión de estas enzimas en tejido endometrial, sí es el primero en describir una regulación de las mismas por parte de E1. Estudios recientes han reportado una alteración en la expresión de enzimas esteroidogénicas en células de la granulosa bovina sometidas a estrés agudo (Li *et al.*, 2016; Sammad *et al.*, 2022). Dado que en nuestro estudio hemos evidenciado un efecto del estrés en los niveles endometriales de E1, el estrés, a través de la modificación de éstos, podría estar alterando la ruta de síntesis de hormonas esteroideas, afectando a los niveles del resto de hormonas y, en última instancia, a la homeostasis del microambiente endometrial y ovárico, y al proceso reproductivo.

Paralelamente, niveles crecientes de E1 llevan a la desregulación de genes involucrados en la respuesta al estrés, concordando con múltiples estudios evidenciando la influencia de los niveles estrogénicos en la respuesta al estrés (Albert *et al.*, 2015; Albert and Newhouse, 2019). Sin embargo, hasta el momento ningún estudio ha descrito dicha influencia directamente en endometrio, así como tampoco específicamente por uno de los estrógenos más inactivos como es E1, siendo el nuestro un estudio pionero en describir esta relación.

Curiosamente, algunos de estos genes se encuentran también involucrados en el desarrollo de importantes enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson o Huntington. Diversos estudios han reportado un efecto neuroprotector de los estrógenos retardando la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Koszegi and Cheong, 2022), así como un aumento del riesgo de padecerlas tras la menopausia (Cheng *et al.*, 2021), debido al descenso en los niveles estrogénicos que ésta conlleva. No obstante, esta relación ha sido descrita únicamente a nivel cerebral, en ningún caso directamente en endometrio. La desregulación de la expresión de dichos genes en el microambiente endometrial por la alteración en los niveles de E1 podría conllevar cambios importantes a nivel molecular que afecten a la función endometrial, requiriéndose de más estudios que ayuden a desentrañar esta compleja y novedosa relación.

Otra de las funciones principales en las cuales interviene esta hormona a nivel endometrial es la señalización. Dentro de este amplio proceso, por su relación con esta tesis, destacamos la desregulación de la señalización de estrógenos y GnRH en respuesta al aumento en los niveles de E1 endometrial, produciendo alteraciones en la expresión de genes tan importantes como *MAPK1* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 1*), miembro de la familia MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) que interviene en numerosos procesos en el organismo. Estudios anteriores han descrito que, además de sus funciones clásicas, el receptor estrogénico *ESR1* (*Estrogen receptor 1*) ejerce algunas funciones a través de la cascada de señalización de MAPK, como la inducción de la proliferación celular (Stefkovich *et al.*, 2018). Sin embargo, este es el primer estudio que proporciona evidencia de la regulación de esta cascada de señalización a nivel endometrial por parte de los niveles de E1. Dada la implicación de *MAPK* en la implantación embrionaria (Massimiani *et al.*, 2019; Ojosnegros *et al.*, 2021) y la importancia de la señalización estrogénica para la consecución de un embarazo y desarrollo embrionario temprano (Robertshaw *et al.*, 2016), se pone de nuevo de manifiesto la importancia de los niveles hormonales en el microambiente endometrial para la función reproductiva.

Pese a que E1 es un estrógeno más inactivo que E2 y es producido en menor cantidad que éste, esta tesis doctoral resalta, por primera vez, el importante papel de E1 en la respuesta al estrés en el endometrio, actuando como un importante regulador de la producción local de hormonas esteroideas, y definiendo la regulación contraria de los niveles de esta hormona tanto en situaciones de estrés agudo o puntual como frente a un escenario de estrés prolongado. Además, se describe la relación bidireccional entre ambos, ya que tanto los niveles endometriales de E1 regulan la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés a nivel endometrial, como el estrés regula los niveles endometriales de E1. De esta

forma, la estrona surge como un nuevo factor de estrés clave para la regulación hormonal en el microambiente endometrial.

El estradiol en tejido endometrial se encuentra significativamente afectado por el estrés y relacionado con funciones importantes para la implantación

En cuanto a la influencia de las concentraciones endometriales de **estradiol** en la expresión génica, se realizó el análisis con la información de 32 participantes, observándose que 9 genes cambiaban significativamente su expresión con aumentos en las concentraciones de este metabolito (**Tabla Suplementaria 8**), 2 de los cuales aumentaban su expresión (**Figura 26A**), mientras que 7 de ellos la disminuían (**Figura 26B**).

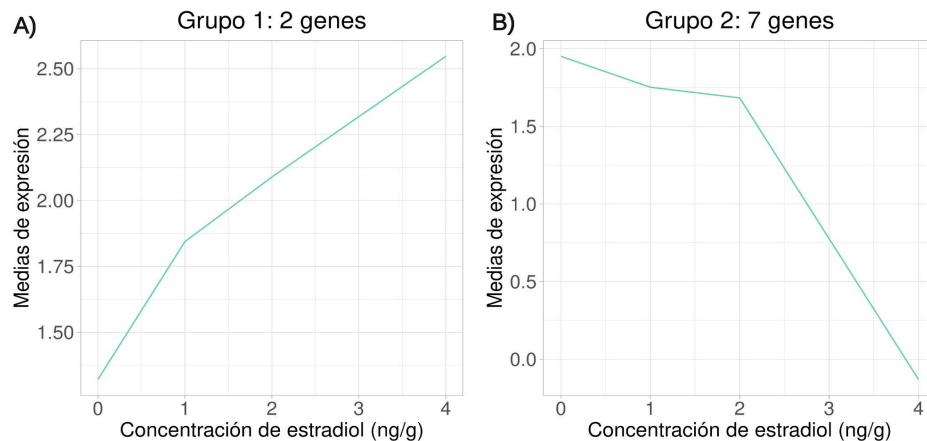


Figura 26. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de estradiol. Grupos de comportamiento génico en función del aumento en las concentraciones de estradiol: A) Genes que aumentaban su expresión y B) Genes que disminuían su expresión.

Dentro del primer grupo se destaca el gen *IFT27* (*Intraflagellar transport 27*), el cual participa en el ensamblaje de cilios, el transporte intraflagelar y la biogénesis y mantenimiento de orgánulos celulares. Estudios en ratones han demostrado que este gen es esencial para la fertilidad masculina y la espermiogénesis (Zhang *et al.*, 2017). No obstante, no hay estudios que evalúen la importancia de este gen para la funcionalidad endometrial. Anteriormente ya se ha discutido sobre los cambios en la presencia de células ciliadas en el endometrio en función de la fase del ciclo menstrual y la controversia en relación a la asociación entre estas células y los fallos de implantación, habiendo estudios que han relacionado un descenso en la formación de estas estructuras con fallos de implantación y alteraciones endometriales. En este estudio, hemos descrito una disminución de la formación de estas estructuras con aumentos en la concentración de cortisol, que se dan en pacientes estresadas, y que podrían estar relacionado con una disminución de la probabilidad de concepción en estas pacientes. En concordancia con esto, el gen *IFT27* aumenta su expresión con altas concentraciones de E2, que se dan en aquellas pacientes no estresadas, describiendo por primera vez a nivel

endometrial la regulación estrogénica de este gen y su posible implicación en la función reproductiva.

Entre los genes agrupados por disminuir su expresión con aumentos en las concentraciones de E2 (Figura 26B), encontramos *HYLS1* (*Centriolar and Ciliogenesis associated protein*), relacionado también con la formación de microtúbulos y cilios, así como la señalización y activación de estos (Chen *et al.*, 2021), y cuyas mutaciones han sido relacionadas con disfunciones ciliares (Hou *et al.*, 2020). Un estudio reciente ha reportado que, en el epitelio luminal de ratonas embarazadas, este gen se encuentra altamente expresado únicamente en día 3 (fase prereceptiva), descendiendo su expresión tanto en día 4 (fase receptiva) como en día 5 (implantación) (Aikawa *et al.*, 2022). De acuerdo con estos resultados, en nuestro estudio hemos reportado, por primera vez, un descenso de la expresión de este gen en fase secretora media en muestras endometriales de mujeres con elevadas concentraciones de E2. Estos resultados, aunque contrarios a los anteriores, refuerzan la importancia de los estrógenos en la regulación del proceso de implantación y los cambios morfológicos celulares subyacentes, y ponen de manifiesto la necesidad de ahondar más en el estudio de la función y regulación del desarrollo de estas estructuras durante la implantación embrionaria.

Por otro lado, dentro de este mismo grupo de genes cuya expresión disminuye con aumentos en las concentraciones de E2 (Figura 26B), encontramos tres genes relacionados con la regulación de la transcripción y la estabilidad genómica: *BEX4* (*Brain expressed X-linked 4*), *ZNF668* (*Zinc finger protein 668*) y *BCORL1* (*BCL6 Corepressor like 1*). El gen *BEX4* juega un papel importante en la desacetilación de microtúbulos participando por tanto en el control de la progresión del ciclo celular y la estabilidad genómica, habiéndose relacionado con múltiples cánceres, como el gástrico (Zhu and Xiao, 2020), el ovárico (Chien *et al.*, 2005) o el endometrial (Wang *et al.*, 2021), habiéndose correlacionado mayor expresión de este gen con menor tiempo de supervivencia (Wang *et al.*, 2021). *ZNF668* actúa como un regulador de la transcripción a través de la RNA polimerasa II, permitiendo la unión de ésta al DNA, así como la unión de inhibidores y activadores de la transcripción. Además, ha sido descrito como gen supresor de tumores, regulando el daño al DNA (Hu *et al.*, 2013; Alsaif *et al.*, 2021), en cáncer de pulmón (Zhang *et al.*, 2018), de mama (Hu *et al.*, 2011) y melanoma (Rose *et al.*, 2011), así como correlacionado con la invasividad del cáncer de vejiga, siendo menor su expresión en los casos de mayor invasividad (Okuno *et al.*, 2023). También se ha descrito una expresión menor de este gen en muestras de sangre de mujeres con preeclampsia (Enquobahrie *et al.*, 2011). Por último, el gen *BCORL1* actúa también a nivel de la transcripción, concretamente como inhibidor a través de la interacción con deacetilasas de histonas de clase III. Presenta sus mayores niveles de expresión a nivel de placenta, teniendo también altos niveles de expresión en el resto de órganos reproductivos femeninos. De hecho, se ha descrito como

marcador pronóstico del cáncer endometrial, siendo mayores sus niveles en aquellas mujeres con pronóstico desfavorable (Lin *et al.*, 2021). La alteración de la expresión de estos genes en respuesta a cambios en los niveles de E2 en endometrio podría afectar a la proliferación endometrial y, en última instancia, a su funcionalidad.

El gen *MST4* (también llamado *STK26*, *Serine/Threonine Kinase 26*), cuya expresión también se ve reducida con aumentos en las concentraciones de E2 (Figura 26B), se encuentra principalmente involucrado en la proliferación celular y la apoptosis (Shi and Zhou, 2017). De hecho, ha sido relacionado con diversos tipos de cáncer; concretamente se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama (Arora *et al.*, 2022) y endometrial (Liu *et al.*, 2022), relacionado con el aumento de la proliferación, migración e invasión de los tejidos, y con la prognosis y la tasa de supervivencia. También se ha relacionado con casos de diabetes gestacional (Alur *et al.*, 2021), y de rotura prematura de placenta con corioamnionitis histológica (Lu *et al.*, 2020), estando aumentada su expresión en ambos casos. Por tanto, este gen se encuentra ampliamente involucrado en la patogénesis de enfermedades de base inmune e inflamatoria (Shi and Zhou, 2017). La regulación estrogénica de este gen pone de manifiesto de nuevo la importancia del sistema inmune en la implantación y el desarrollo embrionario temprano.

Por último, el gen *PCDH17* (*Protocadherin 17*) pertenece a la superfamilia de las cadherinas, interviniendo por tanto en la adhesión celular. La regulación estrógeno-dependiente de este gen ya ha sido descrita anteriormente en las trompas de Falopio de ratonas (Cerny *et al.*, 2016). También se han descrito cambios en sus niveles de expresión en endometrio en mujeres con patologías reproductivas que cursan con alteración de los niveles estrogénicos como endometriosis (Sherwin *et al.*, 2008) y síndrome de ovario poliquístico (Kim *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha descrito un aumento de la expresión de este gen en el epitelio luminal de ratonas con fallo de implantación (Monsivais *et al.*, 2016), así como un descenso de su expresión durante la fase de estro en comparación con el proestro, preparando al útero para la implantación (Yip *et al.*, 2013). Coincidiendo con esto, en nuestro estudio hemos reportado una regulación estrógeno-dependiente de este gen en tejido endometrial, concretamente un descenso de sus niveles con aumentos en los niveles de E2, que se dan en mujeres no estresadas y que, potencialmente, presentarían mayores probabilidades de lograr un embarazo a término.

En resumen, en esta tesis doctoral se describe, por primera vez, una relación entre los niveles endometriales de E2 y las probabilidades de lograr un embarazo a término, así como la alteración de estos niveles en mujeres estresadas. La unión entre ambos procesos podría darse a través de la regulación de la expresión de genes relacionados con la formación de

cilios, la estabilidad genómica, el sistema inmune y la adhesión por parte de esta hormona en tejido endometrial.

Los niveles endometriales de DHEA, precursor androgénico y estrogénico por excelencia, modifican la expresión de genes relacionados con la señalización y decidualización

Finalmente, el análisis del último de los metabolitos priorizados, la **DHEA**, se realizó con la información de 48 participantes, y mostró que únicamente 2 genes se encontraban significativamente afectados por incrementos en las concentraciones de esta hormona. *GPR63* (*G-coupled protein receptor 63*) (**Figura 27A**), implicado en señalización, aumentaba sus niveles de expresión. Se ha demostrado que genes de la familia de receptores acoplados a proteína G (*G-protein coupled receptors*) son necesarios para la decidualización de células endometriales estromales (Yoo *et al.*, 2017). Además, un estudio que evaluó marcadores de madurez ovocitaria comparando expresión génica entre células del cúmulo de ovocitos MI y MII encontró a *GPR63* entre los 20 genes cuya expresión estaba más suprimida (Devjak *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay evidencia previa de la regulación de dicho gen por parte de la DHEA en tejido endometrial. Por otro lado, *MAN1B1* (*Mannosidase Alpha Class 1B Member 1*) descendía sus niveles de expresión en respuesta a aumentos en las concentraciones endometriales de DHEA (**Figura 27B**). Esta enzima participa en la síntesis de N-glicanos y en el control de calidad de las proteínas mediante el marcado de las mal plegadas para su posterior degradación (Iannotti *et al.*, 2014). Un estudio reciente ha demostrado que la inhibición de *MAN1A1* aumenta la concentración de N-glicanos ricos en manosa e inhibe la decidualización endometrial, habiéndose dado estas condiciones en tejido endometrial de mujeres con abortos en comparación con mujeres con embarazo a término (Chen *et al.*, 2023). Sin embargo, este mismo estudio reporta un aumento de *MAN1B1* en endometrio de mujeres con aborto (Chen *et al.*, 2023), contradiciendo a nuestros resultados. Debido a la escasez de literatura evaluando la función de las manosidasas en el proceso de implantación y los cambios moleculares que esto conlleva, se requiere de más estudios que evalúen esta relación. La desregulación de la expresión de genes implicados en el proceso de decidualización (Ochoa-Bernal and Fazleabas, 2020), así como de otros procesos de señalización (Massimiani *et al.*, 2019), en aquellas mujeres con niveles elevados de DHEA, podría ser responsable de los fallos de implantación asociados a dicho grupo de mujeres.

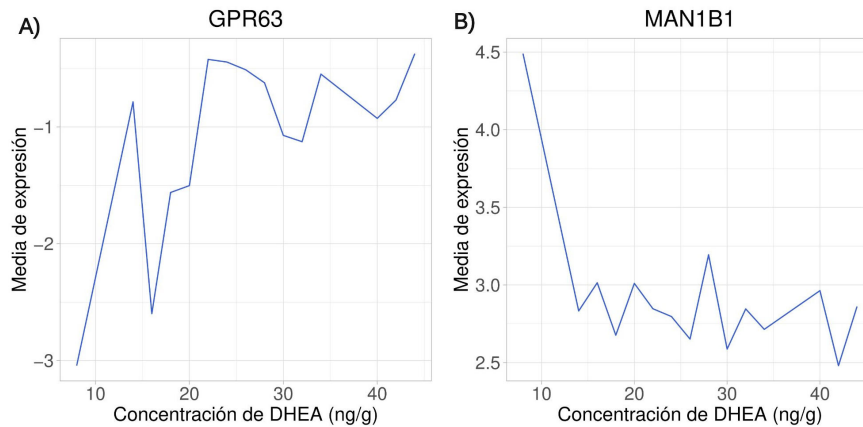


Figura 27. Cambios en la expresión génica en función de la concentración de DHEA. Genes significativamente afectados por incrementos en las concentraciones de DHEA y su comportamiento: **A) GPR63** (G-coupled protein receptor 63), el cual aumenta sus niveles de expresión con incrementos en la concentración de DHEA y **B) MAN1B1** (Mannosidase Alpha Class 1B Member 1), que la disminuye.

Las alteraciones de los niveles de esteroides endometriales no producen alteraciones génicas comunes

La comparación de los genes significativamente afectados por cada uno de los cuatro metabolitos anteriores evidenció que ninguno de ellos era común al resto (**Figura 28A**). Sin embargo, en la intersección de las funciones anotadas para dichos genes sí se observaron funciones comunes (**Figura 28B**).

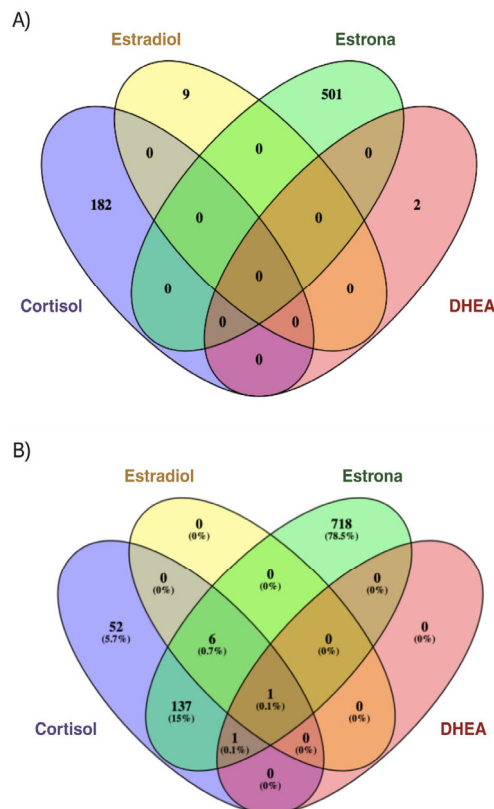


Figura 28. Intersección de genes (A) y funciones (B) significativamente influenciados por los cuatro metabolitos priorizados. A) Los genes cuya expresión se encontraba significativamente influenciada por

incrementos en las concentraciones de los 4 metabolitos priorizados se intersectaron mediante un diagrama de Venn: 9 genes afectados por estradiol (amarillo), 501 por estrona (verde), 182 por cortisol (azul) y 2 por DHEA (rojo). **B)** Las funciones subyacentes a los genes significativamente influenciados por los cuatro metabolitos priorizados se intersectaron mediante un diagrama de Venn: 7 funciones anotadas en estradiol (amarillo), 865 en estrona (verde), 198 en cortisol (azul) y 2 en DHEA (rojo).

Más en detalle, se obtuvieron 6 funciones comunes a cortisol, estrona y estradiol, una función común a cortisol, estrona y DHEA y una función común a los cuatro metabolitos. Sin embargo, estas funciones hacían referencia a componentes celulares estructurales (membrana, citoplasma...), no siendo por tanto de gran relevancia. Donde sí encontramos funciones a destacar es en la intersección entre cortisol y estrona, teniendo ambas 137 funciones anotadas comunes. Estas funciones fueron agrupadas para mejorar su interpretación, y el *pie chart* resultante se puede observar en la **Figura 29**. Las principales funciones comunes a ambos grupos de genes están implicadas en la regulación de la transcripción y la señalización, entre otras, destacando también como función común la respuesta a estímulos, concretamente la respuesta al estrés (**Figura 29**). Esto implicaría que, a pesar de regular genes diferentes, alteraciones en los niveles de ambos metabolitos, que pueden estar causadas por el estrés, alteran funciones comunes que afectarían en última instancia a la implantación y la consecución de un embarazo a término.

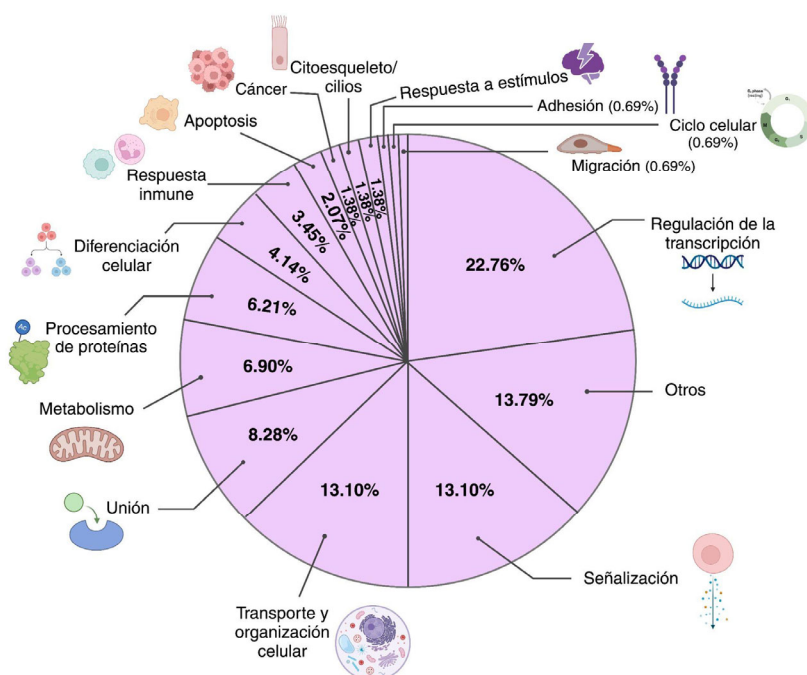


Figura 29. Funciones comunes a las anotadas para los genes significativamente afectados por los niveles de cortisol y de estrona. Gráfico de sectores o circular (*pie chart*) en el que se recoge la proporción que representa cada función con respecto al total de funciones anotadas (137 funciones) comunes para los genes significativamente afectados por las concentraciones de cortisol y estrona. Figura creada con Biorender.com.

El estrés a largo plazo afecta al microambiente endometrial causando cambios en los patrones de expresión génica

La influencia del estrés en la expresión génica endometrial se evaluó tanto para el estrés puntual (Estado) (38 participantes) como para el estrés a largo plazo (Rasgo) (36 participantes). No se encontró ningún gen significativamente afectado por aumentos en el estrés temporal o puntual (evaluado con las puntuaciones de la dimensión Estado), mientras que se encontraron 12 genes significativamente afectados por incrementos en el estrés a largo plazo (evaluado con las puntuaciones de la dimensión Rasgo) (**Tabla Suplementaria 9**), los cuales se agruparon en función de su tendencia de expresión en aquellos que disminuían su expresión conforme aumentaba el estrés (7 genes, grupo 1) (**Figura 30A**) y aquellos que la aumentaban (5 genes, grupo 2) (**Figura 30B**).

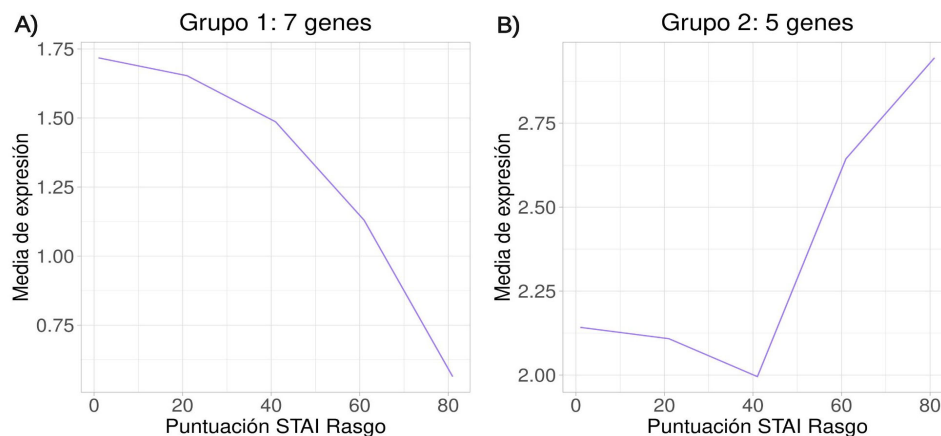


Figura 30. Cambios en la expresión génica en función de las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo. Genes significativamente afectados por incrementos en las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo y su comportamiento: **A) Genes que disminuían su expresión** y **B) Genes que aumentaban su expresión.**

Notablemente, más de la mitad ($n=4$) de los genes que disminuían su expresión con aumentos en los niveles de estrés (grupo 1, **Figura 30A**) eran pseudogenes y genes relacionados con el RNA, como los RNA largos no codificantes (lncRNAs, del inglés *long non-coding RNA*). Éstos son RNAs de más de 200 nucleótidos que no son traducidos en proteínas. Presentan diversas funciones relacionadas con la regulación de procesos, como la regulación de la conformación de la cromatina o la regulación de la transcripción y traducción (Statello *et al.*, 2021). En reproducción, diversos estudios han descrito la importancia de estos RNAs en el proceso de implantación y embarazo temprano, tanto a nivel embrionario, participando en procesos tan importantes como la activación del genoma o la función mitocondrial (Qiu *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2018), como a nivel endometrial, siendo importantes en la adquisición de la receptividad (Wang *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2023) o la adhesión (Takamura *et al.*, 2020). De hecho, se ha descrito una expresión alterada de diversos lncRNAs en patologías como fallo de implantación recurrente (Fathi *et al.*, 2024), aborto recurrente (Zhang and Wang, 2022) o endometriosis (Hudson *et al.*, 2021), destacando de nuevo su relevancia en el adecuado funcionamiento endometrial y la implantación. Otros genes implicados en la

regulación de la expresión génica y la proliferación celular, como *INCA1* (*Inhibitor Of CDK, Cyclin A1 Interacting Protein 1*) y *TGIF1* (*TGFB Induced Factor Homeobox 1*), también se encontraron reducidos en respuesta a estrés prolongado. El gen *INCA1* se ha descrito como importante en la regulación de la comunicación materno-fetal, siendo su estado de metilación diferente entre las células maternas (decidua) y fetales (placenta) (Kim *et al.*, 2012). Por su parte, el gen *TGIF1* se ha descrito como un gen importante para la transformación endometrial mediada por LIF en el proceso de adquisición de receptividad (Rosario *et al.*, 2014). Debido a estas evidencias, y a la relevancia en general de los procesos de proliferación celular y regulación génica en el adecuado desarrollo endometrial, en este estudio se evidencia, por primera vez, que el estrés, a través de alteraciones en la expresión endometrial de dichos genes, podría impedir la implantación embrionaria.

Los 5 genes que seguían la tendencia contraria (grupo 2, **Figura 30B**), se encontraban implicados en inflamación (*SAAL1* (*Serum Amyloid A Like 1*)), sistema inmune (*CORO1A* (*Coronin 1A*), *WAS* (*WASP Actin Nucleation Promoting Factor*)), coagulación (*SERPINE1* (*Serpin Family E Member 1*)) y adhesión (*RPSA* (*Ribosomal protein SA*)). Durante el proceso de implantación embrionaria y el embarazo se producen cambios en la coagulación sanguínea materna que son cruciales para el mantenimiento del embarazo. De hecho, alteraciones en el proceso de coagulación se han reportado en casos de fallos de implantación y abortos (Gerotziafas *et al.*, 2017; Balandina *et al.*, 2019; Marino, 2023). Concretamente, se han descrito polimorfismos en el gen *SERPINE1* en casos de fallo de implantación recurrente (Sharma *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha descrito la presencia de la proteína de adhesión *RPSA* en vesículas extracelulares secretadas por el epitelio endometrial, las cuales median el proceso de implantación embrionaria y el desarrollo embrionario temprano (Segura-Benítez *et al.*, 2022). La alteración en la expresión endometrial de ambos genes en aquellas pacientes estresadas podría mediar en los fallos de implantación de dicho grupo de pacientes. Un estudio reciente evaluó la expresión génica diferencial en respuesta al estrés en lesiones endometrióticas, evidenciando una alteración de la respuesta inmune en aquellas pacientes estresadas, y concluyendo que el estrés podría afectar a la patogénesis de dicha enfermedad (Lu *et al.*, 2023). De igual forma, y dada la importancia del sistema inmune en la implantación (Yang *et al.*, 2023), los niveles elevados de estrés, mediante la alteración del sistema inmune, podrían alterar dicho proceso e impedir la consecución de un embarazo. Además, estos resultados concuerdan con los evidenciados para los cambios en la expresión génica endometrial causados por incrementos en los niveles de cortisol, que se producen frente a una situación de estrés.

Por tanto, este estudio evidencia, por primera vez, que ambos tipos de estrés regulan de forma diferencial las concentraciones de hormonas esteroideas en el microambiente

endometrial, y, además, solo hemos podido observar que el estrés a largo plazo afecta a la expresión de genes que intervienen en procesos clave para la implantación embrionaria como el ciclo celular, sistema inmune, adhesión y coagulación.

La comparación de los genes significativamente afectados por el estrés a largo plazo (dimensión Rasgo) y aquellos significativamente afectados por incrementos en los niveles de los metabolitos mostró que ninguno de ellos presentaba una regulación común, como queda reflejado en la **Figura 31**.

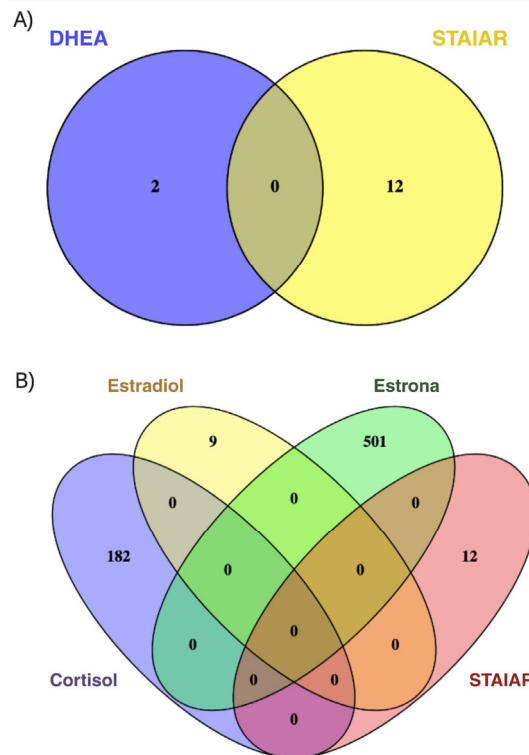


Figura 31. Genes comunes afectados por el estrés y los metabolitos. A) Ausencia de genes comunes influenciados por el estrés a largo plazo (STAI Rasgo) y DHEA. Los genes cuya expresión se encontraba significativamente influenciada por incrementos en las puntuaciones del cuestionario STAI dimensión Rasgo y las concentraciones de DHEA se intersectaron mediante un diagrama de Venn: 12 genes afectados por el estrés (amarillo) y 2 genes afectados por DHEA (azul), mostrando como ninguno de ellos presentaba una regulación común. **B) Ausencia de genes comunes influenciados por el estrés a largo plazo (STAI Rasgo) y estrona, estradiol y cortisol.** Los genes cuya expresión se encontraba significativamente influenciada por incrementos en las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo y las concentraciones de tres de los metabolitos priorizados se intersectaron mediante un diagrama de Venn: 12 genes afectados por el estrés (rojo), 182 genes afectados por cortisol (azul), 501 genes por estrona (verde) y 9 por estradiol (amarillo), mostrando como ninguno de ellos presentaba una regulación común.

El estrés altera, por un lado, la expresión endometrial de genes implicados en funciones clave para la competencia endometrial y, por otro, los niveles de esteroides endometriales. Estos niveles hormonales alterados, a su vez, modifican los patrones de expresión de genes y funciones importantes para la implantación embrionaria, y es todo ese conjunto de alteraciones tanto del microambiente endometrial como de los patrones de expresión génica

lo que finalmente lleva a una reducción en las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida. Por tanto, aunque el estrés y los cambios en los niveles de esteroides endometriales no modifiquen la expresión de genes comunes, es finalmente el conjunto y la interacción entre todos ellos lo que reduce las probabilidades de lograr un embarazo a término.

6. El cortisol altera la expresión génica de células endometriales estromales en cultivo

En base a los resultados del análisis Masigpro, se seleccionaron 6 genes significativamente afectados por incrementos en las concentraciones de cortisol para ser validados por RT-qPCR: 3 genes que aumentaban su expresión conforme aumentaban las concentraciones de cortisol [*HBB* (*Hemoglobin Subunit Beta*), *NCSTN* (*Nicastrin*) y *SNORA1* (*Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 1*)] y 3 que la disminuían [*GSK3A* (*Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha*), *RPRD2* (*Regulation of Nuclear Pre-mRNA Domain Containing 2*) y *SETD2* (*SET Domain Containing 2, histone lysine methyltransferase*)]. Estos genes fueron seleccionados dado que presentaban valores de R^2 altos, valores de p-valor bajos y altos niveles de expresión en endometrio.

Como se puede observar en la **Figura 32**, con ambos tratamientos (0,5 μ M y 10 μ M) el cortisol disminuyó significativamente la expresión de *GSK3A* (p-valores= $7,308e^{-8}$ y $5,180e^{-8}$), *RPRD2* (p-valores= $9,494e^{-9}$ y $4,928e^{-9}$) y *SETD2* (p-valores= $2,710e^{-6}$ y $2,423e^{-6}$) en células endometriales estromales en cultivo al compararlas con las células no tratadas (vehículo).

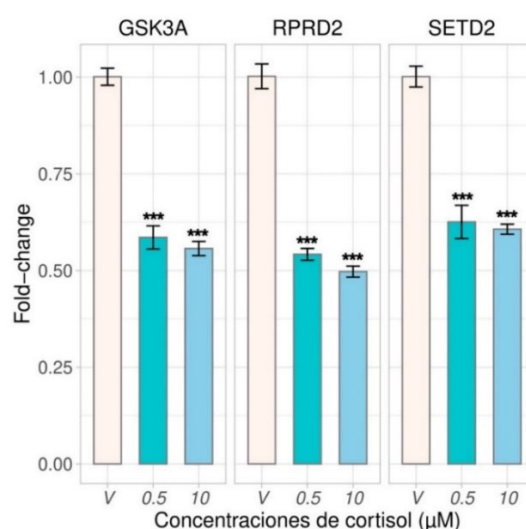


Figura 32. El cortisol disminuye significativamente la expresión de *GSK3A*, *RPRD2* y *SETD2* en células endometriales estromales en cultivo. En la figura se representa la expresión relativa (Fold-change) de cada uno de los genes para cada una de las concentraciones de cortisol (0.5 μ M y 10 μ M) y el

vehículo (V) y su comparación. Los asteriscos indican la significatividad de la comparación de las concentraciones con el vehículo y su magnitud (** $p \leq 0,001$). GSK3A: Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha; RPRD2: Regulation of Nuclear Pre-mRNA Domain Containing 2; SETD2: SET Domain Containing 2, histone lysine methyltransferase.

Los resultados obtenidos en este modelo celular concuerdan con los obtenidos en el análisis Masigpro, evidenciando, por primera vez en la literatura científica, que el cortisol reduce la expresión de estos genes tanto *in vivo* en aquellas mujeres con altos niveles de esta hormona en tejido endometrial como *in vitro* en un modelo de células estromales endometriales.

El gen *GSK3A* participa en múltiples procesos celulares y patologías; es una proteína clave para la señalización y regulación a través del sistema Wnt, así como para el metabolismo de la glucosa, regulando la respuesta a insulina, e interviene en enfermedades neurológicas como el Alzheimer y el desorden bipolar (Woodgett, 2013). Por tanto, se trata de un gen de elevada importancia en diversos procesos en el organismo y cuya desregulación podría alterar la homeostasis del individuo. En el campo de la reproducción, estudios en ratones han reportado que alteraciones en este gen reducen la motilidad de los espermatozoides (Bhattacharjee *et al.*, 2015, 2018) y hace que sean incapaces de hiperactivarse (Dey *et al.*, 2020), resultando en infertilidad masculina. Por otro lado, el gen *RPRD2* tiene un impacto sustancial en la expresión génica, actuando como regulador negativo de la transcripción, siendo capaz de alterar procesos biológicos tan importantes como la respuesta al estrés y el crecimiento celular (Winczura *et al.*, 2021). Por último, *SETD2* es una metiltransferasa encargada de la trimetilación de la histona 3 lisina 36 (H3K36me3) en mamíferos (Edmunds *et al.*, 2008; Wagner and Carpenter, 2012), regulando la expresión génica y la reparación del DNA, y jugando un papel clave en la diferenciación de células madre embrionarias y el desarrollo de células somáticas (Zhang *et al.*, 2014). Diversos estudios han reportado su importante implicación en el desarrollo y la calidad embrionaria en ratones, observándose que la delección de este gen causa acumulación de daño en el DNA que conlleva un retraso en el desarrollo embrionario temprano (Li *et al.*, 2020a) y defectos letales en la remodelación vascular embrionaria y placentaria (Hu *et al.*, 2010). De hecho, este gen es un regulador crucial del epigenoma ovocitario, determinante de la embriogénesis, y su deficiencia en ovocitos de ratón conlleva defectos en la maduración ovocitaria, incremento de las aneuploidías, y arresto del desarrollo embrionario (Li *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019). Otros estudios han evidenciado que posee un papel esencial en la fertilidad masculina, regulando la espermiogénesis en modelos murinos (Zuo *et al.*, 2018). Sin embargo, ninguno de estos genes ha sido descrito anteriormente por su posible implicación con la función endometrial. Por tanto, el presente estudio es pionero en describir un descenso en la expresión de estos genes mediada por cortisol en endometrio, lo cual podría afectar al establecimiento de la implantación y al desarrollo embrionario temprano a través de alteraciones en el adecuado

desarrollo endometrial, siendo este uno de los posibles mecanismos responsables de la reducción de las tasas de éxito de estas pacientes.

Siguiendo con el otro grupo de genes priorizados, como se puede observar en la **Figura 33**, para ambos tratamientos (0,5 μ M y 10 μ M), el cortisol disminuyó significativamente la expresión de *HBB* (p-valores= $4,471e^{-4}$ y 0,002) y *NCSTN* (p-valores= $1,489e^{-7}$ y $3,214e^{-6}$) en células endometriales estromales en cultivo al compararlas con las células no tratadas (vehículo), observándose además para este último gen un aumento significativo de su expresión al tratar las células con cortisol 10 μ M en comparación con la concentración más baja (p-valor=0,006). Por otro lado, el tratamiento de estas células con cortisol 0,5 μ M aumentó significativamente la expresión de *SNORA1* en comparación con las células no tratadas (p-valor=0,001), no viéndose este gen significativamente afectado por el tratamiento con cortisol 10 μ M. Por el contrario, al aumentar la concentración de cortisol, se observó un descenso significativo de la expresión de este gen, retornando a niveles de expresión similares a aquellos de las células sin tratar (p-valor= $2,680e^{-4}$).

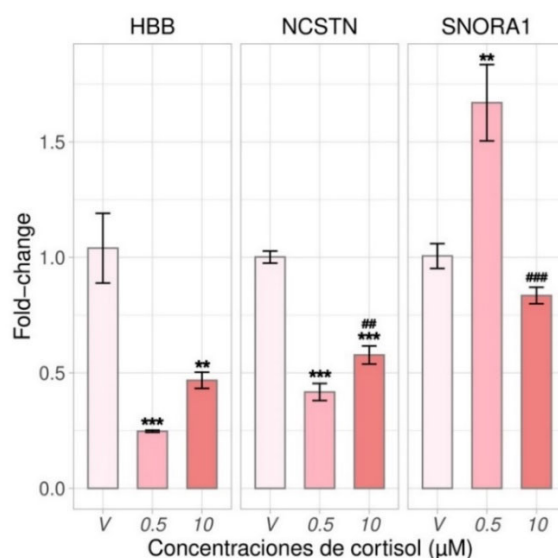


Figura 33. El cortisol afecta significativamente a la expresión de *HBB*, *NCSTN* y *SNORA1* en células endometriales estromales en cultivo. En la figura se representa la expresión relativa (Fold-change) de cada uno de los genes para cada una de las concentraciones de cortisol (0.5 μ M y 10 μ M) y el vehículo (V) y su comparación. Los asteriscos indican la significatividad de la comparación entre las concentraciones y el vehículo y su magnitud (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) y los corchetes indican la significatividad de la comparación entre ambos tratamientos y su magnitud (## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$). *HBB*: Hemoglobin Subunit Beta; *NCSTN*: Nicastrin; *SNORA1*: Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 1.

Estos resultados presentan una concordancia menor con los resultados obtenidos en el análisis Masgipro; de hecho, únicamente los resultados obtenidos para el gen *SNORA1* tratado con cortisol 0,5 μ M demuestran un aumento significativo de la expresión de este gen, siendo los resultados de los genes *HBB* y *NCSTN* contrarios. Es importante considerar que se están comparando dos modelos diferentes, empleando en uno de ellos tejido endometrial

sobre el que se analiza directamente la expresión génica por RNA-seq, y en el segundo utilizando un modelo celular tratado y en el que se evalúa la expresión génica por RT-qPCR. Por tanto, es esperable que los resultados puedan variar. Pese a eso, este estudio demuestra que el cortisol afecta significativamente a la expresión endometrial de estos genes en ambos modelos, siendo estos hallazgos de gran relevancia.

La hemoglobina es una molécula vital comunmente conocida por su capacidad de transportar oxígeno y por ser un potente antioxidante; sin embargo, sus funciones van más allá de los eritrocitos, presentando expresión también en otros tipos celulares (Lim *et al.*, 2019). Diversos estudios han descrito que el gen *HBB* presenta un papel importante en la maduración y la calidad ovocitarias y en el desarrollo embrionario preimplantacional (Brown *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2019; Makhijani *et al.*, 2023). También se ha reportado su expresión en tejido endometrial (Dassen *et al.*, 2008). La Nicastrina (*NCSTN*) constituye una subunidad de la γ -secretasa esencial para el transporte intracelular (Kuzuya *et al.*, 2016). En cáncer de mama, se ha descrito que este gen regula propiedades de células madre incluyendo la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*) mediante regulación de Notch1 (Lombardo *et al.*, 2012). La EMT es un proceso celular en el cual las células epiteliales adquieren fenotipo y comportamiento de mesenquimales, adquiriendo propiedades que promueven la migración e invasión (Yang *et al.*, 2020). Este proceso es esencial para el adecuado desarrollo y el funcionamiento normal de los órganos reproductivos femeninos, llevando su desregulación a condiciones patológicas como endometriosis, adenomiosis o cáncer, entre otras (Bilyk *et al.*, 2017). Muchas de las funciones fisiológicas clave del endometrio, incluyendo la implantación, requieren que en las células de este tejido se produzca dicha transición, permitiendo la invasión trofoblástica (Owusu-Akyaw *et al.*, 2019). Por tanto, dado que este gen se expresa en tejido endometrial, podría estar también involucrado en el correcto desarrollo de este proceso. Además, recientemente se ha propuesto a este gen como predictor de aborto recurrente (Wei *et al.*, 2022, 2023). Los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs, del inglés *small nucleolar RNAs*), como *SNORA1*, son una clase de RNAs pequeños no codificantes (sncRNAs, del inglés *small non-coding RNAs*) ampliamente presentes en los núcleos de las células eucariotas que guían modificaciones en otros RNAs, como de transferencia o ribosómicos, regulando por tanto la expresión génica (Huang *et al.*, 2022; Webster and Ghalei, 2023). Este grupo de RNAs ha despertado gran interés en los últimos años, descubriendo su asociación con algunas enfermedades relevantes, como el cáncer (Huang *et al.*, 2022). En reproducción, se ha descrito que el contenido de estos y otros sncRNAs en vesículas extracelulares del semen y del fluido uterino podrían servir como biomarcadores no invasivos tanto de calidad seminal como de receptividad endometrial y éxito reproductivo, respectivamente (Li *et al.*, 2021; Larriba *et al.*,

2023). Con todo esto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, el cortisol podría afectar a funciones endometriales clave previniendo la implantación o aumentando el riesgo de aborto a través de alteraciones en los niveles de *HBB*, *NCSTN* y *SNORA1*.

7. La edad disminuye los niveles de estrona, androstenediona y cortisol en tejido endometrial

La tercera población constaba de 9 voluntarias jóvenes (edad media 26,78 años) y sanas que completaron los cuestionarios psicológicos y pudieron ser clasificadas y emplearse para los análisis posteriores; sin embargo, sólo en 8 de ellas pudo realizarse la determinación de los niveles de metabolitos por UPLC-MS/MS debido a la insuficiente cantidad de tejido en la muestra de la novena participante (**Tabla 13**). Las participantes de esta población también se sometieron a los dos tipos de preparación endometrial: 3 de ellas a ciclo natural y 6 a THS (**Tabla 13**). En la **Tabla 13** se recogen el resto de variables demográficas de esta población, así como los niveles medios de los metabolitos medidos por UPLC-MS/MS.

Tabla 13. Características de la población de voluntarias sanas.

Variable	N (%)	Media $\pm$ sd / %
Edad (años)	9 (100%)	26,78 $\pm$ 4,32
IMC (kg/m ²)	8 (88,9%)	23,12 $\pm$ 3,22
LE (mm)	8 (88,9%)	8,25 $\pm$ 1,53
P4 (μ g/g)	8 (88,9%)	9,22 $\pm$ 8,35
E1 (ng/g)	8 (88,9%)	78,39 $\pm$ 60,44
E2 (ng/g)	8 (88,9%)	1,93 $\pm$ 1,20
A4 (ng/g)	8 (88,9%)	2,95 $\pm$ 3,57
Testosterona (ng/g)	8 (88,9%)	0,63 $\pm$ 0,39
17OHP4 (ng/g)	7 (77,8%)	5,19 $\pm$ 0,35
DHEA (ng/g)	8 (88,9%)	31,91 $\pm$ 11,47
Cortisona (ng/g)	8 (88,9%)	88.38 $\pm$ 48.07
Cortisol (ng/g)	8 (88,9%)	10.49 $\pm$ 9.91
Tipo de ciclo biopsia	9 (100%)	Nat = 3 (33,33%)
		THS = 6 (66,67%)

Las principales características demográficas de las participantes, así como los resultados de la medición de metabolitos en tejido endometrial, se muestran como el valor medio y la desviación estándar (sd), mientras que para el tipo de ciclo en el que se toma la biopsia se muestra la proporción de pacientes en cada grupo con respecto al total de pacientes. 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; LE: grosor de la línea endometrial; N: número de muestras; Nat: ciclo natural; P4: progesterona; THS: terapia hormonal sustitutiva.

Para la comparación entre la población de pacientes FIV y la de voluntarias sanas se seleccionó a aquellas no estresadas según el cuestionario STAI dimensión Estado, eliminando así el efecto del estrés sobre las concentraciones esteroideas y la expresión génica endometrial y pudiendo evaluar únicamente el efecto de otras variables. Debido al bajo tamaño muestral de la población de voluntarias y dado que todas ellas estaban caracterizadas como no estresadas según la dimensión Estado, no así por la dimensión Rasgo, se realizaron los análisis siguiendo el criterio de la dimensión Estado para no reducir todavía más el tamaño muestral de esta población. Por ello, en esta comparación se cuenta únicamente con 20 pacientes y 7 voluntarias no estresadas y con análisis transcriptómico realizado.

Tras comparar las características básicas entre ambas poblaciones, se observó una diferencia significativa en la edad media de ambas poblaciones (27,29 años vs 40,3 años, p-valor=0,0002), mostrando homogeneidad para el resto de variables evaluadas (**Tabla 14**).

Tabla 14. Comparación de características demográficas entre las pacientes FIV (población 2) y las voluntarias sanas (población 3).

Variable	N (%)	Voluntarias (n=7, 25,9%)	Pacientes (n=20, 74,1%)	p-valor
Edad (años)	27 (100%)	27,29 ± 4,82	40,3 ± 3,11	0,0002***
IMC (kg/m ²)	26 (96,3%)	23,09 ± 3,81	21,82 ± 2,31	0,345
LE (mm)	18 (66,7%)	8,57 ± 1,62	8,74 ± 1,59	0,888

Para cada variable, se indica el número de pacientes de las cuales se posee información de dicha variable y el porcentaje que representan en la totalidad de pacientes consideradas para la comparación, así como la media y la desviación típica (sd) para cada una en cada población y el p-valor obtenido en para cada comparación. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (***p≤ 0,001). IMC: índice de masa corporal; LE: grosor de la línea endometrial.

Posteriormente, se evaluó si ambas poblaciones presentaban diferencias en las concentraciones de hormonas esteroideas en el microambiente endometrial no debidas al efecto del estrés. Tal y como se recoge en la **Tabla 15**, los niveles de E1, A4 y cortisol resultaron significativamente más elevados en las voluntarias que en las pacientes FIV, describiendo por primera vez el impacto de la edad en los niveles de esteroides en el microambiente endometrial.

Tabla 15. La edad disminuye las concentraciones de estrona, androstenediona y cortisol en tejido endometrial.

Metabolito	N	Voluntarias (n=7, 25,9%)	Pacientes (n=20, 74,1%)	p-valor
P4 (µg/g)	26 (96,3%)	9,40 (0,02-19,49)	3,97 (0,02-169,69)	0,866
E1 (ng/g)	27 (100%)	52,4 (44,2-222,3)	35,75 (26-52)	0,0008***
E2 (ng/g)	20 (74.1%)	1,60 (0,80-4,40)	1,80 (0,40-2,80)	1,000
A4 (ng/g)	27 (100%)	1,30 (0,20-10,70)	0,45 (0,10-6,70)	0,039*
T (ng/g)	26 (96,3%)	0,60 (0,20-0,70)	0,30 (0,10-2,20)	0,254
DHEA (ng/g)	27 (100%)	35,60 (12,40-50,50)	21,50 (9,10-45)	0,064
17OHP4 (ng/g)	21 (77,8%)	1,90 (0,70-15,50)	1,10 (0,20-4,40)	0,185
Cortisona (ng/g)	27 (100%)	77 (17-170)	80,50 (21-171)	0,956
Cortisol (ng/g)	27 (100%)	7,40 (2,90-34,50)	4,80 (0,80-30,90)	0,049*

Comparación de la mediana de la concentración de metabolitos endometriales entre las pacientes FIV y las voluntarias. Para cada metabolito, se indica el número de pacientes de ambas poblaciones en los que se ha detectado dicho metabolito y el porcentaje que representan con respecto al total, así como la mediana y el rango (mínimo, máximo) para cada uno de ellos en cada grupo y el p-valor obtenido en el test de Wilcoxon para cada comparación. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; P4: progesterona; T: testosterona.

Estudios anteriores ya habían reportado descensos en los niveles de E1 (Rothman *et al.*, 2011) y A4 (Haring *et al.*, 2012) con la edad en suero. Este estudio demuestra, de forma pionera, que los descensos en los niveles estrogénicos y androgénicos asociados a la edad de la mujer también se ven reflejados a nivel endometrial. Por otro lado, contrariando nuestros resultados, diversos estudios han evidenciado aumentos en los niveles de cortisol en suero (Roelfsema *et al.*, 2017) con la edad, debido principalmente a una reducción en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal al *feedback* negativo del cortisol con el envejecimiento (Stamou *et al.*, 2023). En orina, se ha descrito un descenso entre los 20 y 30 años, una estabilidad entre los 40 y 50, y un aumento a partir de dicha edad (Moffat *et al.*, 2020). Debido a la producción intracrinológica endometrial independiente de la secreción en suero (Huhtinen *et al.*, 2012, 2014; Labarta *et al.*, 2021), el impacto de la edad en la producción hormonal en endometrio podría diferir frente al de suero y orina. Dado que la edad es uno de los factores que más afectan a la reducción en las tasas de embarazo, incluso en aquellas mujeres dentro de un programa de ovodonación (Marti-Garcia *et al.*, 2024), los cambios en los niveles hormonales del microambiente endometrial podrían ser una de las causas del empeoramiento en los resultados reproductivos en dicho grupo de pacientes.

Cabe destacar que dentro de la población de pacientes FIV (población 2) no encontramos diferencias significativas de edad entre aquellas pacientes que logran un embarazo a término y las que no; por tanto, las diferencias en los niveles de cortisol, E1 y A4 relacionadas con los resultados reproductivos discutidas anteriormente en dicha población no se ven influenciadas por la edad, dado que todas estas pacientes FIV se encuentran dentro de un rango de edad similar.

En la comparación de la caracterización transcriptómica de ambas poblaciones, que comenzó con un análisis exploratorio de qué variables presentaban una influencia importante en la expresión génica, se observó una clara separación de las pacientes de la población 2 que lograban un embarazo a término y las que no, al representarlas en un PCA, como se refleja en la **Figura 34**.

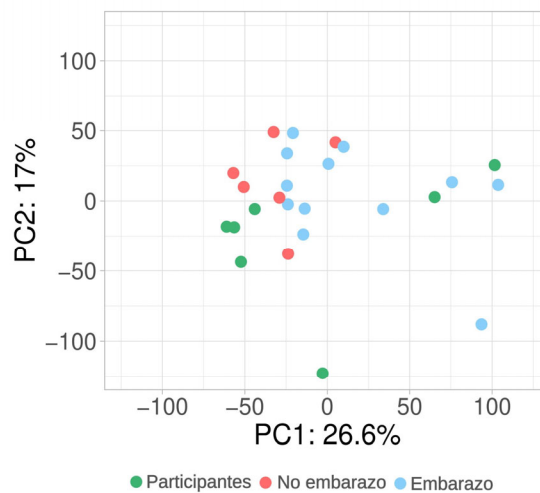


Figura 34. La expresión génica de las pacientes FIV se encuentra influida por los resultados reproductivos. El gráfico de análisis de componentes principales (PCA) incluye las 27 muestras consideradas en la comparación actual que pertenecen a la población 3 ($n=7$) y la población 2 ($n=20$), separando a las de esta última población de acuerdo al resultado reproductivo obtenido en la primera transferencia embrionaria posterior a la toma de la biopsia. Como se puede observar, el comportamiento transcriptómico de las muestras de dichas pacientes difiere en función de si lograban un embarazo a término o no. En ambos gráficos, los puntos de color verde representan a las participantes, mientras que los puntos rojos y azules representan a las pacientes con transferencia embrionaria posterior a la toma de la biopsia y resultado de embarazo no a término y embarazo a término, respectivamente. El eje X representa la variabilidad (%) de los datos en la primera componente (PC1) y el eje Y en la segunda componente (PC2).

Sin embargo, no podemos saber si las posibles diferencias a nivel de expresión génica entre ambas poblaciones son consecuencia de la diferencia de edad o de la diferencia de fertilidad entre ellas. Por tanto, sería necesario realizar otro tipo de diseño experimental que permitiera evaluar el efecto de la edad en la expresión génica endometrial sin verse influenciado por el propio efecto de la fertilidad.

8. Fortalezas y limitaciones

La presente tesis doctoral evalúa de forma innovadora la intracrinología endometrial, demostrando que una adecuada regulación de este proceso es necesaria para la consecución de un embarazo. Dado que las diferentes hormonas esteroideas se producen en la misma ruta biosintética, cambios en los niveles de unas hormonas podrían afectar al resto. Este es el primer estudio que, teniendo en cuenta dicha premisa, analiza un numeroso grupo de forma conjunta demostrando que no actúan de forma independiente.

Refuerza además el papel clave del cortisol en la respuesta al estrés, mostrando por primera vez su relación a nivel endometrial y su impacto sobre el éxito reproductivo, y demostrando que efectivamente aquellas pacientes con niveles elevados de esta hormona en el microambiente endometrial presentan un riesgo exacerbado de no lograr un embarazo a término. Adicionalmente, y de forma pionera, resalta otros metabolitos esteroideos por su relación con el estrés, demostrando que desbalances en los niveles hormonales endometriales frente a una situación de estrés podrían afectar negativamente a la función endometrial, reduciendo las tasas de éxito en los tratamientos reproductivos.

Propone de forma pionera la evaluación no invasiva de las pacientes mediante el cuestionario psicológico STAI, dado que este refleja de forma significativa las variaciones en los niveles esteroideos endometriales, los cuales se ven alterados en aquellas pacientes que no logran un embarazo. Asimismo, es el primer estudio en evaluar los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas esteroideas endometriales afectan a la función reproductiva, demostrando que funciones clave para el proceso de implantación embrionaria como la adhesión, la respuesta inmune, la apoptosis o la señalización, entre otras, se encuentran desreguladas en respuesta a cambios en las concentraciones de las hormonas.

Sin embargo, a pesar de la clara novedad y relevancia de los resultados obtenidos en este estudio, está limitado por el tamaño muestral, debido a la complejidad del diseño del estudio y a la gran cantidad de factores por los que se ve afectado. Las asociaciones no significativas podrían serlo y no quedar reflejadas en nuestro estudio, limitadas por el tamaño muestral y la potencia estadística. Por ejemplo, en el caso de la progesterona, estudios anteriores han demostrado su correlación con la progresión endometrial (Labarta *et al.*, 2021). Sin embargo, en nuestro estudio, al separar a las pacientes por grupos de preparación endometrial debido a la clara influencia de estos en sus niveles, se ha producido una reducción en el tamaño muestral que podría estar impidiendo la obtención de resultados significativos. Por tanto, los

resultados significativos obtenidos presentan real significancia dado que se han obtenido con una potencia estadística pequeña, pero no podemos afirmar que las relaciones no significativas no se estén dando realmente.

Con todo esto, por un lado, se ha aportado conocimiento a la comunidad científica acerca de la relación entre el estrés y la infertilidad, ahondando en los cambios fisiológicos y los mecanismos moleculares subyacentes a estos cambios y que impiden que el proceso de implantación se lleve a cabo de forma adecuada, pero además, se ha propuesto una metodología no invasiva de clasificación de pacientes que refleja tanto los cambios psicológicos como los fisiológicos potencialmente aplicable a la práctica clínica, iniciando así la transición hacia una medicina de precisión en la que se ponga el foco en el bienestar emocional de las pacientes para la mejora del éxito de los tratamientos y la reducción de las tasas de abandono.





CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

De la presente tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las concentraciones de hormonas esteroideas en tejido endometrial se encuentran relacionadas con las probabilidades de lograr un embarazo a término. Concretamente, concentraciones elevadas de estrógenos y concentraciones bajas de andrógenos y corticosteroides favorecen la consecución de un embarazo.
2. Los niveles endometriales de cortisol y estrona son significativamente mayores entre las pacientes con estrés puntual (Estado), mientras que los de estradiol son mayores en aquellas pacientes no estresadas. En cuanto al estrés a largo plazo (Rasgo), los niveles endometriales de DHEA y estrona son mayores en las pacientes no estresadas. Por tanto, cada tipo de estrés afecta en mayor medida a una región diferente de la ruta de síntesis de hormonas esteroideas.
3. El cuestionario STAI puede emplearse como una herramienta no invasiva para la evaluación de los niveles de esteroides endometriales en pacientes FIV, dado que existe una alta correlación significativa entre las puntuaciones del test y los niveles de cortisol y estradiol, permitiendo detectar de forma preventiva a aquellas pacientes que se beneficiarían de un tratamiento psicológico previo a la transferencia embrionaria para maximizar el éxito reproductivo y reducir las tasas de abandono de los tratamientos.
4. Alteraciones en los niveles endometriales de cortisol, estrona, estradiol y DHEA conllevan alteraciones en la expresión de genes involucrados en funciones clave para la competencia endometrial, la implantación y el desarrollo embrionario temprano como la respuesta inmune, la proliferación, migración y diferenciación celular, la adhesión y la decidualización, entre otras.
5. El estrés a largo plazo tiene un mayor efecto en la alteración de los patrones de expresión génica endometrial que el estrés a corto plazo. Concretamente, aumentos en los niveles de estrés a largo plazo provocan alteraciones en la expresión de genes implicados en inflamación, sistema inmune, coagulación y adhesión, funciones clave para la implantación y el desarrollo embrionario.
6. Los resultados de este trabajo abren la puerta al desarrollo de protocolos estandarizados de trabajo en la evaluación preventiva de las pacientes y el desarrollo de terapias para tratar a aquellas pacientes que lo necesiten, evaluando la capacidad de éstas para lograr la restauración del microambiente endometrial y el aumento de las tasas de éxito.





REFERENCIAS



REFERENCIAS

- Acconcia F, Marino M. Steroid Hormones: Synthesis, Secretion, and Transport. In Belfiore A, LeRoith D, editors. *Princ Endocrinol Horm Action* [Internet] 2018;; p. 43–72. Springer International Publishing: Cham Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_4.
- Agrawala PK, Rana P. CHAPTER 1. Metabolomics techniques: A brief update. *Epigenetics Metabolomics* 2021;; p. 1–29. Elsevier.
- Aikawa S, Hirota Y, Fukui Y, Ishizawa C, Iida R, Kaku T, Hirata T, Akaeda S, Hiraoka T, Matsuo M, *et al.* A gene network of uterine luminal epithelium organizes mouse blastocyst implantation. *Reprod Med Biol* 2022;**21**:e12435.
- Aimagambetova G, Issanov A, Terzic S, Bapayeva G, Ukybassova T, Baikoshkarova S, Aldiyarova A, Shauyen F, Terzic M. The effect of psychological distress on IVF outcomes: Reality or speculations? *PLoS ONE* 2020;**15**:e0242024.
- Albert K, Pruessner J, Newhouse P. Estradiol levels modulate brain activity and negative responses to psychosocial stress across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology* 2015;**59**:14–24.
- Albert KM, Newhouse PA. Estrogen, Stress, and Depression: Cognitive and Biological Interactions. *Annu Rev Clin Psychol* 2019;**15**:399–423.
- Alsaif HS, Al Ali H, Faqeih E, Ramadan SM, Barth M, Colin E, Prouteau C, Bonneau D, Ziegler A, Alkuraya FS. ZNF668 deficiency causes a recognizable disorder of DNA damage repair. *Hum Genet* 2021;**140**:1395–1401.
- Alur V, Raju V, Vastrad B, Tengli A, Vastrad C, Kotturshetti S. Integrated bioinformatics analysis reveals novel key biomarkers and potential candidate small molecule drugs in gestational diabetes mellitus. *Biosci Rep* 2021;**41**:BSR20210617.
- An Y, Sun Z, Li L, Zhang Y, Ji H. Relationship between psychological stress and reproductive outcome in women undergoing in vitro fertilization treatment: Psychological and neurohormonal assessment. *J Assist Reprod Genet* 2013;**30**:35–41.
- Andrews S. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. 2020;Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Arora R, Kim J-H, Getu AA, Angajala A, Chen Y-L, Wang B, Kahn AG, Chen H, Reshi L, Lu J, *et al.* MST4: A Potential Oncogene and Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cells* 2022;**11**:4057. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 2000;**25**:25–29.
- Attar E, Tokunaga H, Imir G, Yilmaz MB, Redwine D, Putman M, Gurates B, Attar R, Yaegashi N, Hales DB, *et al.* Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:623–631.

- Audet-Delage Y, Grégoire J, Caron P, Turcotte V, Plante M, Ayotte P, Simonyan D, Villeneuve L, Guillemette C. Estradiol metabolites as biomarkers of endometrial cancer prognosis after surgery. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018;**178**:45–54.
- Bagade T, Mersha AG, Majeed T. The social determinants of mental health disorders among women with infertility: a systematic review. *BMC Womens Health* 2023;**23**:668.
- Bahar L, Kahraman S, Eras N, Pirkevi C. Comparison of endometrial biopsies of fertile women and women with repeated implantation failure at the ultrastructural level. *Turk J Med Sci* 2015;**45**:706–713.
- Balandina AN, Koltsova EM, Teterina TA, Yakovenko AG, Simonenko EU, Poletaev AV, Zorina IV, Shibeko AM, Vuimo TA, Yakovenko SA, *et al.* An enhanced clot growth rate before in vitro fertilization decreases the probability of pregnancy. *PloS One* 2019;**14**:e0216724.
- Bartosch C, Lopes JM, Beires J, Sousa M. Human Endometrium Ultrastructure During the Implantation Window: A New Perspective of the Epithelium Cell Types. *Reprod Sci* 2011;**18**:525–539.
- Beck AT, Beamesderfer A. Assessment of depression: the depression inventory. *Mod Probl Pharmacopsychiatry* 1974;**7**:151–169.
- Bellver J, Ayllón Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, Remohí J, Meseguer M. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril* 2010;**93**:447–454.
- Bellver J, Marín C, Lathi RB, Murugappan G, Labarta E, Vidal C, Giles J, Cabanillas S, Marzal A, Galliano D, *et al.* Obesity Affects Endometrial Receptivity by Displacing the Window of Implantation. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2021;**28**:3171–3180.
- Bellver J, Melo MAB, Bosch E, Serra V, Remohí J, Pellicer A. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril* 2007;**88**:446–451.
- Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992;**58**:537–542.
- Bhattacharjee R, Goswami S, Dey S, Gangoda M, Brothag C, Eisa A, Woodgett J, Phiel C, Kline D, Vijayaraghavan S. Isoform-specific requirement for GSK3 α in sperm for male fertility†. *Biol Reprod* 2018;**99**:384–394.
- Bhattacharjee R, Goswami S, Dudiki T, Popkie AP, Phiel CJ, Kline D, Vijayaraghavan S. Targeted disruption of glycogen synthase kinase 3A (GSK3A) in mice affects sperm motility resulting in male infertility. *Biol Reprod* 2015;**92**:65.
- Bhaumik S, Lockett J, Cuffe J, Clifton VL. Glucocorticoids and Their Receptor Isoforms: Roles in Female Reproduction, Pregnancy, and Foetal Development. *Biology* 2023;**12**:1104.
- Bilyk O, Coatham M, Jewer M, Postovit L-M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Female Reproductive Tract: From Normal Functioning to Disease Pathology. *Front Oncol* 2017;**7**:145.
- Boeddeker SJ, Hess AP. The role of apoptosis in human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2015;**108**:114–122.

- Boivin J, Takefman J, Braverman A. The fertility quality of life (FertiQoL) tool: development and general psychometric properties. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;**26**:2084–2091.
- Boivin J, Takefman JE. Stress level across stages of in vitro fertilization in subsequently pregnant and nonpregnant women. *Fertil Steril* 1995;**64**:802–810.
- Boyle P, Andralojc K, Velden S van der, Najmabadi S, Groot T de, Turczynski C, Stanford JB. Restoration of serum estradiol and reduced incidence of miscarriage in patients with low serum estradiol during pregnancy: a retrospective cohort study using a multifactorial protocol including DHEA. *Front Reprod Health* 2023;**5**:1321284.
- Bremer AA, Miller WL. Chapter 13-Regulation of Steroidogenesis. *Cell Endocrinol Health Dis* 2014;; p. 207–229. Academic Press.
- Brown HM, Anastasi MR, Frank LA, Kind KL, Richani D, Robker RL, Russell DL, Gilchrist RB, Thompson JG. Hemoglobin: a gas transport molecule that is hormonally regulated in the ovarian follicle in mice and humans. *Biol Reprod* 2015;**92**:26.
- Bushel P. pvca: Principal Variance Component Analysis (PVCA). 2020;Available from: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/pvca.html>.
- Campagne D. Psiconeuroendocrinología de la Infertilidad. *Boletín Soc Esp Fertil* 2002;
- Çelik Ö, Acet M, İmren A, Çelik N, Erşahin A, Aktun LH, Otlı B, Çelik S, Çalışkan E, Ünlü C. DHEA supplementation improves endometrial HOXA-10 mRNA expression in poor responders. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2017;**18**:160–166.
- Cerny KL, Ribeiro RAC, Jeoung M, Ko C, Bridges PJ. Estrogen Receptor Alpha (ESR1)-Dependent Regulation of the Mouse Oviductal Transcriptome. *PLoS ONE* 2016;**11**:e0147685.
- Cesta CE, Johansson ALV, Hreinsson J, Rodriguez-Wallberg KA, Olofsson JI, Holte J, Wramsby H, Wramsby M, Cnattingius S, Skalkidou A, *et al*. A prospective investigation of perceived stress, infertility-related stress, and cortisol levels in women undergoing in vitro fertilization: influence on embryo quality and clinical pregnancy rate. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2018;**97**:258–268.
- Chan HY, Tran HM, Breen J, Schjenken JE, Robertson SA. The endometrial transcriptome transition preceding receptivity to embryo implantation in mice. *BMC Genomics* 2023;**24**:590.
- Chan J, Rabbitt EH, Innes BA, Bulmer JN, Stewart PM, Kilby MD, Hewison M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human decidua: a novel role for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in late gestation. *J Endocrinol* 2007;**195**:7–15. BioScientifica.
- Chen C, Xu Q, Zhang Y, Davies BA, Huang Y, Katzmann DJ, Harris PC, Hu J, Ling K. Ciliopathy protein HYLS1 coordinates the biogenesis and signaling of primary cilia by activating the ciliary lipid kinase PIPK1 γ . *Sci Adv* 2021;**7**:eabe3401.
- Chen H, Chen Y, Zheng Q. The regulated cell death at the maternal-fetal interface: beneficial or detrimental? *Cell Death Discov* 2024;**10**:1–13. Nature Publishing Group.
- Chen Q. P-758 Impact of serum estradiol levels prior to progesterone administration in artificial frozen embryo transfer cycles:a retrospective study over 26,000 cycles. *Hum Reprod* 2023;**38**:dead093.1071.

- Chen S, Zhang A, Li N, Wu H, Li Y, Liu S, Yan Q. Elevated high-mannose N-glycans hamper endometrial decidualization. *iScience* 2023;**26**:108170.
- Chen T-H, Chang S-P, Tsai C-F, Juang K-D. Prevalence of depressive and anxiety disorders in an assisted reproductive technique clinic. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;**19**:2313–2318.
- Chen Y, Lun ATL, Smyth GK. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research* 2016;**5**:1438.
- Cheng Y-J, Lin C-H, Lane H-Y. From Menopause to Neurodegeneration—Molecular Basis and Potential Therapy. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:8654. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Chern C-U, Tsui K-H, Vitale SG, Chen S-N, Wang P-H, Cianci A, Tsai H-W, Wen Z-H, Lin L-T. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation improves in vitro fertilization outcomes of poor ovarian responders, especially in women with low serum concentration of DHEA-S: a retrospective cohort study. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2018;**16**:90.
- Chien J, Staub J, Avula R, Zhang H, Liu W, Hartmann LC, Kaufmann SH, Smith DI, Shridhar V. Epigenetic silencing of TCEAL7 (Bex4) in ovarian cancer. *Oncogene* 2005;**24**:5089–5100.
- Clifton J, Parent J, Seehuus M, Worrall G, Forehand R, Domar A. An internet-based mind/body intervention to mitigate distress in women experiencing infertility: A randomized pilot trial. *PloS One* 2020;**15**:e0229379.
- Comstock IA, Diaz-Gimeno P, Cabanillas S, Bellver J, Sebastian-Leon P, Shah M, Schutt A, Valdes CT, Ruiz-Alonso M, Valbuena D, *et al*. Does an increased body mass index affect endometrial gene expression patterns in infertile patients? A functional genomics analysis. *Fertil Steril* 2017;**107**:740-748.e2.
- Conesa A, Nueda MJ, Ferrer A, Talón M. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinforma Oxf Engl* 2006;**22**:1096–1102.
- Cornel KMC, Bongers MY, Kruitwagen RPFM, Romano A. Local estrogen metabolism (intracrinology) in endometrial cancer: A systematic review. *Mol Cell Endocrinol* 2019;**489**:45–65.
- Craciunas L, Gallos I, Chu J, Bourne T, Quenby S, Brosens JJ, Coomarasamy A. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;**25**:202–223.
- Dai S, Mo Y, Wang Y, Xiang B, Liao Q, Zhou M, Li X, Li Y, Xiong W, Li G, *et al*. Chronic Stress Promotes Cancer Development. *Front Oncol* 2020;**10**:1492.
- Dassen H, Kamps R, Punyadeera C, Dijcks F, Goeij A de, Ederveen A, Dunselman G, Groothuis P. Haemoglobin expression in human endometrium. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:635–641.

- Devesa-Peiro A. Comparative study of molecular processes and factors affecting endometrial function in subfertile patients with uterine disorders. 2021; Universidad de Valencia: Valencia.
- Devesa-Peiro A, Sebastian-Leon P, Garcia-Garcia F, Arnau V, Aleman A, Pellicer A, Diaz-Gimeno P. Uterine disorders affecting female fertility: what are the molecular functions altered in endometrium? *Fertil Steril* 2020;**113**:1261–1274.
- Devesa-Peiro A, Sebastian-Leon P, Parraga-Leo A, Pellicer A, Diaz-Gimeno P. Breaking the ageing paradigm in endometrium: endometrial gene expression related to cilia and ageing hallmarks in women over 35 years. *Hum Reprod Oxf Engl* 2022;**37**:762–776.
- Devjak R, Fon Tacer K, Juvan P, Virant Klun I, Rozman D, Vrtačnik Bokal E. Cumulus cells gene expression profiling in terms of oocyte maturity in controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. *PloS One* 2012;**7**:e47106.
- Dey S, Eisa A, Kline D, Wagner FF, Abeysirigunawardena S, Vijayaraghavan S. Roles of glycogen synthase kinase 3 alpha and calcineurin in regulating the ability of sperm to fertilize eggs. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2020;**34**:1247–1269.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;**29**:15–21.
- Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 2000;**60–61**:743–752.
- Dolz P, Garcia A. Incidencia positiva de los Programas de Apoyo Psicológicos en los tratamientos de reproducción asistida. *Rev Iberoam Fertil Reprod Humana* 2002;**24**:233.
- Domar AD, Rooney KL, Wiegand B, Orav EJ, Alper MM, Berger BM, Nikolovski J. Impact of a group mind/body intervention on pregnancy rates in IVF patients. *Fertil Steril* 2011;**95**:2269–2273.
- Domar AD, Seibel MM, Benson H. The mind/body program for infertility: a new behavioral treatment approach for women with infertility. *Fertil Steril* 1990;**53**:246–249.
- Domar AD, Zuttermeister PC, Friedman R. The psychological impact of infertility: a comparison with patients with other medical conditions. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 1993;**14 Suppl**:45–52.
- Du Y-R, Yang K, Liu J. Effects of serum estrogen levels before frozen-thawed blastocyst transfer on pregnancy outcomes in hormone replacement cycles. *Sci Rep* 2023;**13**:1194.
- Dugourd A, Saez-Rodriguez J. Footprint-based functional analysis of multiomic data. *Curr Opin Syst Biol* 2019;**15**:82–90.
- Ebbesen SMS, Zachariae R, Mehlsen MY, Thomsen D, Højgaard A, Ottosen L, Petersen T, Ingerslev HJ. Stressful life events are associated with a poor in-vitro fertilization (IVF) outcome: a prospective study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2009;**24**:2173–2182.
- Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J* 2008;**27**:406–420.

- Enquobahrie DA, Qiu C, Muhie SY, Williams MA. Maternal peripheral blood gene expression in early pregnancy and preeclampsia. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011;**2**:78–94.
- Erguler K. Barnard: Barnard's Unconditional Test. 2016;Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/Barnard/index.html>.
- Fallahzadeh H, Zareei Mahmood Abadi H, Momayyezi M, Malaki Moghadam H, Keyghobadi N. The comparison of depression and anxiety between fertile and infertile couples: A meta-analysis study. *Int J Reprod Biomed* 2019;**17**:153–162.
- Fanelli F, Di Dalmazi G. Serum steroid profiling by mass spectrometry in adrenocortical tumors: diagnostic implications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2019;**26**:160.
- Fanos V. 4. The “-omics” technologies. *Metabolomics Microbiomics Pers Med Fetus Adult* 2016;, p. 19–35. Academic Press.
- Fathi M, Ghahghaei-Nezamabadi A, Ghafouri-Fard S. Emerging role of lncRNAs in the etiology of recurrent implantation failure. *Pathol - Res Pract* 2024;**253**:155057.
- Fusi FM, Ferrario M, Bosisio C, Arnoldi M, Zanga L. DHEA supplementation positively affects spontaneous pregnancies in women with diminished ovarian function. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2013;**29**:940–943.
- Galhardo A, Cunha M, Pinto-Gouveia J. Mindfulness-Based Program for Infertility: efficacy study. *Fertil Steril* 2013;**100**:1059–1067.
- Gameiro S, Boivin J, Dancet E, Klerk C de, Emery M, Lewis-Jones C, Thorn P, Van den Broeck U, Venetis C, Verhaak CM, *et al*. ESHRE guideline: routine psychosocial care in infertility and medically assisted reproduction—a guide for fertility staff†. *Hum Reprod* 2015;**30**:2476–2485.
- Gameiro S, Boivin J, Domar A. Optimal in vitro fertilization in 2020 should reduce treatment burden and enhance care delivery for patients and staff. *Fertil Steril* 2013;**100**:302–309.
- Gameiro S, Boivin J, Peronace L, Verhaak CM. Why do patients discontinue fertility treatment? A systematic review of reasons and predictors of discontinuation in fertility treatment. *Hum Reprod Update* 2012;**18**:652–669.
- Gerotziafas GT, Van Dreden P, Mathieu d'Argent E, Lefkou E, Grusse M, Comtet M, Sangare R, Ketatni H, Larsen AK, Elalamy I. Impact of blood hypercoagulability on in vitro fertilization outcomes: a prospective longitudinal observational study. *Thromb J* 2017;**15**:9.
- Ghayee HK, Auchus RJ. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;**8**:289–300.
- Gibson DA, McInnes KJ, Critchley HOD, Saunders PTK. Endometrial Intracrinology--generation of an estrogen-dominated microenvironment in the secretory phase of women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:E1802-1806.
- Gibson DA, Simitsidellis I, Collins F, Saunders PTK. Androgens, oestrogens and endometrium: a fine balance between perfection and pathology. *J Endocrinol* 2020;**246**:R75–R93.

- Gibson DA, Simitsidellis I, Cousins FL, Critchley HOD, Saunders PTK. Intracrine Androgens Enhance Decidualization and Modulate Expression of Human Endometrial Receptivity Genes. *Sci Rep* 2016;**6**:19970.
- Gibson DA, Simitsidellis I, Kelepouri O, Critchley HOD, Saunders PTK. Dehydroepiandrosterone enhances decidualization in women of advanced reproductive age. *Fertil Steril* 2018;**109**:728-734.e2. Elsevier.
- Gill P, Ata B, Arnanz A, Cimadomo D, Vaiarelli A, Fatemi HM, Ubaldi FM, Garcia-Velasco JA, Seli E. Does recurrent implantation failure exist? Prevalence and outcomes of five consecutive euploid blastocyst transfers in 123 987 patients. *Hum Reprod* 2024;**39**:974–980.
- Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;**20**:235–244.
- Gomez-Gomez A, Pozo OJ. Determination of steroid profile in hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2020;**1624**:461179.
- Guerra D. *Cómo afrontar la infertilidad*. 2002; Planeta: Barcelona.
- Gürhan N, Akyüz A, Atici D, Kisa S. Association of depression and anxiety with oocyte and sperm numbers and pregnancy outcomes during in vitro fertilization treatment. *Psychol Rep* 2009;**104**:796–806.
- Handelsman DJ, Teede HJ, Desai R, Norman RJ, Moran LJ. Performance of mass spectrometry steroid profiling for diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2017;**32**:418–422.
- Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski H, Owen L, Adaway J, Keevil BG, Brabant G. Age-Specific Reference Ranges for Serum Testosterone and Androstenedione Concentrations in Women Measured by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:408–415.
- Harper MJ. The implantation window. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992;**6**:351–371.
- Hausknecht V, Osa EL de la, Gursipe E. *In vitro* metabolism of C19 steroids in human endometrium. *J Steroid Biochem* 1982;**17**:621–629.
- Herman JP. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci* 2013;**7**:61.
- Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* 2016;**6**:603–621.
- Herrera AY, Nielsen SE, Mather M. Stress-induced increases in progesterone and cortisol in naturally cycling women. *Neurobiol Stress* 2016;**3**:96–104.
- Hines JM, Bancos I, Bancos C, Singh RD, Avula AV, Young WF, Grebe SK, Singh RJ. High-Resolution, Accurate-Mass (HRAM) Mass Spectrometry Urine Steroid Profiling in the Diagnosis of Adrenal Disorders. *Clin Chem* 2017;**63**:1824–1835.
- Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the

- endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:4500–4510.
- Hou Y, Wu Z, Zhang Y, Chen H, Hu J, Guo Y, Peng Y, Wei Q. Functional Analysis of Hydrolethalus Syndrome Protein HYLS1 in Ciliogenesis and Spermatogenesis in *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol* 2020;**8**:301.
- Hu M, Sun X-J, Zhang Y-L, Kuang Y, Hu C-Q, Wu W-L, Shen S-H, Du T-T, Li H, He F, *et al*. Histone H3 lysine 36 methyltransferase Hypb/Setd2 is required for embryonic vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:2956–2961.
- Hu R, Peng G, Dai H, Breuer E-K, Stemke-Hale K, Li K, Gonzalez-Angulo AM, Mills GB, Lin S-Y. ZNF668 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability and function in breast cancer. *Cancer Res* 2011;**71**:6524–6534.
- Hu R, Wang E, Peng G, Dai H, Lin S-Y. Zinc finger protein 668 interacts with Tip60 to promote H2AX acetylation after DNA damage. *Cell Cycle Georget Tex* 2013;**12**:2033–2041.
- Huang Z, Du Y, Wen J, Lu B, Zhao Y. snoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology. *Cell Death Discov* 2022;**8**:1–10. Nature Publishing Group.
- Hudson QJ, Proestling K, Perricos A, Kuessel L, Husslein H, Wenzl R, Yotova I. The Role of Long Non-Coding RNAs in Endometriosis. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:11425.
- Huhtinen K, Desai R, Ståhle M, Salminen A, Handelsman DJ, Perheentupa A, Poutanen M. Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:4228–4235.
- Huhtinen K, Saloniemi-Heinonen T, Keski-Rahkonen P, Desai R, Laajala D, Ståhle M, Häkkinen MR, Awosanya M, Suvitie P, Kujari H, *et al*. Intra-tissue steroid profiling indicates differential progesterone and testosterone metabolism in the endometrium and endometriosis lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:E2188-2197.
- Iannotti MJ, Figard L, Sokac AM, Sifers RN. A Golgi-localized Mannosidase (MAN1B1) Plays a Non-enzymatic Gatekeeper Role in Protein Biosynthetic Quality Control *. *J Biol Chem* 2014;**289**:11844–11858. Elsevier.
- Illumina. AmpliSeq for Illumina Sequencing Solution. 2022;Available from: <https://www.illumina.com/products/by-brand/ampliseq.html>.
- Illumina. AmpliSeq for Illumina Transcriptome Human Gene Expression Panel. 2021a;Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/ampliseq-transcriptome-gene-expression-panel.html>.
- Illumina. FastQC. 2021b;Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/fastqc.html>.
- Ising M, Holsboer F. Genetics of stress response and stress-related disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 2006;**8**:433–444.
- Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrom Rev* 2019;**38**:221–238.

- Jain V, Chodankar RR, Maybin JA, Critchley HOD. Uterine bleeding: how understanding endometrial physiology underpins menstrual health. *Nat Rev Endocrinol* 2022;**18**:290–308. Nature Publishing Group.
- Jiang X, Zhong W, An H, Fu M, Chen Y, Zhang Z, Xiao Z. Attenuated DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in individuals with depressive disorders. *J Affect Disord* 2017;**215**:118–124.
- Jin Q, Ma RCW. Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies. *Cells* 2021;**10**:2832.
- Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans R Soc Math Phys Eng Sci* 2016;**374**:20150202.
- Jones RE, Lopez KH. *Human Reproductive Biology*. 2013; Academic Press.
- Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**:27–30.
- Khoramipour K, Sandbakk Ø, Keshteli AH, Gaeini AA, Wishart DS, Chamari K. Metabolomics in Exercise and Sports: A Systematic Review. *Sports Med Auckl NZ* 2022;**52**:547–583.
- Kim JY, Song H, Kim H, Kang HJ, Jun JH, Hong SR, Koong MK, Kim IS. Transcriptional Profiling with a Pathway-Oriented Analysis Identifies Dysregulated Molecular Phenotypes in the Endometrium of Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:1416–1426.
- Kim SY, Romero R, Tarca AL, Bhatti G, Kim CJ, Lee J, Elsey A, Than NG, Chaiworapongsa T, Hassan SS, *et al*. Methyome of Fetal and Maternal Monocytes and Macrophages at the Feto-Maternal Interface. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2012;**68**:8–27.
- Klemetti R, Raitanen J, Sihvo S, Saarni S, Koponen P. Infertility, mental disorders and well-being--a nationwide survey. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;**89**:677–682.
- Klerk C de, Hunfeld J a. M, Heijnen EMEW, Eijkemans MJC, Fauser BCJM, Passchier J, Macklon NS. Low negative affect prior to treatment is associated with a decreased chance of live birth from a first IVF cycle. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:112–116.
- Klonoff-Cohen H, Chu E, Natarajan L, Sieber W. A prospective study of stress among women undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 2001;**76**:675–687.
- Klonoff-Cohen H, Natarajan L. The concerns during assisted reproductive technologies (CART) scale and pregnancy outcomes. *Fertil Steril* 2004;**81**:982–988.
- Kong N, Liu J, Zhang C, Jiang Y, Zhu Y, Yan G, Sun H, Huang C. The relationship between serum oestrogen levels and clinical outcomes of hormone replacement therapy-frozen embryo transfer: a retrospective clinical study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022;**22**:265.
- Konings G, Brentjens L, Delvoux B, Linnanen T, Cornel K, Koskimies P, Bongers M, Kruitwagen R, Xanthoulea S, Romano A. Intracrine Regulation of Estrogen and Other Sex Steroid Levels in Endometrium and Non-gynecological Tissues; Pathology, Physiology, and Drug Discovery. *Front Pharmacol* 2018;**9**:940.

- Koot YEM, Hooff SR van, Boomsma CM, Leenen D van, Groot Koerkamp MJA, Goddijn M, Eijkemans MJC, Fauser BCJM, Holstege FCP, Macklon NS. An endometrial gene expression signature accurately predicts recurrent implantation failure after IVF. *Sci Rep* 2016;**6**:19411.
- Koszegi Z, Cheong RY. Targeting the non-classical estrogen pathway in neurodegenerative diseases and brain injury disorders. *Front Endocrinol* 2022;**13**:999236.
- Kremer F, Ditzen B, Wischmann T. Effectiveness of psychosocial interventions for infertile women: A systematic review and meta-analysis with a focus on a method-critical evaluation. *PLOS ONE* 2023;**18**:e0282065.
- Kroboth PD, Amico JA, Stone RA, Folan M, Frye RF, Kroboth FJ, Bigos KL, Fabian TJ, Linares AM, Pollock BG, *et al.* Influence of DHEA administration on 24-hour cortisol concentrations. *J Clin Psychopharmacol* 2003;**23**:96–99.
- Kuzuya A, Zoltowska KM, Post KL, Arimon M, Li X, Svirsky S, Maesako M, Muzikansky A, Gautam V, Kovacs D, *et al.* Identification of the novel activity-driven interaction between synaptotagmin 1 and presenilin 1 links calcium, synapse, and amyloid beta. *BMC Biol* 2016;**14**:25.
- Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;**26**:1813–1825.
- Labarta E, Sebastian-Leon P, Devesa-Peiro A, Celada P, Vidal C, Giles J, Rodriguez-Varela C, Bosch E, Diaz-Gimeno P. Analysis of serum and endometrial progesterone in determining endometrial receptivity. *Hum Reprod Oxf Engl* 2021;**36**:2861–2870.
- Labrie C, Belanger A, Labrie F. Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 1988;**123**:1412–1417.
- Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991;**78**:C113-118.
- Labrie F, Martel C, Bélanger A, Pelletier G. Androgens in women are essentially made from DHEA in each peripheral tissue according to intracrinology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;**168**:9–18.
- Larriba S, Vigués F, Bassas L. Using Small Non-Coding RNAs in Extracellular Vesicles of Semen as Biomarkers of Male Reproductive System Health: Opportunities and Challenges. *Int J Mol Sci* 2023;**24**:5447.
- Leff-Gelman P, Flores-Ramos M, Carrasco AEÁ, Martínez ML, Takashima MFS, Coronel FMC, Labonne BF, Dosal JAZ, Chávez-Peón PB, Morales SG, *et al.* Cortisol and DHEA-S levels in pregnant women with severe anxiety. *BMC Psychiatry* 2020;**20**:393.
- Lennartsson A-K, Kushnir MM, Bergquist J, Jonsdottir IH. DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Biol Psychol* 2012;**90**:143–149.
- Lennartsson A-K, Theorell T, Kushnir MM, Bergquist J, Jonsdottir IH. Perceived stress at work is associated with attenuated DHEA-S response during acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 2013;**38**:1650–1657.

- Li C, Diao F, Qiu D, Jiang M, Li X, Han L, Li L, Hou X, Ge J, Ou X, *et al.* Histone methyltransferase SETD2 is required for meiotic maturation in mouse oocyte. *J Cell Physiol* 2018;**234**:661–668.
- Li C, Huang Z, Gu L. SETD2 reduction adversely affects the development of mouse early embryos. *J Cell Biochem* 2020a;**121**:797–803.
- Li L, Wang P, Liu S, Bai X, Zou B, Li Y. Transcriptome sequencing of endometrium revealed alterations in mRNAs and lncRNAs after ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2020b;**37**:21–32.
- Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress Chaperones* 2016;**21**:467–475.
- Li T, Greenblatt EM, Shin ME, Brown TJ, Chan C. Cargo small non-coding RNAs of extracellular vesicles isolated from uterine fluid associate with endometrial receptivity and implantation success. *Fertil Steril* 2021;**115**:1327–1336.
- Li XF, Knox AMI, O'Byrne KT. Corticotrophin-releasing factor and stress-induced inhibition of the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in the female. *Brain Res* 2010;**1364**:153–163.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 2014;**30**:923–930.
- Lim M, Brown HM, Kind KL, Thompson JG, Dunning KR. Hemoglobin: potential roles in the oocyte and early embryo†. *Biol Reprod* 2019;**101**:262–270.
- Lin DI, Huang RSP, Mata DA, Decker B, Danziger N, Lechpammer M, Hiemenz M, Ramkissoon SH, Ross JS, Elvin JA. Clinicopathological and genomic characterization of BCORL1-driven high-grade endometrial stromal sarcomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2021;**34**:2200–2210.
- Lista S, González-Domínguez R, López-Ortiz S, González-Domínguez Á, Menéndez H, Martín-Hernández J, Lucia A, Emanuele E, Centonze D, Imbimbo BP, *et al.* Integrative metabolomics science in Alzheimer's disease: Relevance and future perspectives. *Ageing Res Rev* 2023;**89**:101987.
- Liu Q, Yu M, Zhang T. Construction of Oxidative Stress-Related Genes Risk Model Predicts the Prognosis of Uterine Corpus Endometrial Cancer Patients. *Cancers* 2022;**14**:5572.
- Llavona L. El impacto psicológico de la infertilidad. *Papeles Psicólogo* 2008;**29**:158–166.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, *et al.* Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996;**14**:1675–1680.
- Lombardo Y, Filipović A, Molyneux G, Periyasamy M, Giamas G, Hu Y, Trivedi PS, Wang J, Yagüe E, Michel L, *et al.* Nicastrin regulates breast cancer stem cell properties and tumor growth in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**:16558–16563. Proceedings of the National Academy of Sciences.

- Louis GMB, Lum KJ, Sundaram R, Chen Z, Kim S, Lynch CD, Schisterman EF, Pyper C. Stress reduces conception probabilities across the fertile window: evidence in support of relaxation. *Fertil Steril* 2011;**95**:2184–2189.
- Lu C, Xu J, Li K, Wang J, Dai Y, Chen Y, Chai R, Xu C, Kang Y. Chronic Stress Blocks the Endometriosis Immune Response by Metabolic Reprogramming. *Int J Mol Sci* 2023;**25**:29.
- Lu D, Bao X, Wang Q. Increased mRNA expression of TRAF-6 and MST-4 in the placenta of women with preterm premature rupture of membranes with histological chorioamnionitis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2020;**47**:749–754. IMR Press.
- Lucas ES, Dyer NP, Murakami K, Lee YH, Chan Y-W, Grimaldi G, Muter J, Brighton PJ, Moore JD, Patel G, *et al.* Loss of Endometrial Plasticity in Recurrent Pregnancy Loss. *Stem Cells Dayt Ohio* 2016;**34**:346–356.
- Luddi A, Pavone V, Semplici B, Governini L, Criscuoli M, Paccagnini E, Gentile M, Morgante G, De Leo V, Belmonte G, *et al.* Organoids of Human Endometrium: A Powerful In Vitro Model for the Endometrium-Embryo Cross-Talk at the Implantation Site. *Cells* 2020;**9**:1121.
- Lynch CD, Sundaram R, Maisog JM, Sweeney AM, Buck Louis GM. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study—the LIFE study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;**29**:1067–1075.
- Mäentausta O, Sormunen R, Isomaa V, Lehto VP, Jouppila P, Vihko R. Immunohistochemical localization of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human endometrium during the menstrual cycle. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1991;**65**:582–587.
- Makhijani RB, Bartolucci AF, Pru CA, Pru JK, Peluso JJ. Nonerythroid hemoglobin promotes human cumulus cell viability and the developmental capacity of the human oocyte. *FS Sci* 2023;**4**:121–132.
- Manzoni C, Kia DA, Vandrovicova J, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, Ferrari R. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief Bioinform* 2018;**19**:286–302.
- Marino C. The Relationship between Coagulation and Infertility: A Mini-Review. *J Biomed Res Environ Sci* 2023;**4**:383–386.
- Markopoulou K, Papadopoulos A, Juruena MF, Poon L, Pariante CM, Cleare AJ. The ratio of cortisol/DHEA in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology* 2009;**34**:19–26.
- Marti-Garcia D, Martinez-Martinez A, Sanz FJ, Devesa-Peiro A, Sebastian-Leon P, Aguila N del, Pellicer A, Diaz-Gimeno P. Age-related uterine changes and its association with poor reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2024;**22**:152.
- Masoumi SZ, Garousian M, Khani S, Oliaei SR, Shayan A. Comparison of Quality of Life, Sexual Satisfaction and Marital Satisfaction between Fertile and Infertile Couples. *Int J Fertil Steril* 2016;**10**:290–296.

- Massey AJ, Campbell BK, Raine-Fenning N, Pincott-Allen C, Perry J, Vedhara K. Relationship between hair and salivary cortisol and pregnancy in women undergoing IVF. *Psychoneuroendocrinology* 2016;**74**:397–405.
- Massimiani M, Lacconi V, La Civita F, Ticconi C, Rago R, Campagnolo L. Molecular Signaling Regulating Endometrium–Blastocyst Crosstalk. *Int J Mol Sci* 2019;**21**:23.
- Masterton R, Armstrong EM, More IA. The cyclical variation in the percentage of ciliated cells in the normal human endometrium. *J Reprod Fertil* 1975;**42**:537–540.
- Matsas A, Panopoulou P, Antoniou N, Bargiota A, Gryparis A, Vrachnis N, Mastorakos G, Kalantaridou SN, Panoskaltsis T, Vlahos NF, *et al.* Chronic Stress in Pregnancy Is Associated with Low Birth Weight: A Meta-Analysis. *J Clin Med* 2023;**12**:7686.
- Matthiesen SMS, Frederiksen Y, Ingerslev HJ, Zachariae R. Stress, distress and outcome of assisted reproductive technology (ART): a meta-analysis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;**26**:2763–2776.
- Meresman GF, Olivares C, Vighi S, Alfie M, Irigoyen M, Etchepareborda JJ. Apoptosis is increased and cell proliferation is decreased in out-of-phase endometria from infertile and recurrent abortion patients. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2010;**8**:126.
- Michael AE, Papageorghiou AT. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:497–517.
- Miller PB, Parnell BA, Bushnell G, Tallman N, Forstein DA, Higdon HL, Kitawaki J, Lessey BA. Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Hum Reprod Oxf Engl* 2012;**27**:881–888.
- Mirnezami R, Nicholson J, Darzi A. Preparing for precision medicine. *N Engl J Med* 2012;**366**:489–491.
- Mirzaasgari H, Momeni F, Pourshahbaz A, Keshavarzi F, Hatami M. The Role of Psychological Distress in the Relationship between Personality Dimensions and Pregnancy Outcome of Women Undergoing Assisted Reproductive Treatment (IVF/ICSI). *Iran J Psychiatry* 2023;**18**:153–164.
- Moffat SD, An Y, Resnick SM, Diamond MP, Ferrucci L. Longitudinal Change in Cortisol Levels Across the Adult Life Span. *J Gerontol Ser A* 2020;**75**:394–400.
- Monsivais D, Clementi C, Peng J, Titus MM, Barrish JP, Creighton CJ, Lydon JP, DeMayo FJ, Matzuk MM. Uterine ALK3 is essential during the window of implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**:E387–E395.
- Moreno A, Guerra D, Baccio G, Jiménez V, Dolz P, Tirado M, Parra J, Seijo M, Tirado M, Roca M. Guías de evaluación, consejo, apoyo e intervención psicológica en reproducción asistida. *Rev Iberoam Fertil Reprod Humana* 2007;
- Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK. Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncol Lond Engl* 2010;**6**:1863–1881.
- Morey JN, Boggero IA, Scott AB, Segerstrom SC. Current Directions in Stress and Human Immune Function. *Curr Opin Psychol* 2015;**5**:13–17.

- Mulligan EM, Hajcak G, Crisler S, Meyer A. Increased dehydroepiandrosterone (DHEA) is associated with anxiety in adolescent girls. *Psychoneuroendocrinology* 2020;**119**:104751.
- Muñoz D, Kirchner T, Fornis M, Peñarrubia J, Balasch J. Estresores vinculados a la infertilidad en parejas que inician un tratamiento de fecundación in vitro (FIV). *Anu Psicol Clínica Salud* 2009;**5**:99–105.
- Nagórska M, Obrzut B, Ulman D, Darmochwał-Kolarz D. The Need of Personalized Medicine in Coping with Stress during Infertility Treatment. *J Pers Med* 2021;**11**:56. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Nanjappa MK, Medrano TI, Lydon JP, Bigsby RM, Cooke PS. Maximal Dexamethasone Inhibition of Luminal Epithelial Proliferation Involves Progesterone Receptor (PR)- and Non-PR-Mediated Mechanisms in Neonatal Mouse Uterus. *Biol Reprod* 2015;**92**:122.
- Nepomnaschy PA, Welch KB, McConnell DS, Low BS, Strassmann BI, England BG. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:3938–3942.
- Newman L, Chopra J, Dossett C, Shepherd E, Bercusson A, Carroll M, Walker W, Lucas JS, Cheong Y. The impact of primary ciliary dyskinesia on female and male fertility: a narrative review. *Hum Reprod Update* 2023;**29**:347–367.
- Newton CR, Sherrard W, Glavac I. The Fertility Problem Inventory: measuring perceived infertility-related stress. *Fertil Steril* 1999;**72**:54–62.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;**122**:262–263.
- Nueda MJ, Tarazona S, Conesa A. Next maSigPro: updating maSigPro bioconductor package for RNA-seq time series. *Bioinformatics* 2014;**30**:2598–2602.
- Ochoa-Bernal MA, Fazleabas AT. Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:1973.
- Ojosnegros S, Seriola A, Godeau AL, Veiga A. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. *Hum Reprod Update* 2021;**27**:501–530.
- Okuno Y, Hattori-Kato M, Tanaka H, Tonooka A, Takeuchi T. Relationship between the Reduced Expression of Zinc Finger Protein 668 in Bladder Cancer and Its Invasiveness. *Int J Mol Sci* 2023;**24**:8668. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal–epithelial transition in endometrial function. *Hum Reprod Update* 2019;**25**:114–133.
- Özdemir AZ, Karli P, Gülümser Ç. Does high estrogen level negatively affect pregnancy success in frozen embryo transfer? *Arch Med Sci AMS* 2022;**18**:647–651.
- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003;**24**:444–448.
- Park SB, Han M. Inhibitory effects of androstenedione on endometrial cells: implications for poor reproductive outcome among women with androgen excess. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**171**:295–300.

- Park S-R, Kim S-K, Kim S-R, Kim D, Kim K-W, Hong I-S, Lee H-Y. Noncanonical functions of glucocorticoids: A novel role for glucocorticoids in performing multiple beneficial functions in endometrial stem cells. *Cell Death Dis* 2021;**12**:612.
- Pasch LA, Gregorich SE, Katz PK, Millstein SG, Nachtigall RD, Bleil ME, Adler NE. Psychological distress and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2012;**98**:459–464.
- Pasch LA, Holley SR, Bleil ME, Shehab D, Katz PP, Adler NE. Addressing the needs of fertility treatment patients and their partners: are they informed of and do they receive mental health services? *Fertil Steril* 2016;**106**:209-215.e2.
- Pathare ADS, Loid M, Saare M, Gidlöf SB, Zamani Esteki M, Acharya G, Peters M, Salumets A. Endometrial receptivity in women of advanced age: an underrated factor in infertility. *Hum Reprod Update* 2023;**29**:773–793.
- Peixoto C, José Grande A, Gomes Carrilho C, Nardi AE, Cardoso A, Barciela Veras A. Dehydroepiandrosterone for depressive symptoms: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Neurosci Res* 2020;**98**:2510–2528.
- Phogat JB, Smith RF, Dobson H. Effect of transport on pituitary responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in intact ewes. *Reproduction* 1999;**116**:9–18. Bioscientifica Ltd.
- Pirtea P, De Ziegler D, Tao X, Sun L, Zhan Y, Ayoubi JM, Seli E, Franasiak JM, Scott RT. Rate of true recurrent implantation failure is low: results of three successive frozen euploid single embryo transfers. *Fertil Steril* 2021;**115**:45–53.
- Qiu J-J, Ren Z-R, Yan J-B. Identification and functional analysis of long non-coding RNAs in human and mouse early embryos based on single-cell transcriptome data. *Oncotarget* 2016;**7**:61215–61228.
- Qu F, Wu Y, Zhu Y-H, Barry J, Ding T, Baio G, Muscat R, Todd BK, Wang F-F, Hardiman PJ. The association between psychological stress and miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2017;**7**:1731.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Found Stat Comput Vienna Austria* [Internet] 2021;Available from: URL <https://www.R-project.org/>.
- Radloff LS. The CES-D Scale: A Self-Report Depression Scale for Research in the General Population. *Appl Psychol Meas* 1977;**1**:385–401. SAGE Publications Inc.
- Ramirez-Gonzalez JA, Vaamonde-Lemos R, Cunha-Filho JS, Varghese AC, Swanson RJ. Overview of the female reproductive system. *Exerc Hum Reprod* 2016;., p. 19–46. Springer.
- Rao W, Li Y, Li N, Yao Q, Li Y. The association between caffeine and alcohol consumption and IVF/ICSI outcomes: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2022;**101**:1351–1363.
- Ratnasekhar C. Analytical platforms in metabolomics of health and disease. *Metabolomics Health Dis Biol* 2024;
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;**43**:e47–e47.

- Rižner TL, Thalhammer T, Özvegy-Laczka C. The Importance of Steroid Uptake and Intracrine Action in Endometrial and Ovarian Cancers. *Front Pharmacol* 2017;**8**:346.
- Robertshaw I, Bian F, Das SK. Mechanisms of uterine estrogen signaling during early pregnancy in mice: an update. *J Mol Endocrinol* 2016;**56**:R127–R138.
- Rockliff HE, Lightman SL, Rhidian E, Buchanan H, Gordon U, Vedhara K. A systematic review of psychosocial factors associated with emotional adjustment in in vitro fertilization patients. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:594–613.
- Roelfsema F, Heemst D van, Iranmanesh A, Takahashi P, Yang R, Veldhuis JD. Impact of age, sex and body mass index on cortisol secretion in 143 healthy adults. *Endocr Connect* 2017;**6**:500–509.
- Rogers K. *The reproductive system*. 2010; Britannica Educational Publishing.
- Rondó PHC, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MCN, Lobert H, Artes R. Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 2003;**57**:266–272.
- Roney JR, Simmons ZL. Elevated Psychological Stress Predicts Reduced Estradiol Concentrations in Young Women. *Adapt Hum Behav Physiol* 2015;**1**:30–40.
- Rooney KL, Domar AD. The relationship between stress and infertility. *Dialogues Clin Neurosci* 2018;**20**:41–47.
- Rosario GX, Hondo E, Jeong J-W, Mutalif R, Ye X, Yee LX, Stewart CL. The LIF-Mediated Molecular Signature Regulating Murine Embryo Implantation1. *Biol Reprod* 2014;**91**:66, 1–18.
- Rose AE, Polisenio L, Wang J, Clark M, Pearlman A, Wang G, Vega Y Saenz de Miera EC, Medicherla R, Christos PJ, Shapiro R, *et al*. Integrative genomics identifies molecular alterations that challenge the linear model of melanoma progression. *Cancer Res* 2011;**71**:2561–2571.
- Rossi BV, Berry KF, Hornstein MD, Cramer DW, Ehrlich S, Missmer SA. Effect of alcohol consumption on in vitro fertilization. *Obstet Gynecol* 2011;**117**:136–142.
- Rothman MS, Carlson NE, Xu M, Wang C, Swerdloff R, Lee P, Goh VHH, Ridgway EC, Wierman ME. Reexamination of testosterone, dihydrotestosterone, estradiol and estrone levels across the menstrual cycle and in postmenopausal women measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* 2011;**76**:177–182.
- Sahraian K, Abdollahpour Ranjbar H, Namavar Jahromi B, Cheung HN, Ciarrochi J, Habibi Asgarabad M. Effectiveness of mindful self-compassion therapy on psychopathology symptoms, psychological distress and life expectancy in infertile women treated with in vitro fertilization: a two-arm double-blind parallel randomized controlled trial. *BMC Psychiatry* 2024;**24**:174.
- Salari N, Babajani F, Hosseini-Far A, Hasheminezhad R, Abdoli N, Haydarisharaf P, Mohammadi M. Global prevalence of major depressive disorder, generalized anxiety, stress, and depression among infertile women: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2024;

- Sammad A, Luo H, Hu L, Zhu H, Wang Y. Transcriptome Reveals Granulosa Cells Coping through Redox, Inflammatory and Metabolic Mechanisms under Acute Heat Stress. *Cells* 2022;**11**:1443.
- San Segundo-Val I, Sanz-Lozano CS. Introduction to the Gene Expression Analysis. *Mol Genet Asthma* [Internet] 2016;**1434**:, p. 29–43. Springer New York: New York, NY.
- Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL, Storbeck K-H. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;**194**:105439.
- Schliep KC, Mumford SL, Vladutiu CJ, Ahrens KA, Perkins NJ, Sjaarda LA, Kissell KA, Prasad A, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. Perceived stress, reproductive hormones, and ovulatory function: a prospective cohort study. *Epidemiol Camb Mass* 2015;**26**:177–184.
- Schmidt PJ, Daly RC, Bloch M, Smith MJ, Danaceau MA, St Clair LS, Murphy JH, Haq N, Rubinow DR. Dehydroepiandrosterone monotherapy in midlife-onset major and minor depression. *Arch Gen Psychiatry* 2005;**62**:154–162.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;**3**:1101–1108.
- Segura-Benítez M, Carbajo-García MC, Corachán A, Faus A, Pellicer A, Ferrero H. Proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by primary human epithelial endometrial cells reveals key proteins related to embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2022;**20**:3.
- Sejbaek CS, Hageman I, Pinborg A, Hougaard CO, Schmidt L. Incidence of depression and influence of depression on the number of treatment cycles and births in a national cohort of 42,880 women treated with ART. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;**28**:1100–1109.
- Shang K, Jia X, Qiao J, Kang J, Guan Y. Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2012;**19**:674–683.
- Shariati MBH, Niknafs B, Seghinsara AM, Shokrzadeh N, Alivand MR. Administration of dexamethasone disrupts endometrial receptivity by alteration of expression of miRNA 223, 200a, LIF, Muc1, SGK1, and ENaC via the ERK1/2-mTOR pathway. *J Cell Physiol* 2019;**234**:19629–19639.
- Sharma N, Srinivasan JK, Priya MH, Sibiya V. Role of Serpine Gene Polymorphism in Recurrent Implantation Failure and Preeclampsia. *J Hum Reprod Sci* 2017;**10**:135–137.
- Sherer ML, Voegtline KM, Park H-S, Miller KN, Shuffrey LC, Klein SL, Osborne LM. The immune phenotype of perinatal anxiety. *Brain Behav Immun* 2022;**106**:280–288.
- Sherwin JRA, Sharkey AM, Mihalyi A, Simsa P, Catalano RD, D’Hooghe TM. Global gene analysis of late secretory phase, eutopic endometrium does not provide the basis for a minimally invasive test of endometriosis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:1063–1068.
- Shi Z, Zhou Z. MST kinases in innate immune signaling. *Cell Stress* 2017;**2**:4–13.

- Shikone T, Kokawa K, Yamoto M, Nakano R. Apoptosis of human ovary and uterine endometrium during the menstrual cycle. *Horm Res* 1997;**48 Suppl 3**:27–34.
- Shimba A, Ikuta K. Immune-enhancing effects of glucocorticoids in response to day–night cycles and stress. *Int Immunol* 2020;**32**:703–708.
- Simitsidellis I, Saunders PTK, Gibson DA. Androgens and endometrium: New insights and new targets. *Mol Cell Endocrinol* 2018;**465**:48–60.
- Simón C, Horcujadas JA, García-Velasco JA, Pellicer A. *El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica*. 2009; Editorial Medica Panamericana.
- Sinreih M, Štupar S, Čemažar L, Verdenik I, Frković Grazio S, Smrkolj Š, Rižner TL. STAR and AKR1B10 are down-regulated in high-grade endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;**171**:43–53.
- Smeenk JM, Verhaak CM, Eugster A, Minnen A van, Zielhuis GA, Braat DD. The effect of anxiety and depression on the outcome of in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl* 2001;**16**:1420–1423.
- Smeenk JMJ, Verhaak CM, Vingerhoets AJJM, Sweep CGJ, Merkus JMW, Willemsen SJ, Minnen A van, Straatman H, Braat DDM. Stress and outcome success in IVF: the role of self-reports and endocrine variables. *Hum Reprod* 2005;**20**:991–996.
- Soares SR, Simon C, Remohí J, Pellicer A. Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Hum Reprod Oxf Engl* 2007;**22**:543–547.
- Somigliana E, Vigano P, Busnelli A, Paffoni A, Vegetti W, Vercellini P. Repeated implantation failure at the crossroad between statistics, clinics and over-diagnosis. *Reprod Biomed Online* 2018;**36**:32–38.
- Sousa-Leite M, Costa R, Figueiredo B, Gameiro S. Discussing the possibility of fertility treatment being unsuccessful as part of routine care offered at clinics: patients' experiences, willingness, and preferences. *Hum Reprod* 2023;**38**:1332–1344.
- Sousa-Leite M, Fernandes M, Reis S, Costa R, Figueiredo B, Gameiro S. Feasibility and acceptability of psychosocial care for unsuccessful fertility treatment. *Health Expect* 2022;**25**:2902–2913.
- Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene R, Vagg PR, Jacobs GA. Manual for the State-Trait Anxiety Inventory. *Palo Alto CA Consult Psychol Press* 1983;
- Stamou MI, Colling C, Dichtel LE. Adrenal aging and its effects on the stress response and immunosenescence. *Maturitas* 2023;**168**:13–19.
- Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet* 2019;**20**:631–656.
- Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;**22**:96–118. Nature Publishing Group.
- Stefkovich ML, Arao Y, Hamilton KJ, Korach KS. Experimental models for evaluating non-genomic estrogen signaling. *Steroids* 2018;**133**:34–37.

- Stevens Brentjens LBPM, Obukhova D, Hartog JE den, Delvoux B, Koskivuori J, Auriola S, Häkkinen MR, Bui BN, Hoogenhuijze NE van, Mackens S, *et al.* An integrative analysis of endometrial steroid metabolism and transcriptome in relation to endometrial receptivity in in vitro fertilization patients. *FS Sci* 2023;**4**:219–228.
- Steward RG, Zhang CE, Shah AA, Yeh JS, Chen C, Li Y-J, Price TM, Muasher SJ. High Peak Estradiol Predicts Higher Miscarriage and Lower Live Birth Rates in High Responders Triggered with a GnRH Agonist in IVF/ICSI Cycles. *J Reprod Med* 2015;**60**:463–470.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha V, Mukherjee S, Ebert B, Gillette M, Paulovich A, Pomeroy S, Golub T, Lander E, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:15545–15550.
- Suri GS, Kaur G, Carbone GM, Shinde D. Metabolomics in oncology. *Cancer Rep Hoboken NJ* 2023;**6**:e1795.
- Szeremeta M, Pietrowska K, Niemcunowicz-Janica A, Kretowski A, Ciborowski M. Applications of Metabolomics in Forensic Toxicology and Forensic Medicine. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:3010.
- Takamura M, Zhou W, Rombauts L, Dimitriadis E. The long noncoding RNA PTENP1 regulates human endometrial epithelial adhesive capacity in vitro: implications in infertility. *Biol Reprod* 2020;**102**:53–62.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;**147**:1097–1121.
- Thomsen LH, Kesmodel US, Erb K, Bungum L, Pedersen D, Hauge B, Elbæk HO, Povlsen BB, Andersen CY, Humaidan P. The impact of luteal serum progesterone levels on live birth rates-a prospective study of 602 IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;**33**:1506–1516.
- Tiboni GM, Marotta F, Rossi C, Giampietro F. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on in utero development in rats. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:1719–1723.
- Tseng L, Gurside E. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;**41**:402–404.
- Tuckerman EM, Okon MA, Li T-C, Laird SM. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril* 2000;**74**:771–779. Elsevier.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 2009;**10**:397–409.
- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018;**62**:2–10.
- Vaskivuo TE, Stenbäck F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2000;**165**:75–83.

- Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, Vogelstein J, Basrai MA, Bassett DE, Hieter P, Vogelstein B, Kinzler KW. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 1997;**88**:243–251.
- Verhaak CM, Lintsen AME, Evers AWM, Braat DDM. Who is at risk of emotional problems and how do you know? Screening of women going for IVF treatment. *Hum Reprod Oxf Engl* 2010;**25**:1234–1240.
- Verhaak CM, Smeenk JMJ, Evers AWM, Kremer J a. M, Kraaijaat FW, Braat DDM. Women's emotional adjustment to IVF: a systematic review of 25 years of research. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:27–36.
- Verhaak CM, Smeenk JMJ, Minnen A van, Kremer J a. M, Kraaijaat FW. A longitudinal, prospective study on emotional adjustment before, during and after consecutive fertility treatment cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;**20**:2253–2260.
- Vignjević Petrinović S, Milošević MS, Marković D, Momčilović S. Interplay between stress and cancer—A focus on inflammation. *Front Physiol* 2023;**14**:1119095.
- Voegel CD, La Marca-Ghaemmaghami P, Ehler U, Baumgartner MR, Kraemer T, Binz TM. Steroid profiling in nails using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* 2018;**140**:144–150.
- Volgsten H, Skoog Svanberg A, Ekselius L, Lundkvist O, Sundström Poromaa I. Prevalence of psychiatric disorders in infertile women and men undergoing in vitro fertilization treatment. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:2056–2063.
- Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;**13**:115–126.
- Wang A, Guo H, Long Z. Integrative Analysis of Differently Expressed Genes Reveals a 17-Gene Prognosis Signature for Endometrial Carcinoma. *BioMed Res Int* 2021;**2021**:4804694.
- Wang Y, Xue S, Liu X, Liu H, Hu T, Qiu X, Zhang J, Lei M. Analyses of Long Non-Coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing during the pre-implantation phases in pig endometrium. *Sci Rep* 2016;**6**:20238. Nature Publishing Group.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:57–63.
- Waylen AL, Metwally M, Jones GL, Wilkinson AJ, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009;**15**:31–44.
- Webster SF, Ghalei H. Maturation of small nucleolar RNAs: from production to function. *RNA Biol* 2023;**20**:715–736.
- Wei C, Wei Y, Cheng J, Tan X, Zhou Z, Lin S, Pang L. Identification and verification of diagnostic biomarkers in recurrent pregnancy loss via machine learning algorithm and WGCNA. *Front Immunol* 2023;**14**:1241816.
- Wei P, Dong M, Bi Y, Chen S, Huang W, Li T, Liu B, Fu X, Yang Y. Identification and validation of a signature based on macrophage cell marker genes to predict recurrent miscarriage by integrated analysis of single-cell and bulk RNA-sequencing. *Front Immunol* 2022;**13**:1053819.

- Whirledge S, Cidlowski JA. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 2013;**154**:4450–4468.
- Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2017;**28**:399–415.
- Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;**340**:1796–1799.
- Winczura K, Ceylan H, Sledziowska M, Jones M, Fagarasan H, Wang J, Saponaro M, Arnold R, Hebenstreit D, Grzechnik P. RPRD Proteins Control Transcription in Human Cells. 2021;2021.06.20.449126. bioRxiv [Preprint]Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.20.449126v1>.
- Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase-3. In Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encycl Biol Chem Second Ed* [Internet] 2013; p. 434–438. Academic Press: WalthamAvailable from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012378630200459X>.
- Wu J, Lin S, Kong S. Psychological Stress and Functional Endometrial Disorders: Update of Mechanism Insights. *Front Endocrinol* 2021;**12**:690255.
- Wu Y, Li M, Zhang J, Wang S. Unveiling uterine aging: Much more to learn. *Ageing Res Rev* 2023;**86**:101879.
- Xu L, Chang C, Jiang P, Wei K, Zhang R, Jin Y, Zhao J, Xu L, Shi Y, Guo S, *et al*. Metabolomics in rheumatoid arthritis: Advances and review. *Front Immunol* 2022;**13**:961708.
- Xu Q, Xiang Y, Wang Q, Wang L, Brind'Amour J, Bogutz AB, Zhang Y, Zhang B, Yu G, Xia W, *et al*. SETD2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development. *Nat Genet* 2019;**51**:844–856.
- Yanai I, Lercher M. Night science. *Genome Biol* 2019;**20**:179, s13059-019-1800–1806.
- Yanai I, Lercher M. A hypothesis is a liability. *Genome Biol* 2020;**21**:231, s13059-020-02133-w.
- Yanai I, Lercher M. Novel predictions arise from contradictions. *Genome Biol* 2021;**22**:153, s13059-021-02371–02376.
- Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, *et al*. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;**21**:341–352. Nature Publishing Group.
- Yang X, Tian Y, Zheng L, Luu T, Kwak-Kim J. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. *Int J Mol Sci* 2023;**24**:132. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston TP, Sahebkar A. The impact of stress on body function: A review. *EXCLI J* 2017;**16**:1057–1072.
- Yip KS, Suvorov A, Connerney J, Lodato NJ, Waxman DJ. Changes in Mouse Uterine Transcriptome in Estrus and Proestrus1. *Biol Reprod* 2013;**89**:13, 1–12.

- Yoo J-Y, Ahn JI, Kim TH, Yu S, Ahn JY, Lim JM, Jeong J-W. G-protein coupled receptor 64 is required for decidualization of endometrial stromal cells. *Sci Rep* 2017;**7**:5021.
- Young SL, Savaris RF, Lessey BA, Sharkey AM, Balthazar U, Zaino RJ, Sherwin RA, Fritz MA. Effect of randomized serum progesterone concentration on secretory endometrial histologic development and gene expression. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:1903–1914.
- Yu X-T, Zeng T. Integrative Analysis of Omics Big Data. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2018;**1754**:109–135.
- Yusuf ANM, Amri MF, Ugusman A, Hamid AA, Wahab NA, Mokhtar MH. Hyperandrogenism and Its Possible Effects on Endometrial Receptivity: A Review. *Int J Mol Sci* 2023;**24**:12026. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Zhang D, Liu H, Zeng J, Miao X, Huang W, Chen H, Huang Y, Li Y, Ye D. Glucocorticoid exposure in early placentation induces preeclampsia in rats via interfering trophoblast development. *Gen Comp Endocrinol* 2016;**225**:61–70.
- Zhang WY, Gardner RM, Johal JK, Beshar IE, Bavan B, Milki AA, Lathi RB, Aghajanova L. Pregnancy and neonatal outcomes of letrozole versus natural cycle frozen embryo transfer of autologous euploid blastocyst. *J Assist Reprod Genet* 2023;**40**:873–881.
- Zhang WY, Gardner RM, Kapphahn KI, Ramachandran MK, Murugappan G, Aghajanova L, Lathi RB. The impact of estradiol on pregnancy outcomes in letrozole-stimulated frozen embryo transfer cycles. *FS Rep* 2021;**2**:320–326.
- Zhang X, Jiang G, Wu J, Zhou H, Zhang Y, Miao Y, Feng Y, Yu J. Zinc finger protein 668 suppresses non-small cell lung cancer invasion and migration by downregulating Snail and upregulating E-cadherin and zonula occludens-1. *Oncol Lett* 2018;**15**:3806–3813.
- Zhang Y, Liu H, Li W, Zhang Z, Shang X, Zhang D, Li Y, Zhang S, Liu J, Hess RA, *et al.* Intraflagellar Transporter Protein (IFT27), an IFT25 binding partner, Is Essential For Male Fertility and Spermiogenesis In Mice. *Dev Biol* 2017;**432**:125–139.
- Zhang Y, Wang S. The possible role of long non-coding RNAs in recurrent miscarriage. *Mol Biol Rep* 2022;**49**:9687–9697.
- Zhang Y, Xie S, Zhou Y, Xie Y, Liu P, Sun M, Xiao H, Jin Y, Sun X, Chen Z, *et al.* H3K36 histone methyltransferase Setd2 is required for murine embryonic stem cell differentiation toward endoderm. *Cell Rep* 2014;**8**:1989–2002.
- Zheng Z, Zhang X, Wu F, Liao H, Zhao H, Zhang M, Liu S. Effect of BMI on cumulative live birth rates in patients that completed IVF treatment: a retrospective cohort study of 16,126 patients. *Endocr Connect* 2024;**13**:e230105.
- Zhong L, Mu H, Wen B, Zhang W, Wei Q, Gao G, Han J, Cao S. Long non-coding RNAs involved in the regulatory network during porcine pre-implantation embryonic development and iPSC induction. *Sci Rep* 2018;**8**:6649. Nature Publishing Group.
- Zhu C, Xiao D. Aberrant brain-expressed X-linked 4 (BEX4) expression is a novel prognostic biomarker in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)* 2020;**99**:e23133.

- Zhu F, Yin S, Yang B, Li S, Feng X, Wang T, Che D. TEAS, DHEA, CoQ10, and GH for poor ovarian response undergoing IVF-ET: a systematic review and network meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2023;**21**:64.
- Zhu G, Yin Y, Xiao C-L, Mao R-J, Shi B-H, Jie Y, Wang Z-W. Serum DHEAS levels are associated with the development of depression. *Psychiatry Res* 2015;**229**:447–453.
- Ziegler D de, Fanchin R, Moustier B de, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* 1998;**39**:149–166.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 1996;**65**:503–509.
- Zuo X, Rong B, Li L, Lv R, Lan F, Tong M-H. The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and essential for spermiogenesis in mice. *J Biol Chem* 2018;**293**:9188–9197.



APÉNDICES



APÉNDICE A: Cuestionario STAI

N.º 124

STAI

AUTOEVALUACION A (E/R)

A / E	P D = 30 + - =
A / R	P D = 21 + - =

Apellidos y nombre Edad Sexo
 Centro Curso/Puesto Estado civil
 Otros datos Fecha

A-E

INSTRUCCIONES

A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo.

Lea cada frase y señale la puntuación 0 a 3 que indique mejor cómo se *SIENTE* Vd. *AHORA MISMO*, en este momento. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa su situación presente.

	Nada	Algo	Bastante	Mucho
1. Me siento calmado	0	1	2	3
2. Me siento seguro	0	1	2	3
3. Estoy tenso	0	1	2	3
4. Estoy contrariado	0	1	2	3
5. Me siento cómodo (estoy a gusto)	0	1	2	3
6. Me siento alterado	0	1	2	3
7. Estoy preocupado ahora por posibles desgracias futuras	0	1	2	3
8. Me siento descansado	0	1	2	3
9. Me siento angustiado	0	1	2	3
10. Me siento confortable	0	1	2	3
11. Tengo confianza en mí mismo	0	1	2	3
12. Me siento nervioso	0	1	2	3
13. Estoy desasosegado	0	1	2	3
14. Me siento muy «atado» (como oprimido)	0	1	2	3
15. Estoy relajado	0	1	2	3
16. Me siento satisfecho	0	1	2	3
17. Estoy preocupado	0	1	2	3
18. Me siento aturdido y sobreexcitado	0	1	2	3
19. Me siento alegre	0	1	2	3
20. En este momento me siento bien	0	1	2	3

COMPRUEBE SI HA CONTESTADO A TODAS LAS FRASES CON UNA SOLA RESPUESTA

Ahora, vuelva la hoja y lea las Instrucciones antes de comenzar a contestar a las frases.



Autor: C.D. Spielberger.

Copyright © 1968 by Consulting Psychologists Press, Inc. (Palo Alto, California, U.S.A.).

Copyright © 1982 by TEA Ediciones, S.A. - Edita: TEA Ediciones, S.A.; Fray Bernardino de Sahagún, 24; 28036 MADRID - Prohibida la reproducción total o parcial. Todos los derechos reservados - Este ejemplar está impreso en tinta azul. Si le presentan otro en tinta negra, es una reproducción ilegal. En beneficio de la profesión y en el suyo propio, NO LA UTILICE - Printed in Spain. Impreso en España por Aguirre Campano; Daganzo, 15 dpdo.; 28002 MADRID - Depósito legal: M - 35605 - 1988.

A-R

INSTRUCCIONES

A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo.

Lea cada frase y señale la puntuación 0 a 3 que indique mejor cómo se *SIENTE* Vd. *EN GENERAL* en la mayoría de las ocasiones. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando lo que mejor describa cómo se siente Vd. generalmente.

		Casi nunca	A veces	A menudo	Casi siempre
21.	Me siento bien	0	1	2	3
22.	Me canso rápidamente	0	1	2	3
23.	Siento ganas de llorar	0	1	2	3
24.	Me gustaría ser tan feliz como otros	0	1	2	3
25.	Pierdo oportunidades por no decidirme pronto	0	1	2	3
26.	Me siento descansado	0	1	2	3
27.	Soy una persona tranquila, serena y sosegada	0	1	2	3
28.	Veó que las dificultades se amontonan y no puedo con ellas	0	1	2	3
29.	Me preocupo demasiado por cosas sin importancia	0	1	2	3
30.	Soy feliz	0	1	2	3
31.	Suelo tomar las cosas demasiado seriamente	0	1	2	3
32.	Me falta confianza en mí mismo	0	1	2	3
33.	Me siento seguro	0	1	2	3
34.	Evito enfrentarme a las crisis o dificultades	0	1	2	3
35.	Me siento triste (melancólico)	0	1	2	3
36.	Estoy satisfecho	0	1	2	3
37.	Me rondan y molestan pensamientos sin importancia	0	1	2	3
38.	Me afectan tanto los desengaños, que no puedo olvidarlos	0	1	2	3
39.	Soy una persona estable	0	1	2	3
40.	Cuando pienso sobre asuntos y preocupaciones actuales, me pongo tenso y agitado.	0	1	2	3

COMPRUEBE SI HA CONTESTADO A TODAS LAS FRASES CON UNA SOLA RESPUESTA

APÉNDICE B: Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Primers empleados para la RT-qPCR.

Gen	Primers
SNORA1	Forward: GAATGGGCACTGTTGATCATGG Reverse: TGCATACTGTGATGGAAGCA
HBB	Forward: AAGTCTGCCGTTACTGCCC Reverse: CAAGGGTAGACCACCAGCAG
NCSTN	Forward: ACTAGCAGGTTTGTGCAGGG Reverse: TGATGAGTGGCGTTGAGCAG
SETD2	Forward: ATGGGGGATTTCTACGACCC Reverse: TCTGTCGTCCCTGTTCTTCC
GSK3A	Forward: GCTGGAATATGTGCCCCGAGA Reverse: CTGCGGAAGAGCTGGTACAT
RPRD2	Forward: AGGCTTGTCGTCTTGGTGTA Reverse: TATGCAGATCTCCGGAGCCA

Se especifican las secuencias de los primers forward y reverse empleados en la validación por RT-qPCR de los genes SNORA1 (Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 1), HBB (Hemoglobin Subunit Beta), NCSTN (Nicastrin), SETD2 (SET Domain Containing 2, histone lysine methyltransferase), GSK3A (Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha), RPRD2 (Regulation of Nuclear Pre-mRNA Domain Containing 2).

Tabla Suplementaria 2. Los niveles endometriales de estrona, estradiol y androstenediona están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 1.

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
P4 (µg/g)	Q1 = 0,94	17	49	ET=52,94% ENT=47,06%	ET=40,82% ENT=59,18%	0,516
	Q3 = 21,33	49	17	ET=48,98% ENT=51,02%	ET=29,41% ENT=70,59%	0,196
	máx.rel = 40,07	58	8	ET=44,83% ENT=55,17%	ET=37,5% ENT=62,5%	0,722
E1 (ng/g)	Q1 = 3,79	13	36	ET=46,15% ENT=53,85%	ET=44,44% ENT=55,56%	0,985
	Q3 = 11,12	37	12	ET=43,24% ENT=56,76%	ET=50% ENT=50%	0,715

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
E1 (ng/g)	máx.rel = 21,27	45	4	ET=40% ENT=60%	ET=100% ENT=0%	0,026*
E2 (ng/g)	Q1 = 1,15	8	34	ET=87,5% ENT=12,5%	ET=47,06% ENT=52,94%	0,047*
	Q3 = 5,49	31	11	ET=54,84% ENT=45,16%	ET=54,55% ENT=45,45%	1,000
	máx.rel = 8,2	36	6	ET=55,56% ENT=44,44%	ET=50% ENT=50%	0,836
17OHP4 (ng/g)	Q1 = 0,4	15	42	ET=53,33% ENT=46,67%	ET=45,24% ENT=54,76%	0,636
	Q3 = 2,37	43	14	ET=51,16% ENT=48,84%	ET=35,71% ENT=64,29%	0,356
	máx.rel = 4,34	51	6	ET=49,02% ENT=50,98%	ET=33,33% ENT=66,67%	0,530
A4 (ng/g)	Q1 = 0,44	18	50	ET=44,44% ENT=55,56%	ET=44% ENT=56%	1,000
	Q3 = 1,35	51	17	ET=50,98% ENT=49,02%	ET=23,53% ENT=76,47%	0,050*
	máx.rel = 2,56	57	11	ET=47,37% ENT=52,63%	ET=27,27% ENT=72,73%	0,259
T (ng/g)	Q1 = 0,19	17	48	ET=47,06% ENT=52,94%	ET=43,75% ENT=56,25%	0,830
	Q3 = 0,52	48	17	ET=43,75% ENT=56,25%	ET=47,06% ENT=52,94%	0,830
	máx.rel = 0,9	61	4	ET=45,9% ENT=54,1%	ET=25% ENT=75%	0,532
Cortisona (ng/g)	Q1 = 51,99	17	51	ET=58,82% ENT=41,18%	ET=39,22% ENT=60,78%	0,192
	Q3 = 98,91	50	18	ET=42% ENT=58%	ET=50% ENT=50%	0,605
	máx.rel = 162,79	64	4	ET=45,31% ENT=54,69%	ET=25% ENT=75%	0,590
Cortisol (ng/g)	Q1 = 2,18	16	52	ET=50% ENT=50%	ET=42,31% ENT=57,69%	0,628
	Q3 = 10,84	50	18	ET=44% ENT=56%	ET=44,44% ENT=55,56%	0,996

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
Cortisol (ng/g)	máx.rel = 20,71	57	11	ET=43,86% ENT=56,14%	ET=45,45% ENT=54,55%	0,963

Para cada metabolito, se muestra el valor concreto de cada punto de corte establecido para realizar las comparaciones, así como el número de pacientes por encima y por debajo de cada límite, la proporción de pacientes que logran un embarazo a término y las que no lo logran para cada parte del límite y el p-valor resultante de la aplicación del test de Barnard. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en **negrita**, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0,05$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; E1: estrona; E2: estradiol; ENT: embarazo no a término; ET: embarazo a término; máx.rel.: máximo relativo; P4: progesterona; Q1: primer cuartil; Q3: tercer cuartil; T: testosterona.

Tabla Suplementaria 3. Los niveles endometriales de estradiol, 17OHP4, DHEA y cortisol están relacionados con las probabilidades de lograr un embarazo a término en la población 2.

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
P4 Nat (µg/g)	Q1 = 0,04	12	5	ET=100% ENT=0%	ET=66,7% ENT=33,3%	0,110
	mediana = 0,07	8	9	ET=88,9% ENT=11,1%	ET=62,5% ENT=37,5%	0,134
	Q3 = 0,41	4	13	ET=84,6% ENT=15,4%	ET=50% ENT=50%	0,124
	máx. rel = 0,61	4	13	ET=84,6% ENT=15,4%	ET=50% ENT=50%	0,493
P4 THS (µg/g)	Q1 = 1,54	37	13	ET=38,5% ENT=61,5%	ET=62,2% ENT=37,8%	0,095
	mediana = 10,30	25	25	ET=48% ENT=52%	ET=64% ENT=36%	0,170
	Q3 = 29,27	13	37	ET=56,8% ENT=43,2%	ET=53,8% ENT=46,2%	0,472
	máx. rel = 53,40	10	40	ET=57,5% ENT=42,5%	ET=50% ENT=50%	0,356
E1 (ng/g)	Q1 = 37	49	21	ET=66,67% ENT=33,33%	ET= 61,22% ENT=38,78%	0,391
E1 (ng/g)	mediana = 42,5	34	36	ET=63,89% ENT=36,11%	ET=61,76% ENT=38,24%	0,463
	Q3 = 58,75	18	52	ET=65,38% ENT=34,62%	ET= 55,56% ENT=44,44%	0,356
	máx. rel = 91	9	61	ET=65,57% ENT=34,43%	ET=44,44% ENT=55,56%	0,174
E2 (ng/g)	Q1 = 0,7	29	14	ET= 57,14% ENT=42,86%	ET=65,52% ENT=34,48%	0,355
	mediana = 1	19	24	ET=50% ENT=50%	ET=78,95% ENT=21,05%	0,035*
	Q3 = 1,8	10	33	ET= 60,61% ENT=39,39%	ET=70% ENT=30%	0,355

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
E2 (ng/g)	máx. rel = 2,8	3	40	ET=62,5% ENT=37,5%	ET=66,67% ENT=33,33%	0,515
17OHP4 (ng/g)	Q1 = 0,5	36	13	ET=76,92% ENT=23,08%	ET=58,33% ENT=41,67%	0,171
	mediana = 1,1	22	27	ET=77,78% ENT=22,22%	ET=45,45% ENT=54,55%	0,016*
	Q3 = 1,9	12	37	ET=67,57% ENT=32,43%	ET=50% ENT=50%	0,215
	máx. rel = 3,8	8	41	ET=65,85% ENT=34,15%	ET=50% ENT=50%	0,216
A4 (ng/g)	Q1 = 0,3	42	20	ET=60% ENT=40%	ET=64,29% ENT=35,71%	0,404
	mediana = 0,5	22	40	ET=65% ENT=35%	ET=59,09% ENT=40,91%	0,391
	Q3 = 0,8	14	48	ET=64,58% ENT=35,42%	ET=57,14% ENT=42,86%	0,389
	máx. rel = 1,5	11	51	ET=64,71% ENT=35,29%	ET=54,55% ENT=45,45%	0,357
T (ng/g)	Q1 = 0,2	37	20	ET=70% ENT=30%	ET=59,46% ENT=40,54%	0,247
	mediana = 0,3	19	38	ET=68,42% ENT=31,58%	ET=52,63% ENT=47,37%	0,172
	Q3 = 0,4	10	47	ET=68,09% ENT=31,91%	ET=40% ENT=60%	0,056
	máx. rel. = 0,7	4	53	ET=62,26% ENT=37,74%	ET=75% ENT=25%	0,392
DHEA Nat (ng/g)	Q1 = 26,75	15	5	ET=60% ENT=40%	ET=86,7% ENT=13,3%	0,090
	mediana = 33,95	10	10	ET=70% ENT=30%	ET=90% ENT=10%	0,377
	Q3 = 42	5	15	ET=80% ENT=20%	ET=80% ENT=20%	0,536
	máx. rel. = 45	4	16	ET=75% ENT=25%	ET=100% ENT=0%	0,375
DHEA THS (ng/g)	Q1 = 17,85	37	13	ET=69,2% ENT=30,8%	ET=51,4% ENT=48,6%	0,219
	mediana = 25,5	25	25	ET=72% ENT=28%	ET=40% ENT=60%	0,013*
	Q3 = 37,75	13	37	ET=56,8% ENT=43,2%	ET=53,8% ENT=46,2%	0,215
	máx. rel. = 68	4	46	ET=57,8% ENT=42,2%	ET=40% ENT=60%	0,216
Cortisona (ng/g)	Q1 = 47	51	19	ET=57,89% ENT=42,11%	ET=64,71% ENT=35,29%	0,356

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
Cortisona (ng/g)	mediana = 66	34	36	ET=61,11% ENT=38,89%	ET=64,71% ENT=35,29%	0,404
	Q3 = 92	17	53	ET=64,15% ENT=35,85%	ET=58,82% ENT=41,18%	0,391
	máx. rel = 142	3	67	ET=64,18% ENT=35,82%	ET=33,33% ENT=66,67%	0,220
Cortisol (ng/g)	Q1 = 2,5	51	18	ET=66,67% ENT=33,33%	ET=60,78% ENT=39,22%	0,384
	mediana = 4	34	35	ET=62,86% ENT=37,14%	ET=61,76% ENT=38,24%	0,507
	Q3 = 7,2	17	52	ET=61,54% ENT=38,46%	ET=64,71% ENT=35,29%	0,425
	máx. rel = 13,9	5	64	ET=65,62% ENT=34,38%	ET=20% ENT=80%	0,029*

Para cada metabolito, se muestra el valor concreto de cada punto de corte establecido para realizar las comparaciones, así como el número de pacientes por encima y por debajo de cada límite, la proporción de pacientes que logran un embarazo a término y las que no lo logran para cada parte del límite y el p-valor resultante de la aplicación del test de Barnard. Para aquellos metabolitos afectados por el tipo de preparación endometrial (Tabla 6), los resultados se muestran de forma independiente para cada tipo de ciclo. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (* $p \leq 0,05$). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; ENT: embarazo no a término; ET: embarazo a término; máx.rel.: máximo relativo; Nat: ciclo natural; P4: progesterona; Q1: primer cuartil; Q3: tercer cuartil; T: testosterona; THS: terapia hormonal sustitutiva.

Tabla Suplementaria 4. El estrés agudo (evaluado con las puntuaciones de STAI Estado) afecta a las concentraciones de cortisol y estrógenos.

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
P4 Nat (µg/g)	Q1 = 0,04	9	4	NE=75% E=25%	NE=55,6% E=44,4%	0,364
	mediana = 0,05	6	7	NE=71,4% E=28,6%	NE=50% E=50%	0,342
	Q3 = 0,41	3	10	NE=50% E=50%	NE=100% E=0%	0,080
	máx.rel = 0,61	2	11	NE=54,5% E=45,5%	NE=100% E=0%	0,181
P4 THS (µg/g)	Q1 = 2,15	31	11	NE=45,5% E=54,5%	NE=61,3% E=38,7%	0,211
	median = 12,37	21	21	NE=57,1% E=42,9%	NE=57,1% E=42,9%	1,000
	Q3 = 33,38	11	31	NE=61,3% E=38,7%	NE=45,5% E=54,5%	0,211
	máx.rel = 53,40	8	34	NE=58,8% E=41,2%	NE=50% E=50%	0,348
E1 (ng/g)	Q1 = 35,62	43	15	NE=86,67% E=13,33%	NE=51,16% E=48,84%	0,011*

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
E1 (ng/g)	median = 41,7	29	29	NE=72,41% E=27,59%	NE=48,28% E=51,72%	0,035*
	Q3 = 52	14	44	NE=63,64% E=36,36%	NE=50% E=50%	0,246
	máx.rel = 64,8	7	51	NE=62,75% E=37,25%	NE=42,86% E=57,14%	0,190
E2 (ng/g)	Q1 = 0,7	23	11	NE=54,55% E=45,45%	NE=65,22% E=34,78%	0,346
	Median = 1	16	18	NE=55,56% E=44,44%	NE=68,75% E=31,25%	0,346
	Q3 = 1,95	9	25	NE=52% E=48%	NE=88,89% E=11,11%	0,036*
	máx.rel = 2,8	1	33	NE=60,61% E=39,39%	NE=100% E=0%	0,346
17OHP4 (ng/g)	Q1 = 0,43	31	11	NE=63,64% E=36,36%	NE=54,84% E=45,16%	0,345
	median = 1,05	21	21	NE=57,14% E=42,86%	NE=57,14% E=42,86%	1,000
	Q3 = 2,65	11	31	NE=58,06% E=41,94%	NE=54,55% E=45,45%	0,480
	máx. rel. = 5,9	3	39	NE=56,41% E=43,59%	NE=66,67% E=33,33%	0,430
A4 (ng/g)	Q1 = 0,3	32	18	NE=61,11% E=38,89%	NE=53,12% E=46,88%	0,325
	mediana = 0,5	17	33	NE=54,55% E=45,45%	NE=58,82% E=41,18%	0,416
	Q3 = 0,88	13	37	NE=56,76% E=43,24%	NE=53,85% E=46,15%	0,472
	máx. rel. = 1,5	10	40	NE=57,5% E=42,5%	NE=50% E=50%	0,356
T (ng/g)	Q1 = 0,2	31	17	NE=70,59% E=29,41%	NE=58,06% E=41,94%	0,223
	mediana = 0,3	19	29	NE=65,52% E=34,48%	NE=57,89% E=42,11%	0,383
	Q3 = 0,4	11	37	NE=59,46% E=40,54%	NE=72,73% E=27,27%	0,259
	máx. rel. = 0,7	3	45	NE=62,22% E=37,78%	NE=66,67% E=33,33%	0,510
DHEA Nat (ng/g)	Q1 = 26	10	6	NE=66,7% E=33,3%	NE=70% E=30%	0,496
	mediana = 31,55	8	8	NE=62,5% E=37,5%	NE=75% E=25%	0,412
	Q3 = 42,98	4	12	NE=58,3% E=41,7%	NE=100% E=0%	0,083

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
DHEA Nat (ng/g)	máx. rel. = 45	2	14	NE=64,3% E=35,7%	NE=100% E=0%	0,231
DHEA THS (ng/g)	Q1 = 18	30	12	NE=75% E=25%	NE=50% E=50%	0,076
	mediana = 22,95	21	21	NE=66,7% E=33,3%	NE=47,6% E=52,4%	0,148
	Q3 = 35	11	31	NE=64,5% E=35,5%	NE=36,4% E=63,6%	0,076
	máx. rel. = 61,6	5	37	NE=59,5% E=40,5%	NE=40% E=60%	0,306
Cortisona (ng/g)	Q1 = 57	42	16	NE=62,5% E=37,5%	NE=59,52% E=40,48%	0,477
	mediana = 72,5	29	29	NE=51,72% E=48,28%	NE=68,97% E=31,03%	0,114
	Q3 = 92,75	15	43	NE=65,12% E=34,88%	NE=46,67% E=53,33%	0,115
	máx.rel = 142	2	56	NE=60,71% E=39,29%	NE=50% E=50%	0,434
Cortisol (ng/g)	Q1 = 2,5	42	15	NE=80% E=20%	NE=52,38% E=47,62%	0,038*
	mediana = 4,3	28	29	NE=68,97% E=31,03%	NE=50% E=50%	0,095
	Q3 = 7,5	14	43	NE=65,12% E=34,88%	NE=42,86% E=57,14%	0,079
	máx.rel = 12,6	5	52	NE=63,46% E=36,54%	NE=20% E=80%	0,038*

Para cada metabolito, se muestra el valor concreto de cada punto de corte establecido para realizar las comparaciones, así como el número de pacientes por encima y por debajo de cada límite, la proporción de pacientes estresadas y no estresadas para cada parte del límite y el p-valor resultante de la aplicación del test de Barnard. Para aquellos metabolitos afectados por el tipo de preparación endometrial (Tabla 10), los resultados se muestran de forma independiente para cada tipo de ciclo. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (*p≤ 0,05). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; E: estresada; máx.rel.: máximo relativo; Nat: ciclo natural; NE: no estresada; P4: progesterona; Q1: primer cuartil; Q3: tercer cuartil; T: testosterona; THS: terapia hormonal sustitutiva.

Tabla Suplementaria 5. El estrés prolongado (evaluado con las puntuaciones de STAI Rasgo) afecta a las concentraciones de DHEA.

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
P4 Nat (ug/g)	Q1 = 0,04	9	4	NE=75% E=25%	NE=77,8% E=22,2%	0,510
	mediana = 0,05	6	7	NE=71,4% E=28,6%	NE=83,3% E=16,7%	0,498
	Q3 = 0,41	3	10	NE=70% E=30%	NE=100% E=0%	0,217

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
P4 Nat (ug/g)	máx. rel. = 0,61	2	11	NE=72,7% E=27,3%	NE=100% E=0%	0,324
P4 THS (ug/g)	Q1 = 2,15	31	11	NE=63,6% E=36,4%	NE=87,1% E=12,9%	0,086
	mediana = 12,37	21	21	NE=76,2% E=23,8%	NE=85,7% E=14,3%	0,294
	Q3 = 33,38	11	31	NE=80,6% E=19,4%	NE=81,8% E=18,2%	0,555
	máx. rel. = 53,40	8	34	NE=76,5% E=23,5%	NE=100% E=0%	0,094
E1 (ng/g)	Q1 = 35,62	43	15	NE=73,33% E=26,67%	NE=83,72% E=16,28%	0,227
	mediana = 41,7	29	29	NE=72,41% E=27,59%	NE=89,66% E=10,34%	0,086
	Q3 = 52	14	44	NE=75% E=25%	NE=100% E=0%	0,085
	máx. rel. = 64,8	7	51	NE=78,43% E=21,57%	NE=100% E=0%	0,102
E2 (ng/g)	Q1 = 0,7	23	11	NE=90,91% E=9,09%	NE=86,96% E=13,04%	0,663
	mediana = 1	16	18	NE=94,44% E=5,56%	NE=81,25% E=18,75%	0,175
	Q3 = 1,95	9	25	NE=88% E=12%	NE=88,89% E=11,11%	0,663
	máx. rel. = 2,8	1	33	NE=87,88% E=12,12%	NE=100% E=0%	0,663
17OHP4 (ng/g)	Q1 = 0,43	31	11	NE=90,91% E=9,09%	NE=83,87% E=16,13%	0,483
	mediana = 1,05	21	21	NE=76,19% E=23,81%	NE=95,24% E=4,76%	0,063
	Q3 = 2,65	11	31	NE=80,65% E=19,35%	NE=100% E=0%	0,076
	máx. rel. = 5,9	3	39	NE=84,62% E=15,38%	NE=100% E=0%	0,384
A4 (ng/g)	Q1 = 0,3	32	18	NE=72,22% E=27,78%	NE=87,5% E=12,5%	0,106
	mediana = 0,5	17	33	NE=75,76% E=24,24%	NE=94,12% E=5,88%	0,087
	Q3 = 0,88	13	37	NE=78,38% E=21,62%	NE=92,31% E=7,69%	0,178
	máx. rel. = 1,5	10	40	NE=77,5% E=22,5%	NE=100% E=0%	0,087
T (ng/g)	Q1 = 0,2	31	17	NE=82,35% E=17,65%	NE=83,87% E=16,13%	0,584

Metabolito	Límite	N por encima	N por debajo	% <lim	% >lim	p-valor
T (ng/g)	mediana = 0,3	19	29	NE=82,76% E=17,24%	NE=84,21% E=15,79%	0,584
	Q3 = 0,4	11	37	NE=81,08% E=18,92%	NE=90,91% E=9,09%	0,337
	máx. rel. = 0,7	3	45	NE=82,22% E=17,78%	NE=100% E=0%	0,336
DHEA Nat (ng/g)	Q1 = 26	10	6	NE=50% E=50%	NE=100% E=0%	0,013*
	mediana = 31,55	8	8	NE=62,5% E=37,5%	NE=100% E=0%	0,082
	Q3 = 42,98	4	12	NE=75% E=25%	NE=100% E=0%	0,205
	máx. rel. = 45	2	14	NE=78,6% E=21,4%	NE=100% E=0%	0,393
DHEA THS (ng/g)	Q1 = 18	30	12	NE=75% E=25%	NE=83,3% E=16,7%	0,396
	mediana = 22,95	21	21	NE=81% E=19%	NE=81% E=19%	1,000
	Q3 = 35	11	31	NE=74,2% E=25,8%	NE=100% E=0%	0,086
	máx. rel. = 61,6	5	37	NE=78,4% E=21,6%	NE=100% E=0%	0,164
Cortisona (ng/g)	Q1 = 57	42	16	NE=81,25% E=18,75%	NE=80,95% E=19,05%	0,556
	mediana = 72,5	29	29	NE=82,76% E=17,24%	NE=79,31% E=20,69%	0,551
	Q3 = 92,75	15	43	NE=86,05% E=13,95%	NE=66,67% E=33,33%	0,086
	máx. rel. = 142	2	56	NE=80,36% E=19,64%	NE=100% E=0%	0,397
Cortisol (ng/g)	Q1 = 2,5	42	15	NE=73,33% E=26,67%	NE=83,33% E=16,67%	0,290
	mediana = 4,3	28	29	NE=75,86% E=24,14%	NE=85,71% E=14,29%	0,222
	Q3 = 7,5	14	43	NE=83,72% E=16,28%	NE=71,43% E=28,57%	0,218
	máx. rel. = 12,6	5	52	NE=82,69% E=17,31%	NE=60% E=40%	0,137

Para cada metabolito, se muestra el valor concreto de cada punto de corte establecido para realizar las comparaciones, así como el número de pacientes por encima y por debajo de cada límite, la proporción de pacientes estresadas y no estresadas para cada parte del límite y el p-valor resultante de la aplicación del test de Barnard. Para aquellos metabolitos afectados por el tipo de preparación endometrial (Tabla 10), los resultados se muestran de forma independiente para cada tipo de ciclo. Los resultados estadísticamente significativos se destacan en negrita, indicando además la magnitud de la diferencia con asteriscos (*p≤ 0,05). 17OHP4: 17-hidroxiprogesterona; A4: androstenediona; DHEA: dehidroepiandrosterona; E1: estrona; E2: estradiol; E: estresada; máx.rel.: máximo relativo; Nat: ciclo natural; NE: no estresada; P4: progesterona; Q1: primer cuartil; Q3: tercer cuartil; T: testosterona; THS: terapia hormonal sustitutiva.

Tabla Suplementaria 6. 182 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de cortisol.

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
SNORA1	small nucleolar RNA, H/ACA box 1	0,649	3,09E-09	KDM8	lysine demethylase 8	0,519	7,26E-07
PF4	platelet factor 4	0,573	9,02E-08	SETD2	SET domain containing 2, histone lysine methyltransferase	0,498	1,54E-06
HBB	hemoglobin subunit beta	0,567	1,19E-07	LINC00087	small integral membrane protein 10 like 2B	0,485	2,43E-06
HBA2	hemoglobin subunit alpha 2	0,538	3,55E-07	GSK3A	glycogen synthase kinase 3 alpha	0,457	6,10E-06
PPBP	pro-platelet basic protein	0,535	4,10E-07	HTRA3	HtrA serine peptidase 3	0,513	6,87E-06
SNORA70	small nucleolar RNA SNORA70	0,554	1,62E-06	RPRD2	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2	0,512	7,32E-06
ASB6	ankyrin repeat and SOCS box containing 6	0,481	2,74E-06	PNRC2	proline rich nuclear receptor coactivator 2	0,436	1,16E-05
HBD	hemoglobin subunit delta	0,474	3,43E-06	CEP170	centrosomal protein 170	0,435	1,21E-05
SNORA30	small nucleolar RNA, H/ACA box 30	0,471	3,86E-06	ZNF192	zinc finger protein 192	0,422	1,79E-05
PUSL1	pseudouridine synthase like 1	0,530	3,89E-06	ARHGAP17	Rho GTPase activating protein 17	0,415	2,24E-05
PTK2B	protein tyrosine kinase 2 beta	0,465	4,62E-06	IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	0,408	2,78E-05
RGS18	regulator of G protein signaling 18	0,462	5,07E-06	ZMYM4	zinc finger MYM-type containing 4	0,404	3,11E-05
ORAI3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	0,450	7,68E-06	ZNF251	zinc finger protein 251	0,401	3,39E-05
DGCR11	DiGeorge syndrome critical region gene 11	0,448	7,94E-06	TUBGCP5	tubulin gamma complex component 5	0,455	4,42E-05
ZNF688	zinc finger protein 688	0,495	1,29E-05	PHACTR4	phosphatase and actin regulator 4	0,391	4,49E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
LMBR1L	limb development membrane protein 1 like	0,424	1,69E-05	ZSWIM5	zinc finger SWIM-type containing 5	0,390	4,64E-05
ZNF223	zinc finger protein 223	0,421	1,84E-05	GABBR1	gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1	0,451	5,08E-05
NCSTN	nicastrin	0,412	2,46E-05	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3	0,386	5,19E-05
C17orf59	BLOC-1 related complex subunit 6	0,404	3,12E-05	AGAP1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1	0,386	5,22E-05
TMEM179B	transmembrane protein 179B	0,400	3,54E-05	NAP1L4	nucleosome assembly protein 1 like 4	0,385	5,47E-05
SNORA36A	small nucleolar RNA, H/ACA box 36A	0,394	4,21E-05	ARID1A	AT-rich interaction domain 1A	0,384	5,62E-05
ANKRD13D	ankyrin repeat domain 13D	0,388	4,97E-05	SRSF10	serine and arginine rich splicing factor 10	0,384	5,64E-05
SPNS1	SPNS lysolipid transporter 1, lysophospholipid	0,384	5,55E-05	LEPREL2	prolyl 3-hydroxylase 3	0,446	5,85E-05
UHMK1	U2AF homology motif kinase 1	0,384	5,58E-05	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	0,382	5,91E-05
VPS29	VPS29 retromer complex component	0,383	5,82E-05	TLE4	TLE family member 4, transcriptional corepressor	0,381	6,14E-05
SCARNA18	small Cajal body-specific RNA 18	0,381	6,00E-05	STIP1	stress induced phosphoprotein 1	0,380	6,20E-05
SCARB2	scavenger receptor class B member 2	0,380	6,23E-05	DOK6	docking protein 6	0,378	6,69E-05
SNORA75	Small nucleolar RNA H/ACA box 75	0,380	6,33E-05	LOC284551	NA	0,377	6,75E-05
ENDOV	endonuclease V	0,376	7,01E-05	ARHGEF25	Rho guanine nucleotide exchange factor 25	0,441	6,89E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
RTCA	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	0,376	7,07E-05	PCDHGA6	protocadherin gamma subfamily A, 6	0,376	7,01E-05
SNORA34	small nucleolar RNA, H/ACA box 34	0,375	7,29E-05	NMNAT1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1	0,376	7,08E-05
ZDHHC16	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 16	0,374	7,42E-05	BRD4	bromodomain containing 4	0,374	7,37E-05
MCEE	methylmalonyl-CoA epimerase	0,374	7,42E-05	SKI	SKI proto-oncogene	0,437	7,57E-05
ATP6V0B	ATPase H ⁺ transporting V0 subunit b	0,373	7,52E-05	PPP2R5E	protein phosphatase 2 regulatory subunit B'epsilon	0,372	7,78E-05
NOSIP	nitric oxide synthase interacting protein	0,369	8,47E-05	NR2C2	nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	0,371	7,97E-05
HERC4	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4	0,369	8,65E-05	SNRPB2	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B2	0,371	8,01E-05
TM9SF1	transmembrane 9 superfamily member 1	0,368	8,70E-05	STK24	serine/threonine kinase 24	0,371	8,05E-05
SNORA74A	small nucleolar RNA, H/ACA box 74A	0,366	9,21E-05	EMX2	empty spiracles homeobox 2	0,370	8,26E-05
MRPL21	mitochondrial ribosomal protein L21	0,365	9,54E-05	OPHN1	oligophrenin 1	0,368	8,74E-05
EDEM2	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 2	0,365	9,66E-05	ZNF445	zinc finger protein 445	0,365	9,51E-05
SCARNA1	small Cajal body-specific RNA 1	0,364	9,73E-05	FOXK2	forkhead box K2	0,365	9,67E-05
SNORA16A	small nucleolar RNA, H/ACA box 16A	0,427	1,02E-04	TRIM24	tripartite motif containing 24	0,363	9,97E-05
EHBP1L1	EH domain binding protein 1 like 1	0,427	1,03E-04	TBXA2R	thromboxane A2 receptor	0,427	1,03E-04
BRD1	bromodomain containing 1	0,360	1,08E-04	AFF4	ALF transcription elongation factor 4	0,362	1,05E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
PIGN	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class N	0,360	1,11E-04	PBRM1	polybromo 1	0,362	1,05E-04
VKORC1	vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	0,360	1,11E-04	ZNF440	zinc finger protein 440	0,360	1,10E-04
DSCR3	VPS26 endosomal protein sorting factor C	0,358	1,17E-04	ZC3H14	zinc finger CCCH-type containing 14	0,360	1,11E-04
RNF170	ring finger protein 170	0,355	1,25E-04	MTHFSD	methenyltetrahydrofolate synthetase domain containing	0,359	1,13E-04
PLEKHJ1	pleckstrin homology domain containing J1	0,353	1,32E-04	DNAJA4	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A4	0,358	1,15E-04
STAU2	staufen double-stranded RNA binding protein 2	0,353	1,35E-04	DNAJC4	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C4	0,357	1,21E-04
POP4	POP4 homolog, ribonuclease P/MRP subunit	0,352	1,35E-04	FAM122B	PABIR family member 2	0,356	1,21E-04
CRLS1	cardiolipin synthase 1	0,352	1,36E-04	PDZD4	PDZ domain containing 4	0,354	1,29E-04
SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	0,352	1,37E-04	SETD6	SET domain containing 6, protein lysine methyltransferase	0,354	1,30E-04
SELO	selenoprotein O	0,352	1,38E-04	RAI1	retinoic acid induced 1	0,352	1,36E-04
TMBIM4	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4	0,350	1,45E-04	GTF2IRD2P1	GTF2I repeat domain containing 2 pseudogene 1	0,352	1,37E-04
APEX2	apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 2	0,349	1,47E-04	GID8	GID complex subunit 8 homolog	0,347	1,59E-04
SLC35B2	solute carrier family 35 member B2	0,348	1,54E-04	CTCF	CCCTC-binding factor	0,347	1,59E-04
PLOD3	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	0,347	1,56E-04	LYRM2	LYR motif containing 2	0,346	1,63E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
SNORA74B	small nucleolar RNA, H/ACA box 74B	0,345	1,66E-04	NF1	neurofibromin 1	0,345	1,66E-04
METTL25	methyltransferase like 25	0,345	1,67E-04	LOC286437	NA	0,345	1,67E-04
B3GALT4	beta-1,3-galactosyltransferase 4	0,344	1,71E-04	RLIM	ring finger protein, LIM domain interacting	0,343	1,74E-04
CCPG1	cell cycle progression 1	0,344	1,71E-04	VRK2	VRK serine/threonine kinase 2	0,342	1,79E-04
SNORA5C	small nucleolar RNA, H/ACA box 5C	0,344	1,72E-04	BMP1	bone morphogenetic protein 1	0,342	1,79E-04
GLUD1	glutamate dehydrogenase 1	0,343	1,73E-04	AKIRIN2	akirin 2	0,342	1,82E-04
MFSD1	major facilitator superfamily domain containing 1	0,343	1,76E-04	THG1L	tRNA-histidine guanylyltransferase 1 like	0,341	1,84E-04
FPGS	folypolyglutamate synthase	0,341	1,83E-04	R3HDM1	R3H domain containing 1	0,340	1,90E-04
SNORA80B	small nucleolar RNA, H/ACA box 80B	0,406	1,86E-04	SOCS7	suppressor of cytokine signaling 7	0,339	1,96E-04
SNORA8	small nucleolar RNA, H/ACA box 8	0,341	1,87E-04	CUZD1	CUB and zona pellucida like domains 1	0,334	2,22E-04
EMC1	ER membrane protein complex subunit 1	0,340	1,89E-04	WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	0,393	2,65E-04
ZDHHC24	zinc finger DHHC-type containing 24	0,340	1,90E-04	SATB2	SATB homeobox 2	0,327	2,68E-04
ITPKC	inositol-trisphosphate 3-kinase C	0,339	1,94E-04	HDGFRP3	HDGF like 3	0,393	2,68E-04
GPAA1	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1	0,339	1,96E-04	ANKRD46	ankyrin repeat domain 46	0,392	2,74E-04
SNORA33	small nucleolar RNA, H/ACA box 33	0,336	2,11E-04	HNRNPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	0,325	2,87E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
TSPAN14	tetraspanin 14	0,328	2,64E-04	CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	0,324	2,95E-04
PIH1D1	PIH1 domain containing 1	0,328	2,65E-04	SLC22A17	solute carrier family 22 member 17	0,389	2,96E-04
KLHL26	kelch like family member 26	0,318	3,40E-04	LOC100505687	NA	0,322	3,06E-04
HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	0,315	3,67E-04	BCL9	BCL9 transcription coactivator	0,384	3,33E-04
TBC1D16	TBC1 domain family member 16	0,377	4,04E-04	TBX3	T-box transcription factor 3	0,382	3,57E-04
SNORA48	small nucleolar RNA, H/ACA box 48	0,307	4,60E-04	ABL1	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	0,381	3,62E-04
JAG2	jagged canonical Notch ligand 2	0,371	4,73E-04	MSTN	myostatin	0,379	3,81E-04
SNORA10	small nucleolar RNA, H/ACA box 10	0,366	0,001	RPL26	ribosomal protein L26	0,377	4,02E-04
RAD9A	RAD9 checkpoint clamp component A	0,359	0,001	SARDH	sarcosine dehydrogenase	0,375	4,30E-04
SNORA47	small nucleolar RNA, H/ACA box 47	0,354	0,001	ACTR8	actin related protein 8	0,371	4,73E-04
CISH	cytokine inducible SH2 containing protein	0,354	0,001	OLFML1	olfactomedin like 1	0,369	4,98E-04
TREX1	three prime repair exonuclease 1	0,348	0,001	ACOX2	acyl-CoA oxidase 2	0,368	0,001
MCOLN1	mucolipin TRP cation channel 1	0,345	0,001	EFS	embryonal Fyn-associated substrate	0,363	0,001
RILP	Rab interacting lysosomal protein	0,344	0,001	MLL5	lysine methyltransferase 2E (inactive)	0,363	0,001
				RASA3	RAS p21 protein activator 3	0,361	0,001
				MAN1C1	mannosidase alpha class 1C member 1	0,360	0,001
				DCLK1	doublecortin like kinase 1	0,360	0,001

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
				PRDM1	PR/SET domain 1	0,358	0,001
				NAB2	NGFI-A binding protein 2	0,356	0,001
				C3orf72	FOXL2 neighbor	0,352	0,001
				FLNC	filamin C	0,351	0,001
				GLIPR1L2	GLIPR1 like 2	0,351	0,001

Se recogen los 182 genes significativamente afectados por incrementos en las concentraciones de cortisol agrupados en función de su tendencia de expresión: los genes del grupo 1 (87 genes) son aquellos que aumentan su expresión y los del grupo 2 (95 genes) los que la disminuyen conforme las concentraciones de cortisol aumentan.

Tabla Suplementaria 7. 501 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estrona.

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
PER1	period circadian regulator 1	0,554	1,29E-08	IL33	interleukin 33	0,590	1,94E-09
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family member A3	0,554	1,31E-08	KIAA1456	tRNA methyltransferase 9B (putative)	0,559	1,02E-08
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16	0,551	1,48E-08	DUSP16	dual specificity phosphatase 16	0,556	1,17E-08
LGI4	leucine rich repeat LGI family member 4	0,546	1,93E-08	PAG1	phosphoprotein membrane anchor with glycosphingolipid microdomains 1	0,556	1,17E-08
PLCL1	phospholipase C like 1 (inactive)	0,542	2,34E-08	PDGFRL	platelet derived growth factor receptor like	0,532	3,78E-08
KCNH1	potassium voltage-gated channel subfamily H member 1	0,532	3,74E-08	IRS1	insulin receptor substrate 1	0,527	4,72E-08
LHFPL3	LHFPL tetraspan subfamily member 3	0,522	6,19E-08	MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6	0,510	1,06E-07
MEDAG	mesenteric estrogen dependent adipogenesis	0,520	6,64E-08	NDNF	neuron derived neurotrophic factor	0,509	1,13E-07
ANGPTL1	angiopoietin like 1	0,516	8,18E-08	CYTH3	cytohesin 3	0,504	1,41E-07

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
COL4A6	collagen type IV alpha 6 chain	0,512	9,55E-08	BOD1	biorientation of chromosomes in cell division 1	0,491	2,57E-07
LOC100505875	NA	0,511	1,00E-07	SFRP1	secreted frizzled related protein 1	0,485	3,29E-07
JPH1	junctophilin 1	0,483	3,56E-07	ZNF704	zinc finger protein 704	0,482	3,68E-07
OR5C1	olfactory receptor family 5 subfamily C member 1	0,480	4,11E-07	SPRED2	sprouty related EVH1 domain containing 2	0,480	4,07E-07
FAM46A	terminal nucleotidyltransferase 5A	0,470	6,37E-07	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	0,474	5,37E-07
FAM176C	eva-1 homolog C	0,469	6,53E-07	UXS1	UDP-glucuronate decarboxylase 1	0,458	1,02E-06
CYP4B1	cytochrome P450 family 4 subfamily B member 1	0,461	9,21E-07	B4GALT5	beta-1,4-galactosyltransferase 5	0,449	1,51E-06
SNAP23	synaptosome associated protein 23	0,457	1,10E-06	MSI2	musashi RNA binding protein 2	0,448	1,55E-06
CRISPLD2	cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2	0,453	1,28E-06	FJX1	four-jointed box kinase 1	0,447	1,66E-06
LYST	lysosomal trafficking regulator	0,450	1,41E-06	FEM1C	fem-1 homolog C	0,446	1,70E-06
ABCC8	ATP binding cassette subfamily C member 8	0,449	1,49E-06	TBL1XR1	TBL1X/Y related 1	0,443	1,90E-06
SLC2A8	solute carrier family 2 member 8	0,444	1,87E-06	FMO1	flavin containing dimethylaniline monooxygenase 1	0,440	2,17E-06
CILP	cartilage intermediate layer protein	0,443	1,93E-06	SLC5A3	solute carrier family 5 member 3	0,439	2,27E-06
FKBP5	FKBP prolyl isomerase 5	0,442	2,00E-06	F13A1	coagulation factor XIII A chain	0,439	2,28E-06
RHOBTB3	Rho related BTB domain containing 3	0,440	2,16E-06	GLRB	glycine receptor beta	0,437	2,45E-06
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13	0,439	2,21E-06	ISOC1	isochorismatase domain containing 1	0,436	2,56E-06
BVES-AS1	BVES antisense RNA 1	0,436	2,58E-06	DACH1	dachshund family transcription factor 1	0,433	2,84E-06

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
LOC100506388	NA	0,434	2,71E-06	SYT11	synaptotagmin 11	0,426	3,77E-06
TRIM56	tripartite motif containing 56	0,434	2,76E-06	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	0,425	3,93E-06
NPR3	natriuretic peptide receptor 3	0,432	3,01E-06	FHOD3	formin homology 2 domain containing 3	0,423	4,23E-06
ARRDC2	arrestin domain containing 2	0,432	3,03E-06	RTKN2	rhotekin 2	0,423	4,25E-06
BVES	blood vessel epicardial substance	0,422	4,38E-06	VIM	vimentin	0,422	4,44E-06
MME	membrane metalloendopeptidase	0,421	4,58E-06	PAMR1	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1	0,421	4,51E-06
PKD1	polycystin 1, transient receptor potential channel interacting	0,420	4,72E-06	CAP2	cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 2	0,419	5,03E-06
LINC00115	long intergenic non-protein coding RNA 115	0,419	4,99E-06	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1	0,419	5,04E-06
DBC1	BMP/retinoic acid inducible neural specific 1	0,417	5,31E-06	MMP11	matrix metalloproteinase 11	0,418	5,07E-06
PGBD4	piggyBac transposable element derived 4	0,416	5,58E-06	INHBA	inhibin subunit beta A	0,418	5,21E-06
PC	pyruvate carboxylase	0,408	7,42E-06	GALNT5	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	0,417	5,43E-06
PTN	pleiotrophin	0,408	7,49E-06	USP27X	ubiquitin specific peptidase 27 X-linked	0,413	6,20E-06
FAM198A	golgi associated kinase 1A	0,406	8,19E-06	ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family member A1	0,413	6,32E-06
LOC100129269	NA	0,405	8,46E-06	PDGFC	platelet derived growth factor C	0,412	6,36E-06
AKAP13	A-kinase anchoring protein 13	0,404	8,85E-06	PLXDC2	plexin domain containing 2	0,410	7,09E-06

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
GRIA1	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1	0,402	9,58E-06	CMTM6	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 6	0,408	7,43E-06
FAM199X	family with sequence similarity 199, X-linked	0,398	1,09E-05	ENC1	ectodermal-neural cortex 1	0,405	8,31E-06
SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	0,398	1,10E-05	FMR1	fragile X messenger ribonucleoprotein 1	0,404	8,73E-06
PRODH	proline dehydrogenase 1	0,397	1,15E-05	RBMS2	RNA binding motif single stranded interacting protein 2	0,403	9,19E-06
DFNB31	whirlin	0,396	1,17E-05	PTGFRN	prostaglandin F2 receptor inhibitor	0,402	9,40E-06
DENND3	DENN domain containing 3	0,394	1,26E-05	RPA2	replication protein A2	0,401	9,87E-06
TEAD3	TEA domain transcription factor 3	0,394	1,28E-05	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	0,400	1,02E-05
ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	0,393	1,32E-05	ZC3H4	zinc finger CCCH-type containing 4	0,400	1,02E-05
ATF7	activating transcription factor 7	0,392	1,37E-05	ELOF1	elongation factor 1	0,400	1,03E-05
NOL3	nucleolar protein 3	0,392	1,39E-05	AGPAT9	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	0,400	1,04E-05
PTGDS	prostaglandin D2 synthase	0,391	1,44E-05	FAM53C	family with sequence similarity 53 member C	0,397	1,14E-05
XYLT1	xylosyltransferase 1	0,389	1,54E-05	HEXB	hexosaminidase subunit beta	0,395	1,24E-05
LOC440297	NA	0,388	1,57E-05	BRK1	BRICK1 subunit of SCAR/WAVE actin nucleating complex	0,394	1,30E-05
PLXNA3	plexin A3	0,388	1,61E-05	SLFN5	schlafen family member 5	0,393	1,30E-05
TMEM61	transmembrane protein 61	0,387	1,65E-05	ITGB1	integrin subunit beta 1	0,393	1,35E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
ZZEF1	zinc finger ZZ-type and EF-hand domain containing 1	0,387	1,65E-05	DUSP7	dual specificity phosphatase 7	0,392	1,40E-05
ARMC12	armadillo repeat containing 12	0,386	1,69E-05	IPO7	importin 7	0,391	1,41E-05
TMEM120A	transmembrane protein 120A	0,385	1,80E-05	SRSF9	serine and arginine rich splicing factor 9	0,391	1,44E-05
RGS2	regulator of G protein signaling 2	0,383	1,94E-05	KCTD2	potassium channel tetramerization domain containing 2	0,390	1,46E-05
UFSP1	UFM1 specific peptidase 1 (inactive)	0,379	2,18E-05	YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	0,389	1,51E-05
SLC30A2	solute carrier family 30 member 2	0,379	2,18E-05	THOC7	THO complex subunit 7	0,389	1,56E-05
C18orf21	chromosome 18 open reading frame 21	0,378	2,25E-05	SNRNP200	small nuclear ribonucleoprotein U5 subunit 200	0,388	1,56E-05
DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	0,377	2,41E-05	STT3B	STT3 oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit B	0,388	1,60E-05
ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6	0,376	2,45E-05	PDE3A	phosphodiesterase 3A	0,387	1,65E-05
RBM45	RNA binding motif protein 45	0,376	2,46E-05	FBN2	fibrillin 2	0,387	1,67E-05
sept5	septin 5	0,376	2,48E-05	MGAT5	alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	0,386	1,74E-05
TCF23	transcription factor 23	0,376	2,51E-05	LBH	LBH regulator of WNT signaling pathway	0,385	1,79E-05
LIPG	lipase G, endothelial type	0,375	2,57E-05	GFRA2	GDNF family receptor alpha 2	0,384	1,81E-05
ATF6B	activating transcription factor 6 beta	0,321	2,74E-05	GOLGA7	golgin A7	0,384	1,84E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
EBF1	EBF transcription factor 1	0,371	2,90E-05	LRRC8D	leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit D	0,383	1,89E-05
LOC554206	NA	0,371	2,92E-05	PODXL2	podocalyxin like 2	0,383	1,90E-05
SORBS3	sorbin and SH3 domain containing 3	0,371	2,92E-05	CA11	carbonic anhydrase 11	0,382	1,96E-05
CRISP3	cysteine rich secretory protein 3	0,371	2,93E-05	CPZ	carboxypeptidase Z	0,382	2,00E-05
ARHGAP20	Rho GTPase activating protein 20	0,371	2,94E-05	SGK196	protein O-mannose kinase	0,380	2,15E-05
ZNF80	zinc finger protein 80	0,371	2,97E-05	TSPYL5	TSPY like 5	0,379	2,22E-05
KLF4	KLF transcription factor 4	0,370	3,07E-05	CPQ	carboxypeptidase Q	0,378	2,25E-05
MYOZ2	myozenin 2	0,368	3,24E-05	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	0,377	2,36E-05
LOC100132356	NA	0,367	3,36E-05	RBP7	retinol binding protein 7	0,376	2,48E-05
C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21	0,366	3,56E-05	CDH2	cadherin 2	0,376	2,50E-05
PHLDB1	pleckstrin homology like domain family B member 1	0,366	3,56E-05	C7orf50	chromosome 7 open reading frame 50	0,375	2,52E-05
KLF9	KLF transcription factor 9	0,366	3,57E-05	SESN3	sestrin 3	0,375	2,52E-05
DHX58	DEXH-box helicase 58	0,365	3,61E-05	SCPEP1	serine carboxypeptidase 1	0,374	2,69E-05
ATG4A	autophagy related 4A cysteine peptidase	0,364	3,73E-05	FAM210B	family with sequence similarity 210 member B	0,374	2,69E-05
C9orf114	SPOUT domain containing methyltransferase 1	0,364	3,73E-05	RAB34	RAB34, member RAS oncogene family	0,372	2,86E-05
TRAPPC8	trafficking protein particle complex subunit 8	0,364	3,75E-05	ZNF664	zinc finger protein 664	0,371	2,91E-05
CFD	complement factor D	0,363	3,85E-05	NPC2	NPC intracellular cholesterol transporter 2	0,369	3,18E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
HSF4	heat shock transcription factor 4	0,360	4,28E-05	CYGB	cytoglobin	0,368	3,30E-05
HECTD4	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4	0,360	4,31E-05	SMNDC1	survival motor neuron domain containing 1	0,367	3,43E-05
EZH1	enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit	0,360	4,41E-05	RARRES2	retinoic acid receptor responder 2	0,366	3,51E-05
LOC440300	NA	0,359	4,44E-05	OSBPL8	oxysterol binding protein like 8	0,366	3,57E-05
GANC	glucosidase alpha, neutral C	0,359	4,46E-05	TSPAN6	tetraspanin 6	0,364	3,82E-05
TOX2	TOX high mobility group box family member 2	0,359	4,57E-05	CCNY	cyclin Y	0,363	3,86E-05
FAM178A	SMC5-SMC6 complex localization factor 2	0,357	4,81E-05	CPM	carboxypeptidase M	0,363	3,87E-05
PLA2G4F	phospholipase A2 group IVF	0,357	4,81E-05	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	0,363	3,88E-05
INPP5A	inositol polyphosphate-5-phosphatase A	0,357	4,92E-05	WBP11	WW domain binding protein 11	0,363	3,97E-05
CHKB	choline kinase beta	0,356	5,01E-05	MDFIC	MyoD family inhibitor domain containing	0,362	4,00E-05
HIF3A	hypoxia inducible factor 3 subunit alpha	0,356	5,01E-05	GJA4	gap junction protein alpha 4	0,362	4,10E-05
DUOX2	dual oxidase 2	0,355	5,26E-05	NPM1	nucleophosmin 1	0,362	4,12E-05
PRTG	protogenin	0,354	5,28E-05	PAM	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	0,361	4,13E-05
NBR2	neighbor of BRCA1 lncRNA 2	0,354	5,29E-05	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	0,361	4,19E-05
PIKFYVE	phosphoinositide kinase, FYVE-type zinc finger containing	0,354	5,33E-05	MTMR2	myotubularin related protein 2	0,361	4,21E-05
SWT1	SWT1 RNA endoribonuclease homolog	0,354	5,41E-05	FOX L2	forkhead box L2	0,361	4,25E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
CAPN3	calpain 3	0,353	5,51E-05	EEFSEC	eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific	0,308	4,28E-05
SOCS2-AS1	SOCS2 antisense RNA 1	0,352	5,67E-05	FCER1A	Fc epsilon receptor 1a	0,308	4,30E-05
ANKRD33B	ankyrin repeat domain 33B	0,350	6,09E-05	FZD4	frizzled class receptor 4	0,360	4,33E-05
PGK2	phosphoglycerate kinase 2	0,350	6,10E-05	HSDL2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	0,359	4,44E-05
TMEM196	transmembrane protein 196	0,350	6,10E-05	RHEB	Ras homolog, mTORC1 binding	0,359	4,55E-05
TYRO3P	TYRO3P protein tyrosine kinase pseudogene	0,350	6,16E-05	CETN2	centrin 2	0,358	4,67E-05
LZTR1	leucine zipper like post translational regulator 1	0,349	6,36E-05	TRIB2	tribbles pseudokinase 2	0,357	4,82E-05
STEAP4	STEAP4 metalloredutase	0,349	6,44E-05	FANCG	FA complementation group G	0,357	4,86E-05
PITPNM2	phosphatidylinositol transfer protein membrane associated 2	0,349	6,48E-05	TRIM28	tripartite motif containing 28	0,356	5,07E-05
SOCS4	suppressor of cytokine signaling 4	0,348	6,62E-05	RHOBTB1	Rho related BTB domain containing 1	0,356	5,08E-05
PLCXD3	phosphatidylinositol specific phospholipase C X domain containing 3	0,348	6,67E-05	DEK	DEK proto-oncogene	0,356	5,08E-05
DGKB	diacylglycerol kinase beta	0,348	6,69E-05	TMEM60	transmembrane protein 60	0,355	5,10E-05
HS1BP3	HCLS1 binding protein 3	0,347	6,84E-05	RNF187	ring finger protein 187	0,355	5,20E-05
PNPLA7	patatin like phospholipase domain containing 7	0,347	6,84E-05	DKK3	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3	0,354	5,39E-05
RGS11	regulator of G protein signaling 11	0,345	7,40E-05	TMX4	thioredoxin related transmembrane protein 4	0,353	5,49E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
FASN	fatty acid synthase	0,345	7,46E-05	MRPS27	mitochondrial ribosomal protein S27	0,353	5,54E-05
ATP10A	ATPase phospholipid transporting 10A (putative)	0,344	7,67E-05	MRAP2	melanocortin 2 receptor accessory protein 2	0,353	5,55E-05
PRLR	prolactin receptor	0,344	7,71E-05	CADM4	cell adhesion molecule 4	0,352	5,73E-05
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	0,343	7,78E-05	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	0,352	5,83E-05
CYP2C9	cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9	0,343	7,95E-05	SLC39A6	solute carrier family 39 member 6	0,352	5,84E-05
ADAMTS8	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 8	0,342	8,20E-05	C11orf24	chromosome 11 open reading frame 24	0,351	5,97E-05
BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3	0,341	8,39E-05	KRT37	keratin 37	0,351	6,02E-05
GBA2	glucosylceramidase beta 2	0,341	8,47E-05	MRPL9	mitochondrial ribosomal protein L9	0,350	6,10E-05
LOC493754	NA	0,340	8,68E-05	MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	0,350	6,14E-05
ZNF354B	zinc finger protein 354B	0,340	8,82E-05	ZCCHC17	zinc finger CCHC-type containing 17	0,349	6,30E-05
PLEC	plectin	0,339	9,01E-05	ICMT	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	0,349	6,30E-05
LIMD1	LIM domain containing 1	0,338	9,18E-05	CLNS1A	chloride nucleotide-sensitive channel 1A	0,349	6,44E-05
CACNB2	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 2	0,338	9,34E-05	KCNE3	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 3	0,348	6,53E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
CLEC3B	C-type lectin domain family 3 member B	0,337	9,48E-05	ARMC10	armadillo repeat containing 10	0,348	6,58E-05
LEFTY1	left-right determination factor 1	0,337	9,55E-05	RHOJ	ras homolog family member J	0,348	6,65E-05
ENO3	enolase 3	0,336	1,00E-04	FZD10	frizzled class receptor 10	0,345	7,36E-05
DHRS4L2	dehydrogenase/reductase 4 like 2	0,335	1,02E-04	PHAX	phosphorylated adaptor for RNA export	0,345	7,39E-05
RHOU	ras homolog family member U	0,335	1,02E-04	WLS	Wnt ligand secretion mediator	0,345	7,43E-05
TAP2	transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member	0,333	1,09E-04	C16orf80	cilia and flagella associated protein 20	0,345	7,44E-05
ASAP3	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3	0,331	1,17E-04	UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,344	7,66E-05
SYNE3	spectrin repeat containing nuclear envelope family member 3	0,331	1,19E-04	SLC9A7	solute carrier family 9 member A7	0,344	7,69E-05
TAZ	WW domain containing transcription regulator 1	0,330	1,22E-04	TPGS2	tubulin polyglutamylase complex subunit 2	0,343	7,93E-05
FAM160B1	FHF complex subunit HOOK interacting protein 2A	0,330	1,22E-04	ODC1	ornithine decarboxylase 1	0,342	8,00E-05
MGC16142	NA	0,330	1,22E-04	NRP2	neuropilin 2	0,342	8,00E-05
NANOG	Nanog homeobox	0,330	1,24E-04	ETV1	ETS variant transcription factor 1	0,342	8,06E-05
ABO	ABO, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase and alpha 1-3-galactosyltransferase	0,330	1,24E-04	SEZ6L2	seizure related 6 homolog like 2	0,341	8,30E-05

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
FLT3LG	fms related receptor tyrosine kinase 3 ligand	0,329	1,25E-04	PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1	0,341	8,32E-05
STAR	steroidogenic acute regulatory protein	0,329	1,27E-04	TUBA1A	tubulin alpha 1a	0,341	8,47E-05
MAP3K10	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10	0,328	1,30E-04	CLUAP1	clusterin associated protein 1	0,341	8,51E-05
UPK1B	uroplakin 1B	0,327	1,34E-04	FAM168B	family with sequence similarity 168 member B	0,340	8,68E-05
AGAP7	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 7, pseudogene	0,327	1,36E-04	EDIL3	EGF like repeats and discoidin domains 3	0,340	8,70E-05
TCIRG1	T cell immune regulator 1, ATPase H ⁺ transporting V0 subunit a3	0,326	1,37E-04	ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)	0,340	8,73E-05
SLC22A3	solute carrier family 22 member 3	0,326	1,40E-04	DPYSL3	dihydropyrimidinase like 3	0,339	8,93E-05
TIPARP	TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase	0,326	1,40E-04	MSH2	mutS homolog 2	0,339	8,94E-05
KLF15	KLF transcription factor 15	0,324	1,48E-04	FKBP1A	FKBP prolyl isomerase 1A	0,339	9,05E-05
LRRK1	leucine rich repeat kinase 1	0,324	1,51E-04	PIGX	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class X	0,338	9,44E-05
ZNF224	zinc finger protein 224	0,323	1,52E-04	CDK2	cyclin dependent kinase 2	0,337	9,60E-05
MST1	macrophage stimulating 1	0,323	1,52E-04	B3GALT1	beta 3-glucosyltransferase	0,337	9,66E-05
ATPBD4	diphthamine biosynthesis 6	0,322	1,59E-04	BTBD10	BTB domain containing 10	0,336	9,83E-05
PIGG	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class G	0,322	1,60E-04	LOC550643	NA	0,336	1,00E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
MKL1	myocardin related transcription factor A	0,321	1,63E-04	SYAP1	synapse associated protein 1	0,335	1,02E-04
SECISBP2L	SECIS binding protein 2 like	0,321	1,64E-04	PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3	0,335	1,05E-04
PRDM8	PR/SET domain 8	0,321	1,65E-04	SLC25A23	solute carrier family 25 member 23	0,333	1,11E-04
ERICH1	glutamate rich 1	0,319	1,78E-04	HMGB2	high mobility group box 2	0,332	1,13E-04
KCNQ1OT1	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1	0,318	1,80E-04	PEPD	peptidase D	0,332	1,13E-04
ZNF274	zinc finger protein 274	0,318	1,81E-04	SH3BP4	SH3 domain binding protein 4	0,332	1,14E-04
PLCH2	phospholipase C eta 2	0,318	1,84E-04	HDAC2	histone deacetylase 2	0,332	1,14E-04
KIAA1033	WASH complex subunit 4	0,318	1,85E-04	MEA1	male-enhanced antigen 1	0,332	1,15E-04
TRMT61A	tRNA methyltransferase 61A	0,318	1,85E-04	RAB30	RAB30, member RAS oncogene family	0,332	1,16E-04
ATXN1L	ataxin 1 like	0,317	1,86E-04	RNF2	ring finger protein 2	0,331	1,16E-04
GMPPA	GDP-mannose pyrophosphorylase A	0,317	1,88E-04	QSOX1	quiescin sulfhydryl oxidase 1	0,331	1,17E-04
VN1R1	vomer nasal 1 receptor 1	0,316	1,92E-04	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	0,331	1,18E-04
WIP1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	0,316	1,92E-04	SPOP	speckle type BTB/POZ protein	0,330	1,22E-04
CRTC1	CREB regulated transcription coactivator 1	0,316	1,94E-04	ECT2	epithelial cell transforming 2	0,330	1,23E-04
SZT2	SZT2 subunit of KICSTOR complex	0,316	1,95E-04	ACER2	alkaline ceramidase 2	0,330	1,24E-04
PMS2P4	PMS1 homolog 2, mismatch repair system component pseudogene 4	0,315	1,98E-04	CNN3	calponin 3	0,330	1,24E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
TBC1D3H	TBC1 domain family member 3H	0,315	2,00E-04	GNB1	G protein subunit beta 1	0,330	1,24E-04
PKD1L2	polycystin 1 like 2 (gene/pseudogene)	0,314	2,05E-04	KCNK15	potassium two pore domain channel subfamily K member 15	0,329	1,24E-04
KIF5A	kinesin family member 5A	0,313	2,11E-04	OSGEP	O-sialoglycoprotein endopeptidase	0,329	1,24E-04
SULT1E1	sulfotransferase family 1E member 1	0,313	2,14E-04	SET	SET nuclear proto-oncogene	0,329	1,25E-04
PALM	paralemmin	0,313	2,16E-04	CBY1	chibby 1, beta catenin antagonist	0,329	1,26E-04
GRB10	growth factor receptor bound protein 10	0,312	2,18E-04	KIF24	kinesin family member 24	0,329	1,27E-04
LIN37	lin-37 DREAM MuvB core complex component	0,312	2,23E-04	H2AFV	H2A.Z variant histone 2	0,329	1,27E-04
RNF13	ring finger protein 13	0,311	2,28E-04	CADM1	cell adhesion molecule 1	0,328	1,30E-04
OR11H4	olfactory receptor family 11 subfamily H member 4	0,311	2,30E-04	TMEM106C	transmembrane protein 106C	0,328	1,31E-04
KCNQ3	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3	0,311	2,32E-04	RNF26	ring finger protein 26	0,327	1,34E-04
CALML6	calmodulin like 6	0,311	2,33E-04	PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	0,327	1,35E-04
C9orf47	sphingosine-1-phosphate receptor 3	0,310	2,34E-04	NGRN	neugrin, neurite outgrowth associated	0,326	1,39E-04
PPP1R15B	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B	0,310	2,37E-04	GALNT1	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	0,326	1,40E-04
ELN	elastin	0,310	2,37E-04	SOS1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	0,326	1,40E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	Nombre	Símbolo	Nombre	R ²	Nombre
SIDT1	SID1 transmembrane family member 1	0,309	2,44E-04	R3HCC1	R3H domain and coiled-coil containing 1	0,326	1,40E-04
STK19	serine/threonine kinase 19	0,309	2,45E-04	DNAJA1	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1	0,325	1,43E-04
ENTHD2	TEPSIN adaptor related protein complex 4 accessory protein	0,308	2,49E-04	KCNN4	potassium calcium-activated channel subfamily N member 4	0,325	1,44E-04
FAM212B	inka box actin regulator 2	0,308	2,50E-04	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0,325	1,45E-04
RNH1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	0,308	2,51E-04	MMP7	matrix metalloproteinase 7	0,325	1,45E-04
ITGB8	integrin subunit beta 8	0,307	2,58E-04	DNAJB5	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B5	0,325	1,45E-04
NPW	neuropeptide W	0,307	2,59E-04	MOSPD1	motile sperm domain containing 1	0,324	1,51E-04
LENG1	leukocyte receptor cluster member 1	0,307	2,59E-04	PPP3R1	protein phosphatase 3 regulatory subunit B, alpha	0,323	1,54E-04
GARNL3	GTPase activating Rap/RanGAP domain like 3	0,307	2,60E-04	CASP2	caspase 2	0,323	1,56E-04
NT5DC3	5'-nucleotidase domain containing 3	0,307	2,64E-04	GDE1	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	0,323	1,56E-04
RCOR3	REST corepressor 3	0,306	2,67E-04	BAMBI	BMP and activin membrane bound inhibitor	0,323	1,57E-04
WDFY2	WD repeat and FYVE domain containing 2	0,306	2,68E-04	LOC100499489	NA	0,322	1,59E-04
HDAC10	histone deacetylase 10	0,306	2,69E-04	KBTBD4	kelch repeat and BTB domain containing 4	0,322	1,60E-04
ITGA1	integrin subunit alpha 1	0,305	2,80E-04	MEST	mesoderm specific transcript	0,322	1,61E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
SLC10A3	solute carrier family 10 member 3	0,305	2,80E-04	UBR7	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7	0,322	1,61E-04
NEK8	NIMA related kinase 8	0,305	2,83E-04	GUCY1A2	guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2	0,322	1,61E-04
LOC727896	NA	0,304	2,83E-04	CASC4	golgi membrane protein 2	0,321	1,64E-04
MFSD6L	major facilitator superfamily domain containing 6 like	0,304	2,84E-04	RAET1K	retinoic acid early transcript 1K (pseudogene)	0,321	1,65E-04
ENGASE	endo-beta-N-acetylglucosaminidase	0,303	2,93E-04	SEMA3E	semaphorin 3E	0,321	1,67E-04
OXCT1	3-oxoacid CoA-transferase 1	0,303	2,95E-04	OLA1	Obg like ATPase 1	0,319	1,75E-04
IRAK3	interleukin 1 receptor associated kinase 3	0,303	2,98E-04	PIGU	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U	0,319	1,75E-04
GPR132	G protein-coupled receptor 132	0,303	3,00E-04	ZMAT4	zinc finger matrin-type 4	0,319	1,76E-04
TTC17	tetratricopeptide repeat domain 17	0,302	3,07E-04	RNASEH2A	ribonuclease H2 subunit A	0,319	1,76E-04
SNX9	sorting nexin 9	0,302	3,08E-04	ARL15	ADP ribosylation factor like GTPase 15	0,319	1,77E-04
ENPEP	glutamyl aminopeptidase	0,302	3,10E-04	NAGPA	N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase	0,319	1,79E-04
LYRM7	LYR motif containing 7	0,301	3,14E-04	RHOD	ras homolog family member D	0,318	1,81E-04
CDHR5	cadherin related family member 5	0,301	3,16E-04	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	0,318	1,82E-04
LINC00672	LASP1 neighbor	0,301	3,22E-04	FAM162B	family with sequence similarity 162 member B	0,318	1,84E-04
TPCN1	two pore segment channel 1	0,300	3,27E-04	WASF1	WASP family member 1	0,318	1,85E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
				EXT1	exostosin glycosyltransferase 1	0,318	1,85E-04
				RAD21	RAD21 cohesin complex component	0,317	1,86E-04
				HSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1	0,317	1,87E-04
				EFNB1	ephrin B1	0,317	1,88E-04
				DNAJC8	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C8	0,317	1,90E-04
				TGIF2	TGFB induced factor homeobox 2	0,317	1,90E-04
				YARS	tyrosyl-tRNA synthetase 1	0,317	1,91E-04
				OVGP1	oviductal glycoprotein 1	0,316	1,92E-04
				C1QTNF7	C1q and TNF related 7	0,316	1,93E-04
				AZIN1	antizyme inhibitor 1	0,316	1,94E-04
				STARD7	StAR related lipid transfer domain containing 7	0,316	1,96E-04
				ATF5	activating transcription factor 5	0,315	2,00E-04
				SRPX2	sushi repeat containing protein X-linked 2	0,315	2,00E-04
				KRR1	KRR1 small subunit processome component homolog	0,315	2,01E-04
				SKP2	S-phase kinase associated protein 2	0,315	2,03E-04
				COMMD4	COMM domain containing 4	0,314	2,09E-04
				GAS2L3	growth arrest specific 2 like 3	0,313	2,12E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
				ADAR	adenosine deaminase RNA specific	0,313	2,13E-04
				ZNF22	zinc finger protein 22	0,313	2,14E-04
				AP5M1	adaptor related protein complex 5 subunit mu 1	0,312	2,20E-04
				TFAM	transcription factor A, mitochondrial	0,312	2,20E-04
				ZBED5	zinc finger BED-type containing 5	0,312	2,24E-04
				TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	0,311	2,26E-04
				CNOT7	CCR4-NOT transcription complex subunit 7	0,311	2,28E-04
				BRCA2	BRCA2 DNA repair associated	0,311	2,31E-04
				SLBP	stem-loop histone mRNA binding protein	0,310	2,34E-04
				LAPTM4B	lysosomal protein transmembrane 4 beta	0,310	2,36E-04
				PKIB	cAMP-dependent protein kinase inhibitor beta	0,310	2,36E-04
				HMGA2	high mobility group AT-hook 2	0,310	2,37E-04
				C5orf49	cilia and flagella associated protein 90	0,310	2,39E-04
				ATP1B3	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 3	0,309	2,41E-04
				HIST1H4E	H4 clustered histone 5	0,309	2,41E-04
				FLOT1	flotillin 1	0,309	2,46E-04
				HIST1H4C	H4 clustered histone 3	0,309	2,48E-04
				PVRL2	nectin cell adhesion molecule 2	0,309	2,48E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
				GGH	gamma-glutamyl hydrolase	0,309	2,48E-04
				DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase non-catalytic subunit	0,308	2,50E-04
				ASPHD2	aspartate beta-hydroxylase domain containing 2	0,308	2,53E-04
				C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	0,307	2,58E-04
				TWSG1	twisted gastrulation BMP signaling modulator 1	0,307	2,58E-04
				PRSS23	serine protease 23	0,307	2,63E-04
				CSTF2	cleavage stimulation factor subunit 2	0,307	2,64E-04
				RANBP1	RAN binding protein 1	0,306	2,70E-04
				ASIC2	acid sensing ion channel subunit 2	0,305	2,74E-04
				C17orf79	coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator	0,305	2,75E-04
				PRKCE	protein kinase C epsilon	0,305	2,76E-04
				ATRNL1	atractin like 1	0,305	2,82E-04
				DCAF12	DDB1 and CUL4 associated factor 12	0,305	2,83E-04
				DHFR	dihydrofolate reductase	0,304	2,85E-04
				HIST1H4H	H4 clustered histone 8	0,304	2,86E-04
				LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	0,304	2,88E-04

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
				PSMC3	proteasome 26S subunit, ATPase 3	0,304	2,88E-04
				CPE	carboxypeptidase E	0,304	2,92E-04
				SLC27A6	solute carrier family 27 member 6	0,303	2,93E-04
				ESYT1	extended synaptotagmin 1	0,303	2,94E-04
				PXMP2	peroxisomal membrane protein 2	0,303	2,99E-04
				CCNA1	cyclin A1	0,302	3,02E-04
				ATP5O	ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP	0,302	3,06E-04
				RBMS3	RNA binding motif single stranded interacting protein 3	0,301	3,17E-04
				WWTR1	WW domain containing transcription regulator 1	0,300	3,23E-04
				SSBP3	single stranded DNA binding protein 3	0,300	3,24E-04
				NUP50	nucleoporin 50	0,300	3,25E-04
				KRT14	keratin 14	0,300	3,25E-04
				NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	0,300	3,25E-04
				NOTCH3	notch receptor 3	0,300	3,25E-04
				NREP	neuronal regeneration related protein	0,300	3,26E-04
				ZC3H18	zinc finger CCCH-type containing 18	0,300	3,26E-04

Se recogen los 501 genes significativamente afectados por incrementos en las concentraciones de estrona agrupados en función de su tendencia de expresión: los genes del grupo 1 (217 genes) son aquellos que aumentan su expresión y los del grupo 2 (284 genes) los que la disminuyen conforme las concentraciones de estrona aumentan.

Tabla Suplementaria 8. 9 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estradiol.

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
LOC619207	NA	0,397	1,12E-04	BCORL1	BCL6 corepressor like 1	0,489	5,88E-05
IFT27	intraflagellar transport 27	0,300	0,001	MST4	serine/threonine kinase 26	0,413	7,27E-05
				HYLS1	HYLS1 centriolar and ciliogenesis associated	0,398	1,08E-04
				ZNF668	zinc finger protein 668	0,385	1,52E-04
				PCDH17	protocadherin 17	0,454	1,54E-04
				LOC441601	NA	0,376	1,88E-04
				BEX4	brain expressed X-linked 4	0,391	0,001

Se recogen los 9 genes significativamente afectados por incrementos en las concentraciones de estradiol agrupados en función de su tendencia de expresión: los genes del grupo 1 (2 genes) son aquellos que aumentan su expresión y los del grupo 2 (7 genes) los que la disminuyen conforme las concentraciones de estradiol aumentan.

Tabla Suplementaria 9. 12 genes significativamente afectados por incrementos en los niveles de estrés a largo plazo (evaluado por las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo).

Grupo 1				Grupo 2			
Símbolo	Nombre	R ²	p-valor	Símbolo	Nombre	R ²	p-valor
TGIF1	TGFB induced factor homeobox 1	0,445	5,97E-05	WAS	WASP Actin Nucleation Promoting Factor	0,337	2,05E-04
TSG1	tumor Suppressor TSG1	0,354	1,30E-04	CORO1A	coronin 1A	0,315	3,71E-04
NBEAP1	neurobeachin pseudogene 1	0,353	1,32E-04	SAAL1	serum amyloid A like 1	0,358	0,001
CD99P1	CD99 molecule pseudogene 1	0,338	2,01E-04	SERPINE1	serpin family E member 1	0,341	0,001
SLC22A15	solute carrier family 22 member 15	0,319	3,31E-04	RPSA	Ribosomal Protein SA	0,308	0,002
INCA1	inhibitor of CDK, cyclin A1 interacting protein 1	0,341	0,001				
FAM225A	family with sequence similarity 225 member A	0,306	0,002				

Se recogen los 12 genes significativamente afectados por incrementos en el estrés a largo plazo agrupados en función de su tendencia de expresión: los genes del grupo 1 (7 genes) son aquellos que disminuyen su expresión y los del grupo 2 (5 genes) los que la aumentan conforme las puntuaciones del test STAI dimensión Rasgo aumentan.



APÉNDICE C: Producción científica

Publicaciones de la tesis doctoral:

Artículos científicos:

- Marti-Garcia, D., Devesa-Peiro, A., Labarta, E., Lopez-Nogueroles, M., Sebastian-Leon, P., Pellicer, N., Meseguer, M., Diaz-Gimeno, P. (2024) Corticosteroids, androgens, progestogens and estrogens in the endometrial microenvironment and their association with endometrial progression and function. *Reproductive Biomedicine Online*. 49(6):104377. doi: 10.1016/j.rbmo.2024.104377.

Comunicaciones en congresos:

- Marti-Garcia, D., Dolz, P., Sebastian-Leon, P., Vidal, C., Devesa-Peiro, A., Perez, E., Caracena, L., Meseguer, M., Durá-Ferrandis, E., Diaz-Gimeno, P. (2025) Increases in State-Trait Anxiety Inventory (STAI) Psychological Punctuations Disrupt Endometrial Gene Expression and Functions Critical for Embryo Implantation. *Presentado en la 72nd Scientific Meeting of the Society for Reproductive Investigation, 25-29/03/2025, Charlotte, North Carolina (USA)*. Comunicación en formato póster.

- Marti-Garcia, D., Dolz, P., Sebastian-Leon, P., Vidal, C., Devesa-Peiro, A., Perez, E., Caracena, L., Meseguer, M., Durá-Ferrandis, E., Diaz-Gimeno, P. (2025) Outlining the Molecular Mechanism Between the Intracrinology of Endometrial Estrone Levels and Stress. *Presentado en la 72nd Scientific Meeting of the Society for Reproductive Investigation, 25-29/03/2025, Charlotte, North Carolina (USA)*. Comunicación en formato póster.

- Marti-Garcia, D., Dolz, P., Sebastian-Leon, P., Devesa-Peiro, A., Vidal, C., Perez, E., Meseguer, M., Durá-Ferrandis, E., Diaz-Gimeno, P. (2024) State-Trait Anxiety Inventory (STAI) punctuations as a non-invasive method for evaluating endometrial prognosis associated with cortisol and estradiol endometrial levels in IVF patients. *Presentado en la 40th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE), 8-10/07/2024, Amsterdam (Netherlands)*. Comunicación en formato póster.

- Marti-Garcia, D., Dolz, P., Devesa-Peiro, A., Sebastian-Leon, P., Vidal, C., Lopez-Nogueroles, M., Perez, E., Meseguer, M., Durá-Ferrandis, E., Diaz-Gimeno, P. (2023) Endometrial cortisol and estradiol levels as indicators of pregnancy prognosis and their association with State-Trait Anxiety Inventory (STAI) psychological questionnaire

punctuations in IVF patients. *Presentado en la 39th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE), 25-28/06/2023, Copenhagen (Denmark).*
Comunicación en formato póster.

- Devesa-Peiro, A., Marti-Garcia, D., Labarta, E., Lopez-Nogueroles, M., Sebastian-Leon, P., Diaz-Gimeno, P. (2021) High Cortisol Levels in Endometrium Impair Receptivity while Increased Estrone Levels Could Favor Pregnancy. *Presentado en la 68th Annual Scientific Meeting of the Society for Reproductive Investigation, 6-9/07/2021, Boston (USA).*
Comunicación en formato póster.

Publicaciones de otros proyectos:

Artículos científicos:

- Marti-Garcia, D., Sebastian-Leon, P., Alamá, P., Perez-Rico, E. Caracena, L., Pellicer, A., Diaz-Gimeno, P. (2025) Hyperspectral Endometrial Signature: a less invasive biomarker for dating the endometrium at the same time of embryo transfer. *Submitted to Fertility and Sterility.*

- Marti-Garcia, D., Parraga-Leon, A., Perez-Rico, E., Salvaleda-Mateu, M., Garcia-Acero, P., Esteve-Moreno, R., Punzon-Jimenez, P., Sebastian-Leon, P., Sanz, F.J., Labarta, E., Diaz-Gimeno, P. (2025) Estrogens and progesterone regulated genes and the underlying molecular mechanisms involved in healthy human endometria: A systematic review. *Submitted to Human Reproduction Open.*

- Marti-Garcia, D., Martinez-Martinez, A., Sanz, F.J., Devesa-Peiro, A., Sebastian-Leon, P., del Aguila, N., Pellicer, A., Diaz-Gimeno, P. (2024) Age-related uterine changes and its association with poor reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 22(1):152. doi: 10.1186/s12958-024-01323-6.

- Sanchez-Reyes, J.M, Parraga-Leon, A., Sebastian-Leon, P., Vidal, C., Marti-Garcia, D., Spath, K., Sanchez-Ribas, I., Sanz, F.J., Pellicer, N., Remohi, J., Wells, D., Pellicer, A., Diaz-Gimeno, P. (2024) Stratifying IVF population endometria using a prognosis gradient independent of endometrial timing. *medRxiv* 2024.11.08.24316907; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.11.08.24316907>

- Diaz-Gimeno, P., Sebastian-Leon, P., Spath, K., Marti-Garcia, D., Sanchez-Reyes, J.M.,

Vidal, C., Devesa-Peiro, A., Sanchez-Ribas, I., Martinez-Martinez, A., Pellicer, N., Wells, D., Pellicer, A. (2024) Predicting risk of endometrial failure: a biomarker signature that identifies a novel disruption independent of endometrial timing in patients undergoing hormonal replacement cycles. *Fertility and Sterility*, 122(2):352-364. doi: 10.1016/j.fertnstert.2024.03.015.

- Parraga-Leon, A., Sebastian-Leon, P., Devesa-Peiro, A., Marti-Garcia, D., Pellicer, N., Remohi, J., Dominguez, F., Diaz-Gimeno, P. (2023) Deciphering a shared transcriptomic regulation and the relative contribution of each regulator type through endometrial gene expression signatures. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1):84. doi: 10.1186/s12958-023-01131-4.

Comunicaciones en congresos:

- Marti-Garcia, D., Alamá, P., Sebastian-Leon, P., Caracena, L., Pellicer, A., Diaz-Gimeno, P. (2024) Hyperspectral imaging as a potentially non-invasive method allowing discrimination of endometrial menstrual cycle phases and identification of the window of implantation in normo-ovulatory women. *Presentado en la American Society for Reproductive Medicine (ASRM) 2024 Scientific Congress & Expo, October 19-23, Denver, Colorado (USA)*. Comunicación en formato póster.

- Sebastian-Leon, P., Sanz, F.J., Marti-Garcia, D., Pellicer, A., Diaz-Gimeno, P. (2024) A retrospective analysis shows a high effect in reproductive outcomes as age increases associated to endometrial factor in IVF advanced maternal age (AMA) patients. *Presentado en la 40th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 8-10/07/2024, Amsterdam (Netherlands)*. Comunicación en formato póster.