

# UNIVERSIDAD DE GRANADA



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

**Departamento de Ginecología y Obstetricia**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

**TESIS DOCTORAL**

**EL USO DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS  
PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD DE LOS  
GAMETOS EN PACIENTES QUE SE  
SOMETEN A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN  
ASISTIDA.**

**María Isabel Galán Lázaro**

Dir. Dr. Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara  
Codir. Dra. Raquel N. Mendoza Tesarik

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María Isabel Galán Lázaro  
ISBN: 978-84-1117-670-5  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79674>



Agradecimientos:

Al Dr. Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara, por dirigir este trabajo, por su paciencia infinita y por hacer tan sencillo el trabajo a su lado.

A la Dra. Raquel Mendoza Tesarik, por codirigir este trabajo y por ser, primero, amiga y hermana.

A los Dres. Carmen Mendoza Oltras y Jan Tesarik, mis maestros.

A mis compañeros de MAR&Gen, parte fundamental de una aventura que dura dieciocho años.

A mi padre, mi maestro de Ciencias Naturales. Gracias, papá.

A mis hermanos y mis sobrinos, mi soporte, mis Pepito Grillo.

A mis hijos, mi ancla. No hay fronteras. No hay tesoros sin búsqueda.

Dedico este trabajo a mi madre, Maribel, maestra.

Porque todo tiene sentido gracias a ti.

Todo es por ti.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Estudio de la calidad ovocitaria .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Efecto del estrés oxidativo en la calidad de los gametos.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. El envejecimiento ovárico .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Mecanismos implicados en el envejecimiento ovárico.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1. Con base genética .....</b>	<b>12</b>
<b>a). Insuficiencia ovárica prematura por trastornos mendelianos .....</b>	<b>12</b>
<b>b). IOP debida a trastornos mendelianos implicados en otras patologías distintas del IOP no sindrómico.....</b>	<b>15</b>
<b>c). Mutaciones genéticas que afectan a la función mitocondrial .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.2. Vías de señalización celular.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5. Manejo clínico del envejecimiento ovárico .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5.1. Diagnóstico del envejecimiento ovárico.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5.2. Propuestas de tratamiento para el envejecimiento ovárico .....</b>	<b>21</b>
<b>i. Hormona de crecimiento.....</b>	<b>22</b>
<b>ii. Melatonina .....</b>	<b>23</b>
<b>iii. Inositol .....</b>	<b>24</b>
<b>iv. Otros antioxidantes .....</b>	<b>26</b>
<b>v. Terapia mitocondrial.....</b>	<b>27</b>
<b>vi. Protocolos de tratamiento personalizados.....</b>	<b>30</b>

1.6. Calidad espermática. Infertilidad y expectativas en laboratorio.....	31
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1. Hipótesis .....	33
2.2. Objetivos .....	34
2.2.1. Objetivo principal.....	34
2.2.2. Objetivos específicos .....	34
<b>III. TAREA 1 .....</b>	<b>36</b>
3.1. Metodología .....	36
3.1.1. Tratamiento de los ovocitos tras la punción folicular.....	36
3.1.2. Microinyección intracitoplasmática del espermatozoide .....	37
3.1.3. Marcadores de calidad en el cigoto.....	41
a) Pronúcleos .....	41
b) Corpúsculos polares.....	42
3.1.4. Marcadores de calidad en el embrión .....	43
3.2. Elección de un score con marcadores de calidad ovocitaria .....	47
i. Morfología de la zona pelúcida.....	48
ii. Morfología del espacio perivitelino .....	49
iii. Calidad citoplasmática .....	50
iv. Morfología del primer corpúsculo polar .....	51
v. Elasticidad de membrana plasmática .....	52
vi. Recepción del espermatozoide .....	53
vii. Formación el cono de inyección .....	54

<b>IV. TAREA 2</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1. Material y métodos</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.1. Diseño del estudio</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.2. Participantes</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1.3. Métodos</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1.4. Variables: marcadores de CO</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1.5. Análisis estadístico</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2. Resultados</b> .....	<b>60</b>
<b>V. TAREA 3</b> .....	<b>63</b>
<b>5.1. Objetivo</b> .....	<b>63</b>
<b>5.2. Diseño del estudio, participantes y su asignación a los grupos</b> .....	<b>63</b>
<b>5.3. Técnica de reproducción asistida</b> .....	<b>66</b>
<b>5.4. Protocolo de administración de GH</b> .....	<b>69</b>
<b>5.5. Evaluación de la calidad de ovocitos, cigotos y embriones</b> .....	<b>70</b>
<b>5.6. Análisis estadístico</b> .....	<b>71</b>
<b>5.7. Declaración de ética</b> .....	<b>72</b>
<b>5.8. Resultados</b> .....	<b>72</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>78</b>
<b>6.1. Tarea 1</b> .....	<b>78</b>
<b>6.2. Tarea 2</b> .....	<b>80</b>
<b>6.3. Tarea 3</b> .....	<b>85</b>
<b>6.4. Conclusiones</b> .....	<b>89</b>

<b>VII. MEJORA DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA: PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</b>	<b>90</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

La reproducción es un fenómeno inherente al ser vivo que requiere de la integridad anatómica y funcional de todas las estructuras encargadas de la formación y encuentro de los gametos. Por el contrario, la esterilidad es el término genérico con el que nos referimos a los problemas que merman la fertilidad humana y que, en sentido estricto, se considera como enfermedad.

La esterilidad puede ser de causa masculina, femenina o, más frecuentemente, mixta. En casi un 30% de los casos se encuentran dos o más causas de esterilidad, pero también en 15-30% no se encuentra ninguna causa de esterilidad (esterilidad sin causa aparente). La participación de cada factor implicado en la reproducción es variable, a veces por la dificultad en su diagnóstico.

Desde la perspectiva de la Biología, es inestimable su aportación en el estudio de la fertilidad humana y el de su implicación en los tratamientos para la esterilidad. De hecho, las técnicas de reproducción asistida (TRA) no podrían contemplarse sin la compenetración entre la Biología y la Medicina, siendo especialmente útil cuando se utilizan medidas diagnósticas o terapéuticas para el manejo de los gametos, ya sean ovocitos o espermatozoides.

## 1.1. ESTUDIO DE LA CALIDAD OVOCITARIA.

Un ovocito en Metafase II (MII) de buena calidad es el que presenta una serie de características bien definidas:

El ovocito maduro mide alrededor de 110-115  $\mu\text{m}$  de diámetro y está delimitado por una membrana plasmática, que rodea al citoplasma, orgánulos, núcleo y demás estructuras.

El citoplasma no debe presentar agrupaciones de orgánulos en el centro del ovocito, lo cual es una alteración frecuente que se observa en el microscopio óptico como una masa individual y oscura con excesivo contenido de gránulos, generalmente en la porción media del ovocito. (*Kahraman, S. et al. 2000; Meriano, J.S. et al. 2001; Van Blerkom, J. et al. 1992*). Así mismo se considera una alteración citoplasmática la vesicularización de la totalidad del citoplasma (*Meriano, J.S. et al. 2004; Van Blerkom, J. et al. 1992*), la agregación de retículo endoplasmático liso, un tipo de inclusión citoplasmática elíptica y del tamaño de un pronúcleo, resultado de una acumulación masiva de sáculos del retículo endoplasmático (*Otsuki, J. et al. 2004*), la excesiva presencia de vacuolas, inclusiones citoplasmáticas rodeadas de membrana y llenas de fluido (*Otsuki, J. et al. 2004; Van Blerkom, J. 1990*), y la presencia de inclusiones citoplasmáticas, consideradas pequeñas zonas de necrosis compuestas de lípidos y gránulos densos que pueden agruparse o quedarse dispersos (*Serhal, P.F. et al. 1997; Suzuki, K. y et al. 2004*).

Alrededor de la membrana plasmática encontramos la zona pelúcida, una gruesa capa extracelular de naturaleza glucoproteica de entre 15-20  $\mu\text{m}$ . Una zona pelúcida, de conformación normal, pasa por diversas apariencias y grosores

a lo largo de su desarrollo. Las anomalías más comunes son aquellas que transforman la zona pelúcida, con alteraciones de su forma circular y la formación de abultamientos y septos (Sauerbrun-Cutler, M.T. et al. 2015).

Entre la zona pelúcida y la membrana plasmática aparece un espacio denominado espacio perivitelino, que debe aparecer con un grosor homogéneo y libre de exudados. La presencia de granulación en el espacio perivitelino está relacionada con un deterioro de la zona pelúcida interna. Una gran cantidad puede suponer un descenso importante en la fecundidad (Veeck, L.L. 1999), aunque otros estudios no han confirmado esta afirmación.

La presencia de estos detritus puede ser signo de una “sobredosis” de las gonadotropinas utilizadas en las estimulaciones. Aunque su presencia no parece alterar la calidad embrionaria, fecundación, tasas de división o embarazo (Hassan-Ali, H. et al. 1998). Por tanto, este fenómeno podría estar relacionado con la maduración fisiológica del ovocito (Balaban, B. et al. 2006).

Así mismo, un espacio perivitelino aumentado, característica claramente visible y que se observa como un espacio muy dilatado entre el citoplasma y la zona pelúcida, es una característica asociada a una baja CO (Xia, P. 1997).

El conjunto formado por el ovocito, el espacio perivitelino y la zona pelúcida miden, aproximadamente, unas 150  $\mu\text{m}$  (Ver Figura 1). En el espacio perivitelino es donde se encuentra el primer corpúsculo polar, en el ovocito maduro.

La morfología del primer corpúsculo polar varía dependiendo de la duración del cultivo del ovocito in vitro antes de ser

fecundado (*Balaban, B. et al. 1998*). De hecho, se ha detectado una correlación positiva entre el porcentaje de fragmentación y el tiempo transcurrido en la denudación y la ICSI (*Ciotti, P.M. et al. 2004*); así como también un incremento de la fragmentación del corpúsculo polar a lo largo del tiempo (*Verlinsky, Y. et al. 2003*). Algunos autores han sugerido que la morfología del corpúsculo polar está relacionada con las tasas de embarazo e implantación (*Ebner, T. et al. 1999, 2000, 2002*).

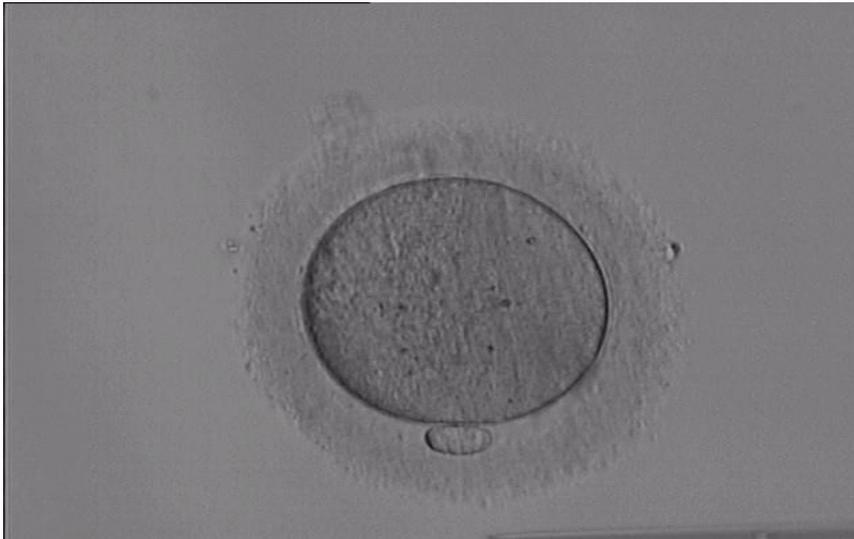
La variación del tamaño del corpúsculo polar también es determinante en la calidad, pues está relacionada con la posición del huso meiótico en la periferia del ovocito. Ovocitos con un corpúsculo polar anormalmente pequeño o grande tienen más probabilidad de albergar diferentes alteraciones cromosómicas en comparación con los ovocitos con el corpúsculo polar de un tamaño normal (*Veeck, L.L. 1999*).

Los ovocitos recuperados tras una punción folicular están rodeados de células de la granulosa que formaban parte del *Cumulus Oophorus*. Estas células son imprescindibles para la reanudación de la meiosis. La capa más interna constituye la corona radiata.

El cúmulo ovífero sirve igualmente como indicador del estado de maduración del ovocito, en base al grado de disgregación/compactación de sus células y de las células de la corona radiata. Un ovocito en Metafase II (MII) va a tener las células del cúmulo disgregadas y luteinizadas; mientras que en un ovocito en Metafase I (MI), las células del cúmulo van a estar más compactadas (*Veeck, L.L. 1988*).

El grado de madurez del complejo ha sido utilizado como indicador de la madurez ovocitaria, aunque la sincronía entre ambos es cuestionable, sobre todo en ciclos estimulados (*Hartshorne, G. et al. 1999; Tarin, J.J. et al. 1992*). Esto puede ser debido a diferencias de sensibilidad de las células del complejo cúmulo-corona y del núcleo ovocitario, a la maduración inducida (*Balaban, B. et al. 2006*).

Los ovocitos sufren un proceso de maduración en el que manifiestan unos cambios morfológicos a nivel citoplasmático y nuclear. La calidad ovocitaria (CO) depende en gran medida de la influencia genómica (ADN nuclear y mitocondrial), pero también del microambiente folicular preovulatorio (*Albertini et al., 2003*).

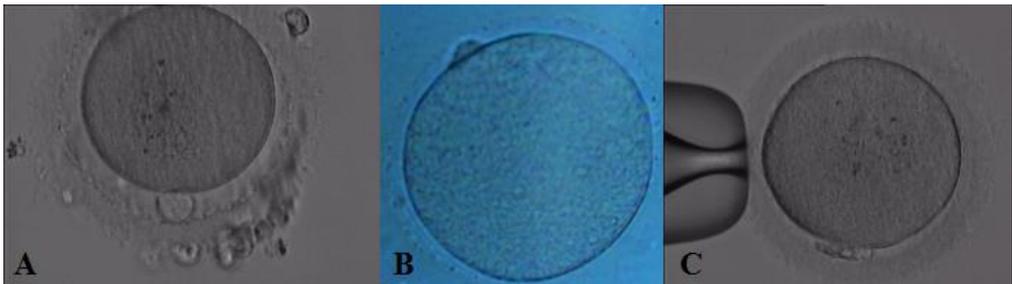


**Figura 1:** Ovocito maduro con una morfología normal. Imagen cedida por la clínica MAR&Gen .

Se han descrito diferentes anomalías morfológicas en los ovocitos que darían un pronóstico aproximado para las TRA:

- **Primer corpúsculo polar.**

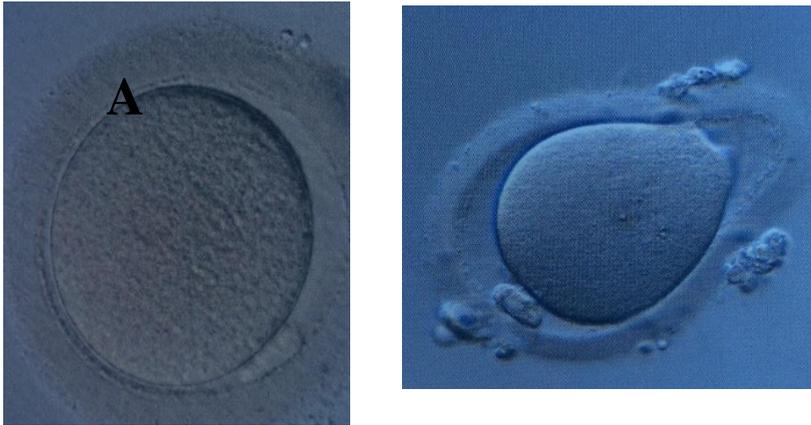
La presencia de un corpúsculo polar dismórfico, aunque no afecte a la tasa de fecundación, sí afecta al posterior desarrollo del embrión, así como a la tasa de embarazo (Xia, 1997; Ebner et al, 2003a; Ebner et al, 2003b). Sin embargo, no existe un acuerdo entre los autores respecto a que el tamaño irregular o la fragmentación del primer corpúsculo polar estén relacionados con la subsecuente calidad embrionaria, desarrollo a blastocisto, tasas de implantación o aneuploidías; para algunos autores no hay relación (Verlinsky et al., 2003; Ciotti et al., 2004; De Santis et al., 2005; Ten et al., 2007), mientras que para otros sí que parece influir (Ebner et al., 1999, 2000, 2002; Rienzi et al., 2008; Navarro et al., 2009; ASEBIR, 2015).(Figura 2).



**Figura 2: Diferentes dismorfismos del primer corpúsculo polar.** (A) Grande; (B) Pequeño; (C) Fragmentado. Imágenes A y C cedidas por la clínica MAR&gen. Imagen B procedente de ASEBIR, 2015.

- **Zona pelúcida.**

La existencia de una zona pelúcida gruesa, fina, irregular o con diferente densidad, afecta a la tasa de ovocitos que no continúan su desarrollo tras la ICSI (Ebner *et al.*, 2003a; Ebner *et al.*, 2003b). (Figura 3).



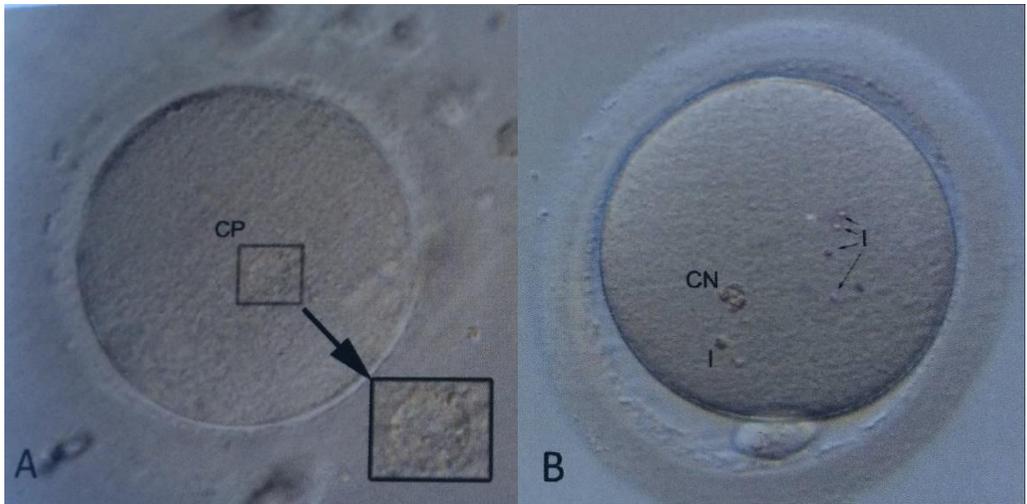
**Figura 3: (A) Zona pelúcida gruesa (>20µm). (B) Zona pelúcida no circular.** Imagen procedente de ASEBIR, 2015.

- **Citoplasma**

Se ha observado que la presencia de anomalías del citoplasma tales como granulaciones, inclusiones, cuerpos refringentes, vacuolas, etc., disminuyen la tasa de embarazo (Serhal *et al.*, 1997; Xia, 1997; Meriano *et al.*, 2001). Otros autores consideran que estas anomalías son un factor pronóstico pobre. No obstante, se ha demostrado una relación directa entre las

anomalías citoplasmáticas y el número de aneuploidías (Serhal et al., 1997; Kahraman et al., 2000).

Se llaman inclusiones citoplasmáticas aquellas partículas que se detectan a microscopía óptica, y aparecen como pequeños puntitos o manchas en el citoplasma, y que serían pequeñas áreas de necrosis, formadas por cuerpos refringentes de 10µm de diámetro aproximadamente (ASEBIR, 2015). Están compuestas de lípidos y gránulos densos que pueden agruparse o encontrarse aislados (Serhal et al., 1997; Suzuki et al., 2004; Otsuki et al., 2007; ASEBIR, 2015), y por cuerpos picnóticos no refringentes, que aparecen normalmente en forma de herradura (Meriano et al., 2001) (Figura 4).



**Figura 4: Presencia de inclusiones citoplasmáticas:** (A) Cuerpo picnótico (CP); (B) Cuerpo necrótico (CN) y cuerpos refringentes (I). Imagen procedente de ASEBIR, 2015.

La influencia de las inclusiones no está del todo clara. Para algunos autores, estas no parecen afectar a la fecundación, ni a la calidad embrionaria, ni a la implantación (*Balaban et al., 1998; ASEBIR, 2015*), mientras que para otros sí que afectan negativamente a la fecundación y al desarrollo de los embriones hasta la fase de blastocisto (*Otsuki et al., 2007; Rienzi et al., 2008; ASEBIR, 2015*).

## **1.2. EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CALIDAD DE LOS GAMETOS.**

En Biología se habla de estrés oxidativo (EO) cuando se produce un desbalance entre la producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y la acción correctora de los antioxidantes presentes en los tejidos y sus secreciones. Los ROS son productos generados en el metabolismo del oxígeno y se caracterizan por presentar un electrón libre que les imprime su poder reactivo. Por su potencia reactiva destacan el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Es obvio que el oxígeno, e incluso sus ROS en niveles bajos, son necesarios para las funciones celulares básicas, sin embargo, un exceso de producción de ROS supone un aumento en la disponibilidad de los radicales libres, lo que provoca una reacción en cadena dañando a todas las moléculas celulares, y, comoquiera que la presencia normal de ROS en la célula debe mantenerse durante brevísimos instantes de tiempo a dosis mínima, su efecto dañino tiene una relación directamente proporcional a la dosis y al tiempo de exposición.

En las últimas décadas, la Medicina Reproductiva ha avanzado de forma considerable en el conocimiento de la fisiología y la fisiopatología ovocitaria, descubriendo otras causas de esterilidad, entre ellas el estrés oxidativo.

Aunque se necesita precisar cómo se diagnostica y cuál es el límite que marca lo anómalo, se proyectan interesantes perspectivas de tratamiento en forma de antioxidantes que pudieran hacer reversibles algunas de estas alteraciones.

### **1.3. EL ENVEJECIMIENTO OVARICO.**

La importancia de los problemas relacionados con el envejecimiento ovárico ha aumentado progresivamente durante las últimas décadas desde que, cada vez más mujeres de todos los países desarrollados optan por posponer la maternidad a edades más avanzadas (*Dviri, M. et al. 2020*).

Esta tendencia se asocia con una tasa creciente de aneuploidías en los ovocitos, lo que provoca anomalías cromosómicas en los embriones, tanto de la concepción natural, como de la fertilización in vitro convencional (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (*Franasiak, J.M. et al. 2014; Demko, Z.P. et al. 2016*).

Por otro lado, no se ha encontrado asociación entre la edad masculina avanzada y las tasas de aneuploidía en embriones derivados de intentos de FIV / ICSI utilizando ovocitos de donantes jóvenes (*Dviri, M. et al. 2020*).

Conocer los mecanismos moleculares básicos del envejecimiento ovárico es absolutamente necesario para mejorar los protocolos de diagnóstico y tratamiento para mujeres

que acuden a nuestras consultas para someterse a una TRA. El envejecimiento ovárico tiene una base genética que condiciona su actividad a través de una gran cantidad de vías de señalización celular que controlan las funciones de los distintos tipos de células en el ovario. Hay varios factores que pueden influir en estas vías para reducir su eficiencia. El estrés oxidativo, a menudo relacionado con la disfunción mitocondrial, que conduce a la apoptosis de las células ováricas, puede estar detrás del origen de círculos viciosos en los que la causa principal retroalimenta otras anomalías, lo que da como resultado una disminución general de la actividad ovárica y de la calidad y cantidad de los ovocitos.

El correcto diagnóstico de los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento ovárico puede servir para diseñar estrategias de tratamiento que puedan ralentizar el deterioro ovárico y aumentar la cantidad y calidad de ovocitos recuperados en una TRA. Las opciones de tratamiento disponibles incluyen el uso de antioxidantes como la melatonina, la hormona de crecimiento o las terapias mitocondriales. Todos estos tratamientos deben considerarse en el contexto de la historia clínica de cada paciente, y se deben elaborar protocolos personalizados.

#### **1.4. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO OVARICO.**

Los mecanismos implicados en el envejecimiento ovárico no se comprenden completamente y parecen ser multifactoriales. Igualmente, se necesita un mejor conocimiento de los factores y

mecanismos que causan la insuficiencia ovárica prematura (IOP) o la disminución de la reserva ovárica para optimizar las pruebas de diagnóstico y ajustar las opciones de tratamiento a fin de reflejar la condición individual de cada mujer. En este capítulo pretendemos resumir los diferentes factores que causan el deterioro ovárico con el objetivo de elaborar un régimen de diagnóstico y tratamiento personalizado.

Tanto la edad de la menopausia como la de la IOP tienen un importante componente genético (*Rossetti, R. et al. 2017; Ma, L. et al. 2020*). Sin embargo, no todos los fallos ováricos son primarios y pueden influir diferentes patologías asociadas. Algunos de ellos parecen estar relacionados con vías de reparación del ADN defectuosas (*Turan, V, et al. 2020*).

#### **1.4.1. Con base genética.**

Los factores genéticos pueden influir en la función ovárica de forma selectiva o como parte de la sintomatología de trastornos implicados en otras patologías.

##### **a). Insuficiencia ovárica prematura.**

La IOP es la causa más frecuente de menopausia precoz, que ocurre en aproximadamente el 10% de las mujeres antes de los 45 años y en el 1-2% antes de los 40 años (*Rossetti, R. et al. 2017*), mientras que el deterioro de la fertilidad comienza alrededor de 20 años antes de la menopausia (*te Velde, E.R. et al. 2002*). Las anomalías estructurales del cromosoma X y las translocaciones del autosoma X pueden estar en el origen de algunos casos de IOP (*Turan, V, et al. 2020*). En cuanto a las perturbaciones de un solo gen, se ha sugerido que varios genes

están implicados en el IOP (Tabla 1), algunos de ellos ubicados en el cromosoma X y otros en los autosomas (Rossetti, R. et al. 2017; Qin, Y. et al. 2015; Wang, S. et al. 2020).

**Tabla 1:** Resumen de los principales genes nucleares con un papel conocido en la protección de los ovarios contra el envejecimiento.

<b>Gen</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>
<i>WNT4</i>	1p36.23-p35.1	Determinación y diferenciación del sexo femenino
<i>FIGLA</i>	2p13.3	Formación de zona pelúcida y folículo primordial
<i>NOBOX</i>	7q35	Transición de folículo primordial a folículo en crecimiento
<i>FOXO3</i>	6q21	Transición de folículo primordial a folículo en crecimiento
<i>PTEN</i>	10q23.3	Transición de folículo primordial a folículo en crecimiento
<i>FSHR</i>	2p21-p16	Fase hormona-dependiente del crecimiento folicular
<i>GPR3</i>	1p36.1-p35	Mantenimiento meiosis hasta el pico de LH
<i>MSH4</i>	1p31	Reparación de AND durante la recombinación genética
<i>MSH5</i>	6p21.3	DNA mismatch repair during meiotic recombination
<i>PGRMC</i> 1	Xq22-q24	Apoptosis de células del ovario
<i>FOXO1</i>	13q14.1	Función células de la granulosa
<i>DMC1</i>	22q13.1	Reparación de AND durante la division meiótica

1. Consulte el texto principal para conocer el nombre completo de cada gen. La revisión completa de los genes se puede encontrar en las referencias (Rossetti, R. et al. 2017; Qin, Y. et al. 2015; Wang, S. et al. 2020).

Sin embargo, se sospecha, más que se confirma, la implicación de algunos de estos genes. Aquellos con la evidencia más sólida para desempeñar un papel en el IOP se muestran en la Tabla 1.

Se sabe que la mayoría de estos genes están relacionados de alguna manera con la ovogénesis durante sus diferentes

fases, desde el período fetal a lo largo de la vida postnatal hasta las fases finales de maduración meiótica, y para regular eventos esenciales en la ovogénesis humana (Rossetti, R. et al. 2017; Ma, L. et al. 2020). Estos incluyen la determinación y diferenciación del sexo femenino (WNT4), la formación de folículos primordiales y la expresión coordinada de genes de zona pelúcida (FIGLA), la transición de folículos primordiales a folículos en crecimiento (NOBOX, FOXO3, PTEN), la fase hormono dependiente del folículo folicular, crecimiento (FSHR), el mantenimiento de la detención meiótica en los folículos antrales, hasta el aumento repentino de la hormona luteinizante (LH) (GPR3), la reparación del desajuste del ADN durante la recombinación meiótica (MSH4, MSH5), la apoptosis de las células ováricas (PGRMC1), la función de la granulosa (FOXO1), y la reparación del daño del ADN que surge de divisiones meióticas defectuosas (DMC1) (Rossetti, R. et al. 2017; Turan, V. et al. 2020; Qin, Y. et al. 2015; Wang, S. et al. 2020) (Tabla 1).

Sin embargo, la incidencia de anomalías en algunos de estos genes entre las mujeres que sufren de IOP es extremadamente baja, y las perturbaciones de otros genes están relacionadas principalmente con grupos étnicos específicos (Jin, M. et al. 2012).

Por tanto, sólo algunos de estos genes, como la premutación de FMR1, BMP15, GDF9 y FSHR, se han incorporado como biomarcadores de diagnóstico (Ma, L. et al. 2020; Fortuño, C. et al. 2014; Luoma, P. 2004). Se necesita más

investigación para utilizar más genes como herramientas de diagnóstico de rutina.

**b). IOP debida a trastornos mendelianos implicados en otras patologías distintas del IOP no sindrómico.**

Trastornos mendelianos pleiotrópicos, incluidos los frágiles, Síndrome X: retraso mental familiar 1 (FMR1); (Xq27.3), síndrome de blefarofimosis-ptosis-epicanto (BPES): caja de horquilla L2 (FOXL2) (3q23); galactosemia: galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT) (9p13); síndrome de glucoproteína deficiente en carbohidratos tipo 1: fosfomanomutasa 2 (PMM2) (16p13), puede manifestar IOP como parte de su espectro fenotípico (Rossetti, R. et al. 2017). Hay algunos otros trastornos mendelianos pleiotrópicos que se sospecha que causan IOP, pero aún falta una confirmación definitiva de esta asociación.

**c) Mutaciones genéticas que afectan la función mitocondrial.**

Los genes que gobiernan las funciones mitocondriales pueden estar ubicados en el núcleo o en las propias mitocondrias. En la actualidad se conocen muchos genes nucleares diferentes que afectan la función mitocondrial y, según la experiencia actual, la mayoría de las mutaciones genéticas que afectan la función mitocondrial son nucleares, como se revisa en (Rossetti, R. et al. 2017). Tanto las mitocondrias de los ovocitos como las de las células ováricas son importantes para la correcta foliculogénesis y maduración de los ovocitos (Pierce, S.B. et al. 2013; May-Panloup, P. et al. 2016). En cuanto al riesgo de deleciones del ADN mitocondrial, se ha observado que se

afecta por la estructura secundaria global del genoma mitocondrial (*Mikhailova, A.A. et al. 2020*).

#### **1.4.2. Vías de señalización celular.**

Las principales vías de señalización celular implicadas en la reducción fisiológica de la función ovárica (relacionada con la edad) y la IOP son las implicadas en la protección celular contra el estrés oxidativo.

Un estudio reciente que utilizó análisis transcriptómico de células individuales de ovarios de primates no humanos, jóvenes y ancianos, identificó siete tipos de células ováricas con firmas de expresión génica distintas, incluidos ovocitos y seis células somáticas diferentes, e identificó la alteración de la señalización antioxidante específica para ovocitos y células de la granulosa en estadio temprano (*Wang, S. et al. 2020*). El análisis adicional de los cambios transcripcionales asociados al envejecimiento específicos del tipo de célula reveló alteraciones relacionadas con la edad de la señalización antioxidante específicas de los ovocitos y las células de la granulosa en etapa temprana (*Wang, S. et al. 2020*).

Los autores han completado sus observaciones en primates no humanos con las de células de la granulosa humana obtenidas de muestras de líquido folicular aspiradas de pacientes sometidos a un intento de FIV.

De acuerdo con los resultados en monos, las células de la granulosa humana exhibieron una regulación a la baja, relacionada con la edad, de la transcripción de tres genes involucrados en las vías antioxidantes, IDH1, PRDX4 y

NDUFB10, y este fenómeno se acompañó de un aumento en las especies reactivas de oxígeno y apoptosis en células de la granulosa (Pizarro, B.M. et al. 2020), indicativas de daño oxidativo como factor crucial en el deterioro funcional ovárico.

Al igual que en los primates, previamente se observó en ratones un aumento del daño oxidativo relacionado con la edad y una disminución de la expresión de genes antioxidantes (Lim, J. et al. 2011).

Se informó que el daño oxidativo de las células de la granulosa de ratón afecta el suministro de ATP y a la expresión del gen mitocondrial, que son necesarios no solo para la proliferación sino también para la diferenciación de las células de la granulosa durante el desarrollo folicular (Pierce, S.B. et al. 2013).

Además, la inestabilidad del ADN mitocondrial (ADNmt) relacionada con el envejecimiento también conduce a una acumulación de mutaciones del ADNmt en el ovocito, lo que conduce al deterioro de la CO en términos de competencia y al riesgo de transmisión de anomalías mitocondriales a la descendencia (Lim, J. et al. 2011).

Como se mencionó anteriormente, el riesgo de daño del ADNmt también está condicionado por factores epigenéticos, especialmente la estructura secundaria global del genoma mitocondrial. Ciertos patrones de la estructura secundaria global de la cadena pesada monocatenaria humana de ADNmt hacen que la molécula de ADN sea más propensa a las deleciones que otras (Mikhailova, A.A. et al. 2020).

El daño mitocondrial conduce a la activación de vías apoptóticas en las células de la granulosa, lo que a su vez disminuye la expresión de aromatasa, necesaria para la transformación de los andrógenos en estrógenos, y que conduce a una mayor prevalencia de andrógenos sobre los estrógenos dentro de los folículos (*Pizarro, B.M. et al. 2020*).

Los andrógenos y los estrógenos presentes en el líquido folicular ejercen efectos no genómicos rápidos sobre la maduración de los ovocitos humanos, afectando la maduración citoplasmática de los ovocitos y el potencial de desarrollo posfertilización en lugar de la finalización de la meiosis (*Tesarik, J. et al. 1995*). Esto puede explicar por qué las alteraciones prematuras o relacionadas con la edad de las vías antioxidantes reducen la CO, incluso en los casos en los que el número de ovocitos maduros recuperados para la FIV no se ve afectado.

Nuevos datos sugieren que el IOP puede ser de origen poligénico y que existe una superposición entre los antecedentes genéticos de las reservas ováricas disminuidas y el IOP (*Tang, R. et al. 2020*).

La secuenciación del exoma completo y el análisis bioinformático pueden convertirse en una herramienta clínica útil para el diagnóstico etiológico y la predicción del riesgo para las mujeres afectadas en el futuro (*Tang, R. et al. 2020*).

Además, se debe considerar la hibridación genómica comparativa de matrices o paneles de secuenciación específicos de próxima generación para identificar deleciones / duplicaciones cromosómicas bajo resolución de cariotipo u otras variantes patogénicas en genes específicos asociados con IOP.

Esto es particularmente importante en pacientes con familiares de primer o segundo grado también afectados por IOP, mejorando su asesoramiento genético y reproductivo (*Barros, F. et al. 2020*).

Además, incluso con los mismos antecedentes genéticos, con el uso de enfoques biológicos de múltiples sistemas para comparar las etapas de desarrollo en el embrión humano temprano, con los datos de transcripción de una sola célula de blastómeros, se demostró que los blastómeros considerados totipotentes no eran transcripcionalmente equivalentes (*Smith, H.L. et al. 2019*).

## **1.5. MANEJO CLINICO DEL ENVEJECIMIENTO OVARICO.**

### **1.5.1. DIAGNÓSTICO DEL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.**

La edad de una mujer es el predictor básico del grado de envejecimiento ovárico. Sin embargo, el envejecimiento ovárico puede desarrollarse prematuramente y se necesitan métodos de diagnóstico específicos para detectar esta afección.

Hay dos tipos de manifestaciones del envejecimiento ovárico con respecto a la capacidad ovárica para producir ovocitos: una cuantitativa y otra cualitativa. Para detectar el primero, se utiliza una combinación de recuento de folículos antrales (RFA) determinada por ecografía vaginal al comienzo del ciclo menstrual, y la determinación de la concentración sérica de hormona antimulleriana (AMH), que se puede realizar en

cualquier momento durante se el ciclo menstrual (*Fleming, R. et al. 2015*).

Por el contrario, la CO no está necesariamente relacionada con el RFA y la AMH sérica. La descomposición prematura de la CO se relaciona principalmente con una producción de crecimiento baja para la hormona de crecimiento (GH) (*Yovich, J.L. et al. 2019*). Debido al patrón pulsátil de secreción de GH, se sugirió el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), que refleja el patrón de secreción de GH, pero con una pulsatilidad menos pronunciada, para identificar a pacientes jóvenes con un deterioro prematuro de la CO que podrían beneficiarse del tratamiento con GH durante la estimulación ovárica (*Tesarik, J, et al. 2020*).

Los datos presentados muestran que la edad 'GH / IGF-1' puede ser más de 20 años mayor que la edad cronológica en algunas mujeres jóvenes, y fue este grupo de pacientes el que pareció tener más probabilidades de beneficiarse de la administración de GH durante la estimulación ovárica, aunque los autores sugirieron que se necesitaban estudios prospectivos más amplios para confirmar esta suposición (*Tesarik, J, et al. 2020*).

Hay solo unas pocas pistas para detectar el envejecimiento ovárico prematuro además de los criterios anteriores y se justifica más investigación para detectar más marcadores moleculares que podrían guiar al médico a proponer el mejor régimen de tratamiento.

## 1.5.2. PROPUESTAS DE TRATAMIENTO PARA EL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.

Dado que el estrés oxidativo es el principal factor implicado en el envejecimiento ovárico, se puede suponer que los agentes que reducen el daño oxidativo representan la elección de primera línea. Estos agentes pueden ser antioxidantes directos o moléculas que afectan las vías de señalización celular involucradas en la defensa antioxidante de las células ováricas (Tabla 2). Algunas moléculas combinan las dos actividades anteriores.

**Tabla 2:** Agentes que se pueden utilizar para tratar las consecuencias del envejecimiento ovárico fisiológico o prematuro.

Agente	Admón.	Mec. de acción	Ref.
GH	Subcut	Activa vías de señalización cel. contra EO.	[1]
		Posible activación de reparación de ADN	
Melatonina	Oral	Antioxidante directo Antioxidante indirecto (modulador de vía de señalización) Anti-inflamatorio Immunomodulador	[2]
Coenz Q10	Oral	Antioxidante directo	[3]
Vitamina C	Oral	Antioxidante directo	[4]
Vitamina E	Oral	Antioxidante directo	[4]
Ácido Fol.	Oral	Antioxidante directo	[4]

1. (Tesarik, J. et al. 2005; Li, X.L. et al. 2017; Hart, R.J. et al. 2019; Tesarik, J. et al. 2020; Gong, Y. et al. 2020; Mancini, A. et al. 2018; Tesarik, J. et al. 2020).
2. (Tesarik, J. et al. 2018; Mosher, A.A. et al. 2019; Tesarik, J. 2020; Tamira, H. et al. 2020).
3. (Budani, M.C. et al. 2020; Gat, I. et al. 2016; Xu, Y. et al. 2018).
4. (Agarwal, A. et al. 2014).

### **i. Hormona del Crecimiento.**

La administración de GH durante la estimulación ovárica fue el primer tratamiento que demostró ser beneficioso en mujeres mayores. Un ensayo controlado aleatorio, realizado por nuestro equipo en 100 mujeres de más de 40 años sometidas a TRA y aleatorizadas entre un grupo de tratamiento con GH y un grupo de placebo, mostró tasas de partos y nacidos vivos significativamente más altas en el brazo de GH en comparación con el brazo de placebo (*Tesarik, J. et al. 2005*).

Estudios posteriores confirmaron estos hallazgos y extendieron el uso del tratamiento con GH también a mujeres más jóvenes con IOP (*Li, X.L. et al. 2017; Hart, R.J. et al. 2019; Tesarik, J. et al. 2020; Gong, Y. et al. 2020; Mancini, A. et al. 2018*).

Este efecto de la GH se debe, al menos en parte, al alivio del estrés oxidativo en el ovario, un efecto descrito previamente en algunos otros órganos (*Tesarik, J. et al. 2020*). Aunque no es un antioxidante directo, la GH interviene en las vías de señalización celular implicadas en la defensa celular contra el estrés oxidativo (*Hart, R.J. et al. 2019*), y la deficiencia de GH adulta provoca una reactividad inadecuada de las células frente a la producción de radicales (*Tesarik, J. et al. 2020*).

Esto puede explicar por qué la deficiencia de GH contribuye al deterioro de los ovarios, incluso en los casos en que se debe principalmente a otras causas.

Por lo tanto, la GH se puede utilizar como tratamiento adyuvante durante la estimulación en mujeres con deterioro ovárico relacionado con la edad y con IOP. Esta conclusión se extrajo de los resultados de 13 artículos de un tema de

investigación especial sobre el papel de la GH en la reproducción, editado por Jan Tesarik, John Yovich e Yves Menezo, y publicado en *Frontiers in Endocrinology*, revisado en Tesarik et al. en 2021.

## **ii. Melatonina.**

La melatonina es el ejemplo por excelencia de una molécula que actúa como antioxidante directo y modulador sistemas protectores de las células frente al estrés oxidativo.

Introducido por primera vez en la medicina reproductiva para tratar la infertilidad causada por endometriosis y adenomiosis (Tesarik, J. et al. 2018; Mosher, A.A. et al. 2019), ha demostrado su utilidad en muchas más indicaciones, incluida la protección frente al COVID-19 (Tesarik, J. 2020).

Desde entonces, han surgido nuevos datos que muestran las posibilidades de la melatonina para prevenir el envejecimiento ovárico (Tamura, H. et al. 2020).

Aunque el mecanismo subyacente al efecto antienvjecimiento de la melatonina en el ovario humano aún debe explicarse completamente, la administración de melatonina, que carece de efectos secundarios graves y proporciona beneficios adicionales a los pacientes tratados con ella (Tamura, H. et al. 2020), está claramente indicada en mujeres con reducción de la reserva folicular o IOP.

### iii. Inositol.

El inositol es un compuesto orgánico de la familia de las vitaminas B, tan necesario para el embarazo como el ácido fólico (también una vitamina B) o la vitamina D. Forma parte de las membranas celulares y presenta varias formas (isómeros) entre las que destacamos dos, el ***mio-inositol*** y el ***D-chiro-inositol***, por su importancia en la salud general y reproductiva (*Genazzani, A.D. 2016*).

El inositol se encuentra en la naturaleza en las semillas del trigo, los cítricos, las nueces y las legumbres, pero quienes pertenecemos a la especie humana tenemos escasas enzimas en nuestro aparato digestivo que nos permitan su absorción, por lo que es metabolizado en su mayoría por las bacterias de la microbiota intestinal. Tampoco se ha considerado como un nutriente esencial en nuestra dieta, pero su consumo implica ciertos beneficios para la salud, destacando su capacidad hipoglucémica al retrasar la digestión y absorción del almidón, por lo que también disminuye las necesidades de insulina, pero también su potencial para disminuir los lípidos o sus propiedades antioxidantes, mediante las cuales previene del desarrollo de cánceres y de daños celulares (*Facchinetti, F. et al. 2015*).

Todas estas acciones son beneficiosas para cualquier mujer en edad fértil, máxime si padece de algún trastorno que impida la ovulación, como el síndrome del ovario poliquístico, un cuadro médico responsable de la dificultad para el embarazo de muchas mujeres, donde frecuentemente coexiste la esterilidad con los problemas metabólicos. De hecho, se ha sugerido que

un déficit de inositol podría estar detrás de algunos de estos procesos que dificultan el embarazo (*Mendoza, N. et al. 2017*).

La relación del inositol con el metabolismo de los hidratos de carbono está muy estudiada y disponemos de datos que muestran que su déficit, principalmente del isómero *D-chiro-inositol*, es un posible factor de riesgo para el aumento de la resistencia a la insulina, un proceso muy relacionado con la diabetes, el síndrome del ovario poliquístico y la esterilidad (*Heimark, D. et al. 2014; Naderpoor, N. et al. 2015*).

El otro isómero, el *mio-inositol* es la forma más abundante en el organismo y es precursor del *D-chiro-inositol*, en una acción en la que también interviene la insulina. Se ha observado que esta conversión es diferente en cada órgano, y que en el ovario se empeora cuando existen esas situaciones de mayor resistencia a la insulina como es el síndrome del ovario poliquístico (*Facchinetti, F. et al. 2015*).

Para las mujeres con trastornos de la ovulación que se someten a los tratamientos de fertilidad se han usado estrategias que mejoran la sensibilidad a la insulina, como la dieta o el consumo de metformina, un fármaco antidiabético. Sin embargo, en demasiadas ocasiones la dieta es insuficiente y el uso de metformina se acompaña de efectos secundarios que obligan a su retirada. Por consiguiente, buscando alternativas menos molestas que la metformina se ha estudiado el uso del inositol en cualquiera de sus formas con los que se han conseguido mejoras hormonales y metabólicas. Si bien, la administración conjunta de los dos isómeros ha resultado ser

más eficaz que la acción separada de cada uno de ellos (*Piomboni, P. et al. 2014*).

A nivel reproductivo, se han detectado los dos isómeros del inositol en los folículos ováricos. Incluso intervienen en las etapas biológicas que permiten la meiosis. El papel beneficioso del inositol a nivel de la fertilidad femenina señala, aparte de la mayor sensibilidad a la insulina, también a su función antioxidante (*Chiu, T.T. et al. 2002*).

#### **iv. Otros antioxidantes.**

Dado que el envejecimiento ovárico se debe principalmente al estrés oxidativo, superpuesto a la estructura genética existente, se puede suponer que cualquier agente antioxidante mejora los resultados de la FIV en mujeres mayores y en mujeres jóvenes que padecen IOP (*Budani, M.C. et al. 2020; Gat, I. et al. 2016; Xu, Y. et al. 2018*).

Desafortunadamente, solo hay unos pocos estudios clínicos que pueden respaldar de manera concluyente este razonamiento. La coenzima Q10 (CoQ10) es el antioxidante que acumula más evidencia a favor de su uso en el tratamiento de mujeres con reservas ováricas disminuidas (*Budani, M.C. et al. 2020; Gat, I. et al. 2016*), conclusión corroborada por un reciente ensayo de control aleatorizado (*Xu, Y. et al. 2018*). Sin embargo, aunque potencialmente menos eficaz, cualquier agente antioxidante, como las vitaminas C y E, y el ácido fólico, puede ser de ayuda (*Agarwal, A. et al. 2014*).

## **v. Terapia mitocondrial.**

El tema de la salud mitocondrial ha sido ampliamente debatido con respecto al ovocito (*Babayez, E. et al. 2015*). No obstante, los datos obtenidos de un estudio en un modelo animal (ratón) indican que las mitocondrias de las células de la granulosa no son menos importantes para la correcta maduración del ovocito que las del propio ovocito (*Hoque, S.A.M. et al. 2019*).

Los agentes antioxidantes, como la melatonina, la coenzima Q10 o las vitaminas C y E pueden mejorar esta condición. Esto puede explicar por qué el pretratamiento con antioxidantes (coenzima Q10) mejora la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas y la calidad del embrión en mujeres jóvenes de bajo pronóstico (*Budani, M.C. et al. 2020; Gat, I. et al. 2016; Xu, Y. et al. 2018*).

Por otro lado, la acumulación de mutaciones / deleciones del ADNm en el ovocito, además de poner en peligro el potencial de desarrollo del ovocito, también puede comprometer la salud de la descendencia (*Tachibana, M. et al. 2018*).

Se requiere una función mitocondrial óptima para la maduración de los ovocitos, la fertilización y el desarrollo embrionario. La mejora de la función mitocondrial ya sea mediante el uso de moléculas pequeñas o procedimientos que involucran transferencias mitocondriales, podría conducir a mejores resultados de fertilidad. Además, los procedimientos de reemplazo mitocondrial podrían abrir una nueva página en el tratamiento de enfermedades mitocondriales.

La transferencia mitocondrial de un ovocito de un donante sano al ovocito del paciente es una posible solución, practicada

desde finales de la década de 1990 (*Tachibana, M. et al. 2018; Cohen, J. et al. 1997; Cohen, J. et al. 1998; Tesarik, J. et al. 2000*), pero posteriormente prohibida en la mayoría de los países.

Esta técnica se puede realizar de dos formas diferentes: primero, mediante la inyección de una pequeña cantidad de citoplasma de ovocitos de un donante en los ovocitos del paciente (*Tachibana, M. et al. 2018; Cohen, J. et al. 1997; Cohen, J. et al. 1998*); en segundo lugar, transfiriendo los cromosomas en metafase, asociados con el huso meiótico, de los ovocitos del paciente a los ovocitos de donantes previamente enucleados (*Tesarik, J. et al. 2000*).

Curiosamente, aunque la última técnica da como resultado una proporción mucho mayor de mitocondrias "sanas" en los ovocitos reconstruidos en comparación con la primera, la eficacia de ambas técnicas parece similar; más del 40% de los nacidos vivos en mujeres jóvenes con fallos de implantación previos, y se obtuvieron varias decenas de nacimientos con ambos (*Tesarik, J. et al. 2019; Marder, H.E. et al. 2019*).

Debe destacarse, sin embargo, que la indicación original de ambas técnicas se centró en el fracaso recurrente del desarrollo e implantación del embrión en mujeres jóvenes, más que en la evitación de la transmisión de enfermedades mitocondriales. Además de las mitocondrias, el ooplasma también contiene otras moléculas importantes para el desarrollo que pueden ser deficientes en los ovocitos de los pacientes. Uno de ellos es el ARNm materno almacenado, que es crucial para guiar el desarrollo del embrión humano hasta la etapa de 4 a 8 células, cuando se pueden detectar los primeros signos de

expresión del genoma embrionario (*Tesarik, J. et al. 1986; Braude, P. et al. 1988; Tesarik, J. et al. 1988; Tesarik, J. 1989*).

Sin embargo, el ARNm materno almacenado también participa en el control de etapas relativamente tardías del desarrollo preimplantacional humano, después de la activación de la expresión génica embrionaria, cuando las dos fuentes de ARNm actúan juntas para regular la diferenciación de los dos primeros tejidos embrionarios, la masa celular interna y el trofotodermo (*Tesarik, J. 1989*).

Si bien todavía está prohibida en los Estados Unidos, la técnica de la terapia de reemplazo mitocondrial, que utiliza una transferencia del complejo huso-cromosoma de los ovocitos del paciente a los ovocitos enucleados de un donante, fue utilizada con éxito por un equipo de una clínica estadounidense en México, donde no hay ninguna restricción legal con respecto a esta técnica, para evitar la transmisión de madre a hijo de una enfermedad mitocondrial hereditaria, el síndrome de Leigh (*Zhang, J. et al. 2017*). Los autores eligieron la técnica de transferencia nuclear descrita anteriormente, con ligeras modificaciones (*Tesarik, J. 2017*), en lugar de la inyección ooplasmática.

Esta técnica se utiliza actualmente, en países en los que es legalmente posible, para su indicación inicial: el fracaso repetido del desarrollo embrionario en parejas jóvenes con parejas masculinas con espermatozoides normales, sin limitaciones estrictas a las anomalías del ADN mitocondrial detectadas previamente.

## **vi. Protocolos de tratamiento personalizados.**

Para poder decidir entre las diferentes opciones de tratamiento, la elección de la terapia a utilizar debe hacerse en base a un diagnóstico completo tanto de la parte masculina como femenina de cada pareja. La elección del tratamiento no debe basarse simplemente en la causa principal de infertilidad, sino que también deben tener en cuenta todos los posibles factores secundarios contribuyentes.

Las directrices básicas para este enfoque se publicaron con el nombre de “CARE” (mejora de la reproducción asistida personalizada) (Tesarik, J. 2017). En los pacientes con mal pronóstico, este enfoque individualizado parece ser más eficaz en comparación con los protocolos estándar (Mendoza-Tesarik, R. et al. 2018). Se necesitan más estudios prospectivos para confirmar definitivamente esta tesis.

Todos los datos disponibles llevan a la conclusión de que el envejecimiento ovárico se debe principalmente al estrés oxidativo. Si bien los factores externos que conducen al estrés oxidativo pueden ser similares, el daño producido depende de la mujer debido a los mecanismos de defensa programados genéticamente. Las deficiencias de estos mecanismos pueden ser causadas por mutaciones / deleciones de genes tanto nucleares como mitocondriales. Independientemente del trasfondo genético (que es imposible de resolver en la actualidad), las manifestaciones clínicas pueden aliviarse con tratamientos que utilicen antioxidantes directos (p. ej., Vitaminas C y E, coenzima Q10), agentes que afectan la respuesta celular

frente al estrés oxidativo (p. ej., hormona del crecimiento), o aquellos que combinan ambas actividades (p, ej. melatonina).

Si ocurren mutaciones del ADN mitocondrial en el ovocito, la terapia de reemplazo mitocondrial puede resolver el problema. Independientemente de los resultados de las pruebas diagnósticas individuales realizadas, se necesita una visión sintética para proponer un plan terapéutico personalizado para cada mujer que consulta por esterilidad.

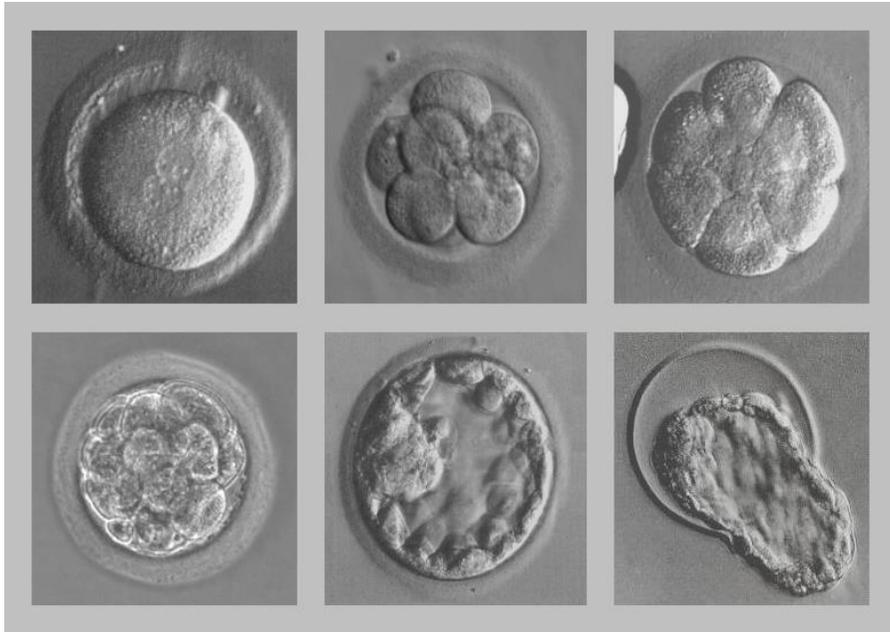
### **1.6. Calidad espermática y TRA. Infertilidad y expectativas en laboratorio.**

El seminograma es la prueba principal dentro del estudio del factor masculino, que ofrece información básica sobre el volumen seminal, la concentración, la movilidad y la morfología espermática (*Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al., 2010*).

En cuanto al estudio de los factores de infertilidad masculina, existe un consenso generalizado que reconoce la disminución de la fertilidad en pacientes con graves alteraciones en la morfología espermática. Dicha anomalía morfológica suele relacionarse con una elevada fragmentación en el ADN espermático, en forma de roturas de cadena dobles o simples. El tipo de fragmentación de cadena será el que determinará el grado o modo de interferencia en el proceso natural de reproducción.

En Biología se habla de estrés oxidativo (EO) cuando se produce un desbalance entre la producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y la

acción correctora de los antioxidantes presentes en los tejidos y sus secreciones. Los ROS son productos generados en el metabolismo del oxígeno y se caracterizan por presentar un electrón libre que les imprime su poder reactivo. Es obvio que el oxígeno, e incluso sus ROS en niveles bajos, son necesarios para las funciones celulares básicas, sin embargo, un exceso de producción de ROS supone un aumento en la disponibilidad de los radicales libres, lo que provoca una reacción en cadena dañando a todas las moléculas celulares, y comoquiera que la presencia normal de ROS en la célula debe mantenerse durante brevísimos instantes de tiempo a dosis mínima, su efecto dañino tiene una relación directamente proporcional a la dosis y al tiempo de exposición.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **2.1. HIPÓTESIS.**

Debido al incremento en la demanda de las TRA y a la posibilidad de que la CO y la calidad espermática (CE) pudiera estar afectada por razones diferentes de la edad, planteamos un proyecto en el que postulamos que el uso de tratamientos suplementarios a la estimulación ovárica convencional (por su capacidad antioxidante o de mejoría de algunos parámetros biológicos relacionados con la calidad de los gametos) puede ofrecer beneficios en las mujeres y parejas que se van a someter a aquellas.

## **2.2. OBJETIVOS.**

### **2.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.**

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral será valorar si el uso de suplementos dietéticos, por su capacidad antioxidante o de mejora de algunos parámetros biológicos, pueda incrementar la CO de las mujeres sometidas a TRA.

### **2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Describir los marcadores biológicos ovocitarios que puedan emplearse en la clínica reproductiva para el diagnóstico de la CO y el pronóstico de las mujeres que se sometan a TRA.
- Analizar si el uso de suplementos dietéticos en mujeres menores de 35 años que se someten a TRA por disfunción ovulatoria, mejora la CO.
- Analizar si el uso de suplementos dietéticos o fármacos con potencial de mejora de la CO en mujeres mayores de 35 años mejora la CO y/o las variables de eficacia de las TRA.
- Analizar si existen parámetros de calidad espermática que pudieran mejorarse con el empleo de suplementos

dietéticos o fármacos semejantes a los descritos en mujeres para varones menores de 50 años cuyas parejas femeninas se sometan a TRA.

## **TAREAS**

1. Definir un score de CO a partir de marcadores biológicos objetivos para su uso como diagnóstico en una mujer que se someta a ICSI.
2. Analizar la mejora de la CO con el score definido en la Tarea 1 en mujeres jóvenes (menores de 35 años) que se hayan sometido a ICSI por una disfunción ovulatoria y hayan tomado antioxidantes durante su estimulación ovárica.
3. Analizar la mejora de la CO con el score definido en la Tarea 1 en mujeres mayores de 35 años que hayan usado la hormona del crecimiento durante su estimulación ovárica.

### **III. TAREA 1.**

Definir un score de CO a partir de marcadores biológicos objetivos para su uso como diagnóstico en una mujer que se someta a ICSI.

#### **3.1. METODOLOGÍA.**

##### **3.1.1. TRATAMIENTO DE LOS OVOCITOS TRAS LA PUNCIÓN FOLICULAR.**

Todos los medios de cultivo utilizados en el proceso son previamente equilibrados a 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>.

El equipamiento utilizado en el quirófano consta de una bomba de vacío (*Labotect 4014*) y un set de punción (*Labotect ref. 13438*) unido a la bomba. El procedimiento de punción folicular se realiza con ayuda de control ecográfico, con un equipo ecográfico (*Hitachi EUB 525*) porque la intervención se realiza vía vaginal y guiada por el mismo.

El equipamiento utilizado en laboratorio para la recogida de los ovocitos está formado por una cabina de flujo laminar con superficie calefactada. (*K- System, L-126D*) y una lupa binocular (*Olympus SZX12*). Todo el proceso se realiza sobre una superficie calefactada a 37°C.

Una vez terminado el chequeo del contenido de todo el líquido folicular, los ovocitos obtenidos se mantienen en medio de equilibrio G-IVF (*Vitrolife*) , durante 2 ó 3 horas, hasta el momento de la denudación.

La denudación es el proceso de retirada del *cúmulus oophorus* y la corona radiata (Tesarik, J., Mendoza, C., 2002) con ayuda de hialuronidasa (*Hyase, Vitrolife*) diluida en medio específico (*Gmops, Vitrolife*). Este proceso es delicado y se puede dar la fractura de la zona pelúcida (FZP), lo que nos indica una baja CO (Mendoza, C., Testart, J., 1986).

### **3.1.2. MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE.**

La técnica utilizada de fecundación en el laboratorio es la microinyección intracitoplasmática del espermatozoide o ICSI. Es la TRA en la que se introduce un espermatozoide mediante una técnica de micromanipulación en cada uno de los ovocitos de la paciente.

Para la captura de los espermatozoides con mejor morfología y movilidad, se utiliza el método *Swim Up*, que permite una rápida capacitación de los mejores espermatozoides. Las muestras de esperma patológicas requieren de otro tipo de técnicas de selección, pero dichas muestras no están incluidas en este estudio.

La técnica ICSI se realiza, en nuestro laboratorio, con un microscopio invertido (*Olympus IX71*), al que se acopla un microinyector (*Narishige, IM-9B*). El microscopio tiene una pletina calefactada (*Tokai, MATS-U55R30*) que debe permanecer a 37°C durante todo el proceso. Las microagujas usadas son *ICSI MIC 35-30 para la microinyección del*

*espermatozoide*, y *HOLDING SMP- SM – 30*, (*Humagen*) para la sujeción del ovocito.

Como soporte de la técnica se utiliza la parte superior de una placa de Petri de 35 x 10 mm. En ella, se realizan varias microgotas: dos de Polyvinylpirrolidona (PVP), que es una sustancia viscosa que mantiene a los espermatozoides en un estado menos móvil; la primera es donde se coloca una pequeña parte de la muestra de espermatozoides capacitados y la segunda se utilizará para “pisar” el flagelo del espermatozoide y montarlo en la micropipeta para la inyección. Las demás gotas serán de Gmops (Vitrolife), un medio específico para el mantenimiento de los ovocitos durante la inyección. La cantidad de gotas variará dependiendo del número de ovocitos a inyectar.

El conjunto de todas las gotas se cubre con aceite mineral hasta el borde de la placa, para evitar la desecación, y los subsecuentes cambios en la concentración de los medios. Una vez se ha preparado la placa dispondremos en ella los ovocitos y la colocaremos en el inyector.

Las agujas se colocan en el mismo plano donde están los ovocitos y los espermatozoides.

El espermatozoide se aspira en la pipeta de inyección y se pasa a una gota de PVP donde se deposita y se le “pisa” el flagelo con la misma aguja con un movimiento rápido hacia los lados.

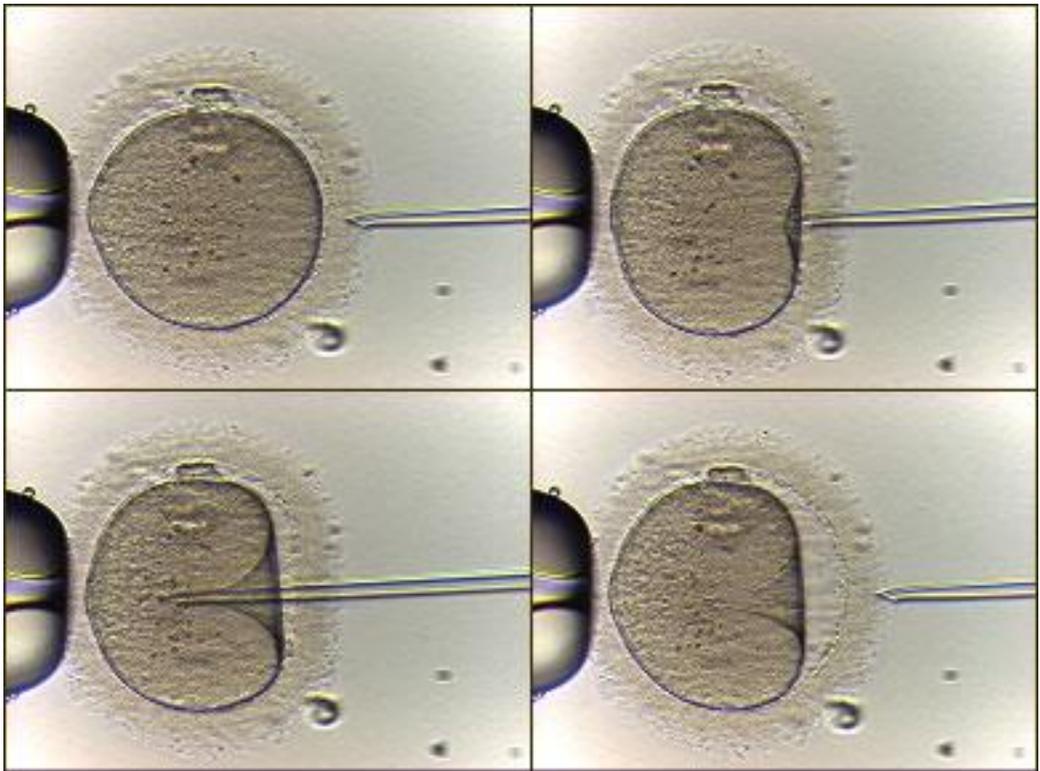
Esta técnica de inmovilización del espermatozoide es imprescindible para que haya una eficiente fertilización del óvulo. La inmovilización provoca en el espermatozoide la rotura de su membrana plasmática y liberación de factores que

inducen en el ovocito las oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , es decir, la activación de este. Por otro lado, la inmovilización provoca también una activación citosólica en el espermatozoide que permite la exposición del centriolo proximal al ovocito para la consecuente distribución cromosómica en el embrión.

En la gota del ovocito se introduce la pipeta de HOLDING que sujeta el ovocito siempre en una posición particular para no interceder con el huso acromático.

Las agujas entonces deben quedar enfrentadas perfectamente en línea recta y con la misma inclinación. En la aguja de inyección se lleva el espermatozoide hasta la misma punta y entonces se presiona sobre la zona pelúcida hasta que puede superarla e introducir la punta en el citoplasma. Para poder romper la membrana plasmática se absorbe con la pipeta de inyección hasta notar que la membrana se relaja y entonces se introduce la aguja hasta más o menos la mitad del citoplasma donde se irá expulsando el citoplasma, cuando se va acercando la cabeza del espermatozoide se introducirá la aguja hasta casi tocar el extremo distal del ovocito y es ahí donde se alojará (Fig. 6). Se retira la micro aguja lentamente para no arrastrar el espermatozoide y se inicia de nuevo todo el proceso con los demás ovocitos.

Una fase importante en las TRA es la elección de los ovocitos de buena calidad con el fin de poder obtener embriones con un óptimo desarrollo.



**Figura 6.** Microinyección intracitoplasmática del espermatozoide.

Generalmente, los ovocitos son evaluados, por toda la comunidad científica, basándose en 6 parámetros como son, tamaño y forma del ovocito (*Ebner T y col, 2008; Balakier H y col, 2002*), calidad del citoplasma (*Esfandiari N y col, 2006; Wallbutton S y Kasraie J 2010; Fancsovits P y col. 2011*), estructura del espacio perivitelino (*Farhi J y col. 2002*), zona pelúcida (*Balakier H y col. 2012*) y morfología del corpúsculo polar (*Ciotti PM y col. 2004; Navarro PA y col. 2009*).

Nosotros hemos seleccionado los siete parámetros anteriormente descritos. Al incluir nuevos parámetros, hemos observado diferencias significativas que nos han dado a

entender que la posterior elección de los embriones para la transferencia uterina era más idónea para poder obtener un embarazo evolutivo. (*Raquel Mendoza Tesarik 2019*)

### **3.1.3. MARCADORES DE CALIDAD EN EL CIGOTO (Día 1 de desarrollo embrionario).**

Para establecer la calidad de los cigotos es importante tener en cuenta los pronúcleos y los corpúsculos polares.

#### **a). Pronúcleos.**

Los pronúcleos deben ser dos, estar situados juntos y ser del mismo tamaño.

Los cigotos se evaluaron de acuerdo a los criterios basados en el número y la distribución de los nucléolos en el pronúcleos (*Tesarik, J., Greco, E., 1999*). (Figura. 7)

El patrón pronuclear de los cigotos se consideró el más importante para elegir los embriones más viables, de acuerdo con los datos publicados previamente (*Tesarik, J., Greco, E., 1999; Tesarik, J., y col. 2000; Balaban, B. y col., 2004*).

Este patrón determina los rangos normales de la variabilidad de los pronúcleos, definido por el análisis de los cigotos que han sido transferidos y que tienen un 100% de implantación (Modelo 0). El bloqueo de los embriones procedentes del modelo 0 es tan sólo del 8.5% en comparación con el 31.6%, 21.9%, 30%, 20.5%, y 24.1 % de los modelos del 1 al 5 respectivamente. La tasa de embarazo clínico en el modelo 0 llega al 50% en relación con el 9% en los demás ciclos donde se ha transferido embriones de los otros modelos.

El sistema de puntuación se ha simplificado agrupando a todos los patrones anormales (Tesarik, J., y col., 2000), por lo que todos los embriones fueron asignados a uno de los dos grupos: embriones de buena morfología y embriones de mala morfología.

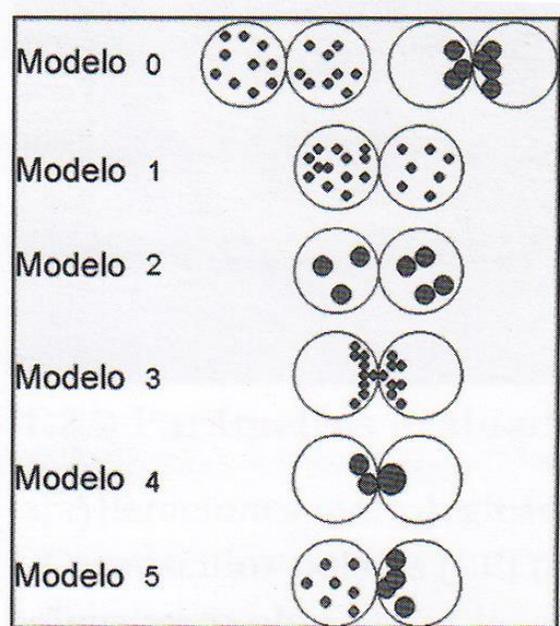


Figura 7: Modelo de gradación pronuclear propuesto de Tesarik J y Greco E 1999.

### b). Corpúsculos polares.

Los corpúsculos polares deben ser dos, pueden estar juntos o separados y no deben estar fragmentados (Figura 8).



**Figura 8.** Embrión en día 1 de desarrollo con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

#### **3.2.4. MARCADORES DE CALIDAD DE LOS EMBRIONES (Día 3 del desarrollo embrionario).**

Los embriones han sido catalogados según el esquema de gradación de ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción) (Figura 9).

ESQUEMA DE GRADACIÓN EMBRIONARIA EN D+2 Y D+3

ASEBIR

GRADO	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría	Multinucleación	Otros
<b>A</b>	D+2	4	≤ 10%	EE <sup>(1)</sup>	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
<b>B</b>	D+2	5	> 10-25%	4 → 7 céls. NO EE D+3	NO	≤50% céls. con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
<b>C</b>	D+2	2, 3, 6	> 25-35%	2, 4, 8 céls. NO EE	1cél. bn D+2, o bien 1-2 céls. bn D+3 y el resto como Grado A <sup>(2)</sup>	≤50% céls. con vacuolas grandes
	D+3	2, 3 → 6 - 9				
		6 → 8 - 10 6, 11, 12				
<b>D</b>	D+2	3 (NO EE), >6	> 35%	3 céls. NO EE en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% céls. con vacuolas pequeñas o grave alteración citoplásmica <sup>(3)</sup>
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				

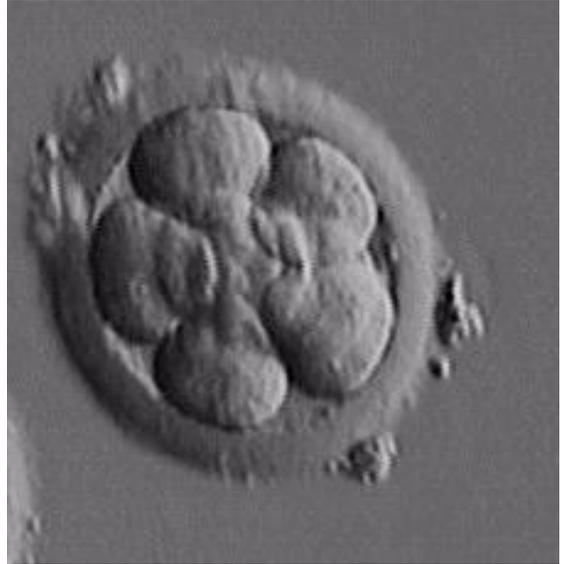
Embriones Excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h; >50% de Fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D

Figura 9. Esquema de gradación embrionaria de D+2 y D+3 ASEBIR.

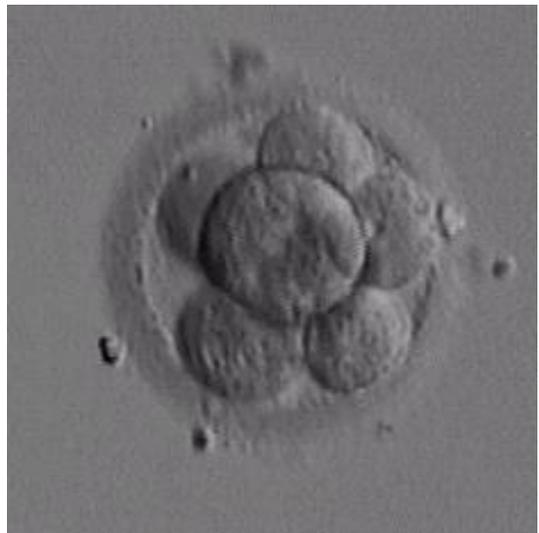
- (1) "EE" = Estadio-específico.
- (2) "bn" = Binucleada. Excepción a la regla: cualquier multinucleación conlleva clasificar como D.
- (3) Por ejemplo: anillo citoplasmático muy evidente en D+3. Las vacuolas no se valoran. Excepción a la regla de no penalización por combinación de varias características negativas.

## **Ejemplos de embriones en D+3 clasificados con ASEBIR:**

- **Embrión Tipo A**



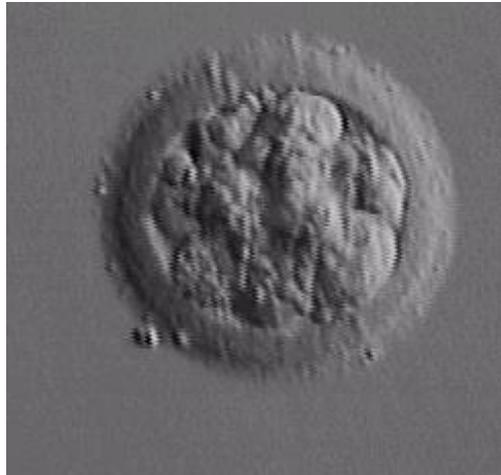
- **Embrión Tipo B**



- **Embrión Tipo C**

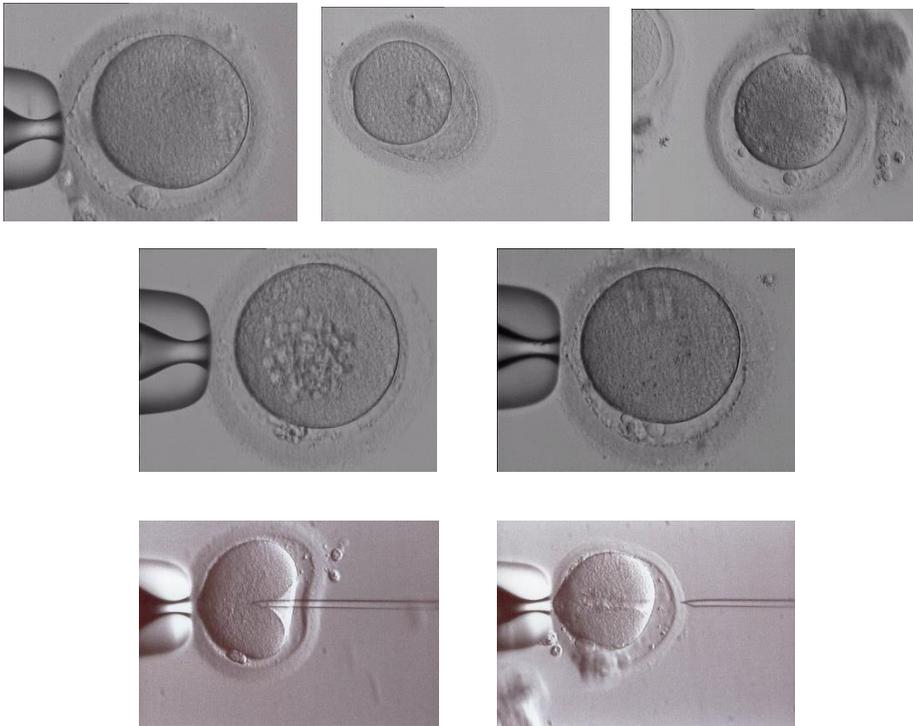


- **Embrión Tipo D**



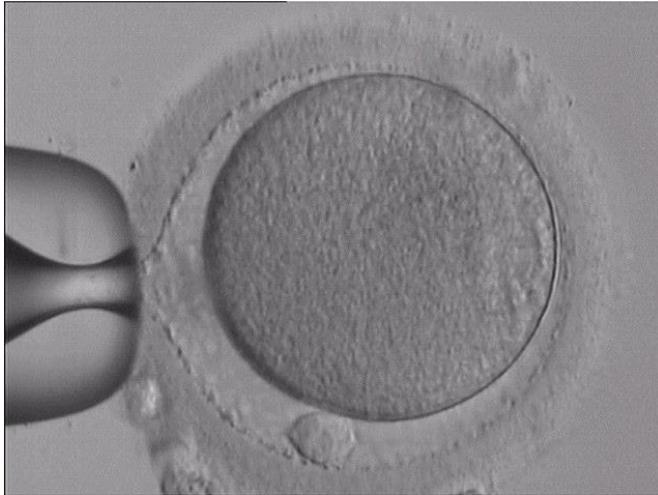
### **3.2. ELECCIÓN DE UN SCORE CON MARCADORES DE CALIDAD OVOCITARIA.**

Entre los diferentes marcadores morfológicos de calidad ovocitaria descritos en la literatura especializada, y analizada en trabajos preliminares propios, hemos seleccionado 7, cuyo valor objetivo de 1 a 10 nos ha ofrecido datos de concordancia con la calidad de los embriones resultantes (*Raquel Mendoza-Tesarik, 2019*):



### **i. Morfología de la zona pelúcida.**

Este marcador se ha valorado según su tamaño, densidad y presencia de septos.



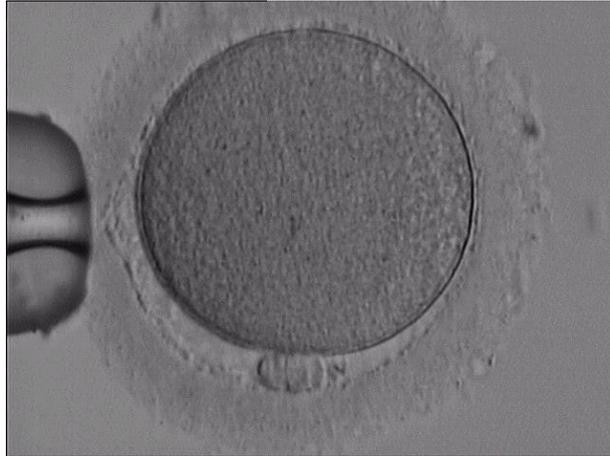
**Figura 10:** Ovocito con zona pelúcida con tamaño y densidad normal



**Figura 11:** Ovocito con zona pelúcida con presencia de septo.

## **ii. Morfología del espacio perivitelino.**

En esta variable se ha tenido en cuenta un tamaño adecuado y sin inclusiones.



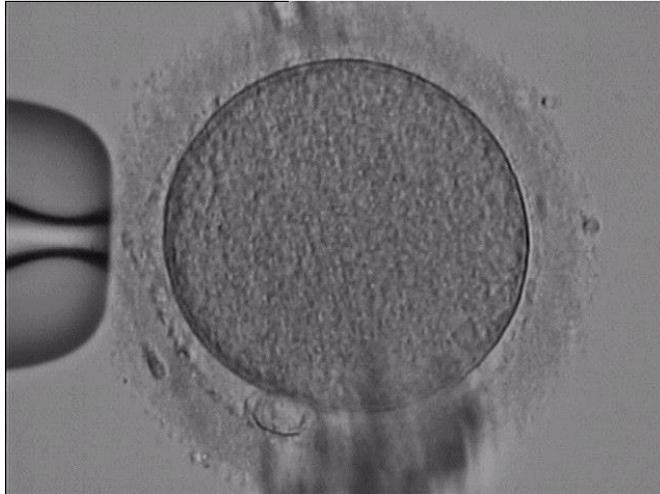
**Figura 12:** Ovocito con espacio perivitelino normal.



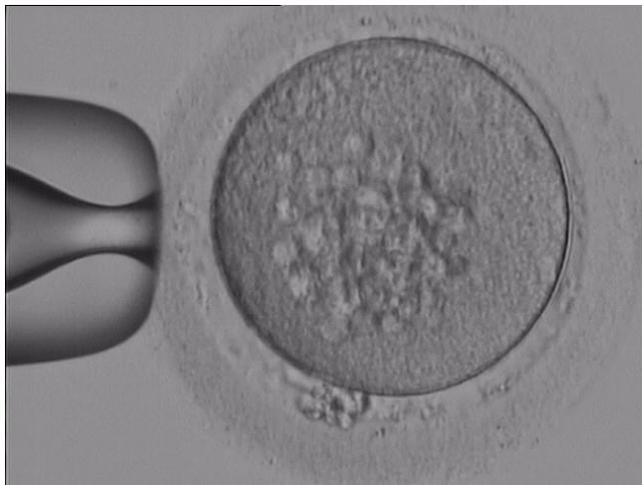
**Figura 13:** Ovocito con espacio perivitelino ampliado.

### iii. Calidad del citoplasma.

Esta variable se ha puntuado teniendo en cuenta la homogeneidad granular del mismo, así como la presencia de inclusiones, vacuolas o retículo endoplasmático.



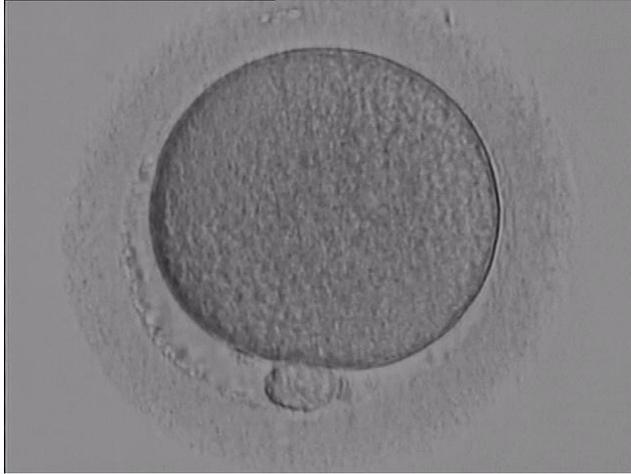
**Figura 14:** Ovocito con citoplasma normal.



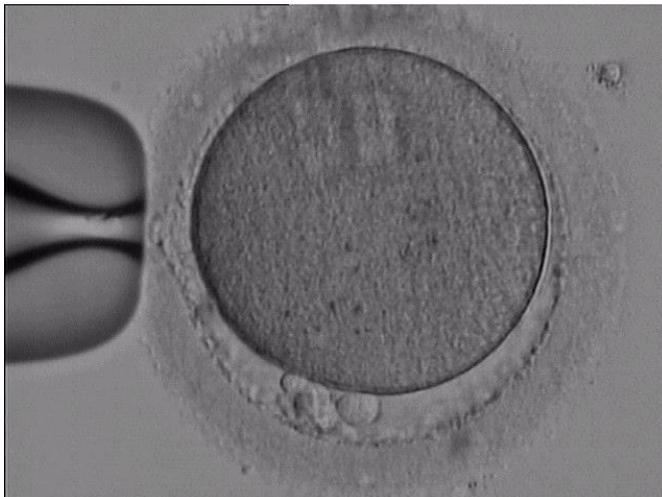
**Figura 15:** Ovocito con citoplasma con inclusiones.

#### **iv. Morfología del Primer Corpúsculo polar.**

Se ha valorado según tamaño y forma adecuados y sin fragmentación.



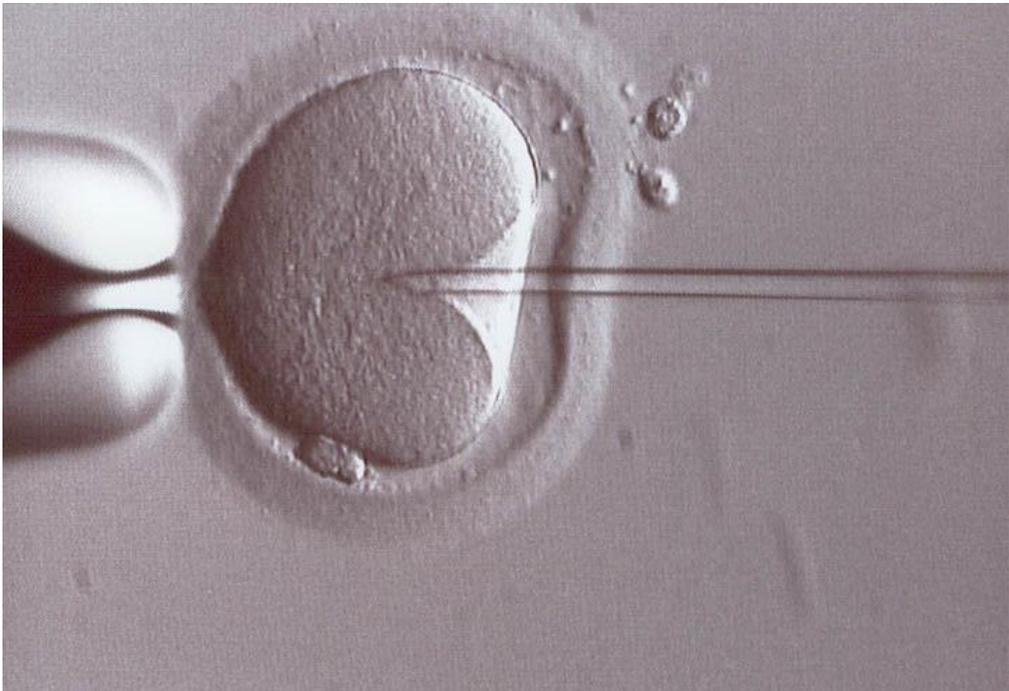
**Figura 16:** Ovocito con único y bien formado primer corpúsculo polar.



**Figura 17:** Ovocito con primer corpúsculo polar fragmentado.

## v. Elasticidad de la Membrana plasmática.

En este marcador se ha observado la elasticidad que presenta el ovocito en el momento de introducir la aguja de microinyección durante la ICSI. La membrana plasmática no debe presentar demasiada resistencia a la rotura por aspiración, ni ser demasiado frágil a la misma.



**Figura 18:** ICSI, acercamiento del espermatozoide al extremo de la aguja y comienzo de la maniobra de rotura de la membrana plasmática.

## **vi. Recepción del espermatozoide.**

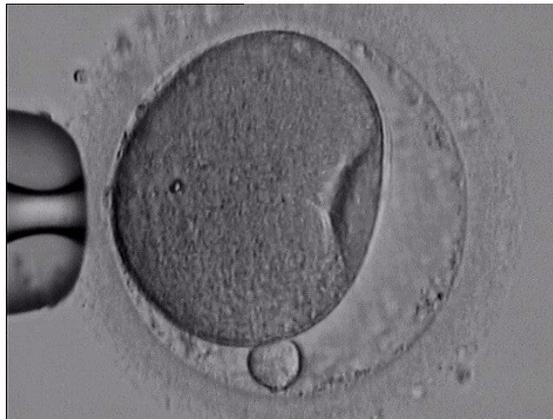
Dicho marcador se ha valorado dependiendo de la capacidad de inclusión del espermatozoide en el momento en que es depositado en el interior del citoplasma mediante la microinyección del mismo. Se da el valor más alto a aquel en el que el desplazamiento del espermatozoide es menor al dejarlo en el interior del citoplasma ovocitario.



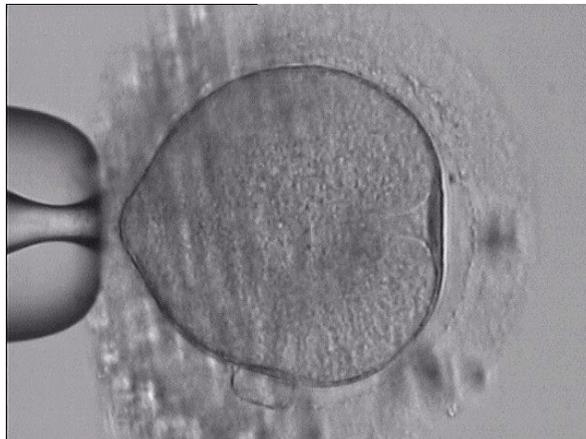
**Figura 19:** ICSI, retirada de la aguja, se observa la recepción del espermatozoide en la zona opuesta a la de inyección.

### vii. Formación del Cono de inyección.

Esta variable se refiere a la impresión que queda en el ovocito después de retirar la aguja de microinyección y se da el valor más alto al que presenta un cono mayor, lo que se traduce en una mayor resistencia.



**Figura 20:** Ovocito con cono de inyección correcto.



**Figura 21:** Ovocito con pequeño cono de inyección.

Cada uno de estos marcadores ha sido valorado por dos embriólogas simultáneamente, formadas en el mismo laboratorio, con amplia experiencia en técnica ICSI, usando el mismo equipo en condiciones óptimas de laboratorio.

Se ha otorgado una puntuación del 1 a 10 a cada marcador de CO microinyectado, siendo 10 el óptimo, y 1 el de peor calidad.

Finalmente, y con el propósito de crear un score de CO para uso interno, hemos contemplado la catalogación previa (*Mendora-Tesarik, R., 2019*), de la que se han seleccionado los siete parámetros descritos en esta Tarea y de cuya puntuación entre 1 y 10 se han establecido cuatro categorías de CO (A, B, C y D) que recopilamos en la tabla 3.

**Tabla 3:** Clasificación baremada de ovocitos en grupos de calidad. Clínica MARGen.

Grupos	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Rango de puntuación	70-65	64-35	34-6	5-0

## **IV. TAREA 2.**

Análisis de la mejora de la CO con el score definido en la Tarea 1 en mujeres jóvenes (menores de 35 años) sometidas a ICSI por disfunción ovulatoria y que hayan tomado antioxidantes durante la estimulación ovárica.

### **4.1. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **4.1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Este estudio parte de un ensayo clínico aleatorizado (ECA) doble ciego realizado en nuestra clínica entre febrero de 2016 y abril de 2017 y realizado de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y Buenas Prácticas Clínicas.

Las voluntarias fueron asignadas aleatoriamente a uno de los dos grupos de acuerdo con un esquema de aleatorización generado por un programa de computadora. Para mantener el cegamiento, el investigador recibió un número de asignación de tratamiento para cada sujeto (*Mendoza N, et al., 2019*).

#### **4.1.2. PARTICIPANTES.**

1. **Criterios de inclusión:** mujeres con PCOS de 18 a 40 años según los criterios de Rotterdam (*Rotterdam ESHRE/ASRM*) con un índice de masa corporal (IMC) <30 que se han sometido a una ICSI.

2. **Criterios de exclusión:** Contraindicaciones para ICSI, hiperplasia suprarrenal, hiperprolactinemia, enfermedad tiroidea, endometriosis severa, respondedores deficientes y factor masculino severo.

#### **4.1.3. MÉTODOS.**

En la clínica MAR&Gen de Granada se distribuyeron de forma aleatoria 11 mujeres con PCOS para recibir cápsulas de gelatina blanda oral de 550 mg MYO + 150 mg DCI dos veces al día (3.6: 1) (grupo de concentración alta de DCI) o 550 mg MYO + 13,8 mg DCI dos veces al día (40: 1) (grupo de baja concentración DCI) durante 12 semanas hasta el día de la punción ovárica. No se permitió la ingesta de otras vitaminas o antioxidantes durante el estudio, con la excepción de ácido fólico (400 mg / día), que se proporcionó a todos los pacientes.

La estimulación de la ovulación se inició de acuerdo con un protocolo específico utilizando la dosis de 150 unidades de FSH durante cinco días. Después de esta estimulación inicial, cada paciente fue tratada individualmente de acuerdo con su respuesta, y el ciclo se controló utilizando un antagonista de GnRH de acuerdo con los criterios previamente publicados (*Mendoza N, et al., 2019*).

El Comité de Ética e Investigación Clínica de Granada aprobó el estudio. Los pacientes firmaron una declaración de consentimiento informándoles sobre el procedimiento y los posibles riesgos del estudio.

#### 4.1.4. VARIABLES: MARCADORES DE CO.

Se utilizaron los siete marcadores morfológicos específicos de CO recogidos en La Tarea 1. La evaluación de la CO se realizó el mismo día en que se realizó la punción ovárica y cada variable fue evaluada de cero a 10 simultáneamente por dos embriólogas, recibiendo cada variable la puntuación media de las dos observadoras.

1. Zona pelúcida: se asigna la puntuación más alta al tamaño y densidad normales.
2. Espacio perivitelino: la puntuación más alta se asigna a los ovocitos de tamaño y morfología adecuados.
3. Primer cuerpo polar: tamaño normal, superficie lisa y falta de fragmentación obtendrán el puntaje más alto.
4. Membrana plasmática: esta variable evalúa la elasticidad de la membrana durante la inyección, dando el puntaje más alto si tiene una elasticidad óptima al insertar la aguja de inyección.
5. Citoplasma: el más alto se asignará al citoplasma sin anomalías (granulaciones citoplasmáticas granulares localizadas en el centro, inclusiones, agregados del retículo endoplásmico liso, vacuolas).
6. Recepción de espermatozoides: esta variable evalúa el desplazamiento de los espermatozoides tan pronto como se ha depositado en el ovocito y después de que se ha extraído la aguja de microinyección, dando la puntuación

máxima si el espermatozoide no se ha alejado del sitio de deposición.

7. Cono de inyección: esta variable evalúa la impresión que queda en el ovocito cuando se retira la aguja de microinyección, dando el puntaje más alto cuando la impresión sea más visible.

#### **4.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Las diferencias entre los marcadores de CO en función de la dosis de DCI se estudiaron mediante la prueba t de Student para cada marcador, considerando cada ovocito como un elemento muestral. Para observar gráficamente las diferencias en los valores de cada marcador de CO, obtuvimos un diagrama de caja y bigotes para cada marcador.

La influencia de otras variables en la CO se investigó utilizando un modelo lineal de efectos mixtos, ya que los ovocitos no eran independientes cuando se midieron en la misma hembra. Además, los supuestos de normalidad y multicolinealidad se probaron antes del análisis para cada uno de los modelos lineales. La normalidad se probó mediante el análisis gráfico de las gráficas Q-Q y la multicolinealidad de las variables independientes se evaluó mediante el factor de inflación de la varianza (VIF). Para todos los modelos, se estimaron coeficientes pseudo-R<sup>2</sup> para marginal (varianza explicada por efectos fijos) y condicional (varianza explicada para el modelo completo). Se estimaron los coeficientes beta de los efectos fijos, así como su valor Chi-cuadrado, sus grados de libertad y el valor p.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando R 3.5.1. (*R Core Team, 2018*) y los paquetes *ca* (*Fox, J., Weisberg, S., 2011*), *me4* (*Bates, D., et al. 2015*) y *MuMIn* (*Barton, K., 2018*).

## 4.2. RESULTADOS.

Al inicio del estudio, no se encontraron diferencias entre los dos grupos. Al final del ciclo de ICSI, se analizaron 172 ovocitos de las 11 pacientes. Los niveles totales de testosterona, glucosa e insulina, HOMA-IR fueron similares en ambos grupos (Tabla 4), el número de ovocitos MII y el porcentaje de embriones de buena calidad también fueron similares en ambos grupos. El embarazo se logró en cuatro pacientes en el grupo de alta DCI y en una paciente en el grupo de baja DCI ( $p = 0,036$ ).

**Tabla 4:** Variance Inflation Factors for each variable in each linear model according to dependent variable.

OQ marker	Treatment	Age	BMI	Dif. HOMA-IR	Dif. Testosterone
Zona Pellucida	1,3652	1,7236	1,6346	1,4865	1,1886
Perivitelline space	1,3475	1,7855	1,6632	1,5559	1,1980
Polar Body 1	1,3479	1,7840	1,6629	1,5543	1,1978
Plasma membrane	1,3480	1,7838	1,6628	1,5541	1,1977
Cytoplasma	1,3633	1,7298	1,6389	1,4939	1,1893
Sperm reception	1,3551	1,7583	1,6544	1,5263	1,1933
Injection cone	1,3467	1,7883	1,6638	1,5589	1,1986
Total score	1,3476	1,7852	1,6631	1,5556	1,1980

**Tabla 5:** means of oocyte quality indicators by groups.

Confidence intervals at 95% and p-value of the Student's T test to a tail.

OQ marker	MEAN ( $\mu$ )		$\mu_1 - \mu_2$ 95% CI	P-value
	high-DCI group	low-DCI group		
Zona Pellucida	8,151	8,687	[-1,243; 0,17]	0,9321457
Perivitelline space	<b>7,767</b>	7,051	[-0,123; 1,557]	0,04698271*
Polar Body 1	7,767	7,798	[-0,71; 0,648]	0,5357245
Plasma membrane	<b>7,932</b>	6,990	[0,28; 1,603]	0,00280059**
Cytoplasm	<b>8,521</b>	6,061	[1,885; 3,035]	6,57E-15***
Sperm reception	7,795	7,646	[-0,412; 0,708]	0,3011837
Injection cone	<b>7,014</b>	6,121	[0,12; 1,665]	0,01194921*
Total score	54,959	50,465	[1,125; 7,864]	0,00464522**

Para los marcadores CO, la dosis alta de DCI dio mejores resultados en el citoplasma, el espacio perivitelino, la membrana plasmática y la inyección del cono. Mientras que, en el caso de la zona pelúcida, la recepción de espermatozoides y PB1 fueron similares entre las dosis de DCI (Figura 22 y Tabla 5). Los resultados del análisis del factor de inflación por la varianza (Tabla 6) muestran la ausencia de colinealidades relevantes.

Según un análisis multivariado utilizando modelos lineales de efectos mixtos, las dosis altas de DCI tienen una influencia positiva sobre el "citoplasma" ( $\beta = 1.631$ , Valor  $\chi^2 = 7.42$  d.f. = 1,  $p = 0.00645$ ).

Independientemente de la dosis de DCI, la disminución de HOMA-IR mejora el "citoplasma" ( $\beta = -1.832$ ,  $\chi^2$  Valor = 12.283, gl = 1;  $p = 0.0005$ ) y la "zona pelúcida" ( $\beta = -1.377$ ,  $\chi^2$  Valor = 6.571, gl = 1;  $p = 0.0104$ ). La disminución de testosterona mejora la "membrana plasmática" ( $\beta = 0.511$ ,  $\chi^2$  Value = 5.126,

df = 1, p = 0.0151) y la "recepción de esperma" ( $\beta = 0.376$ ,  $\chi^2$  Value = 5.763, df = 1, p = 0,0164).

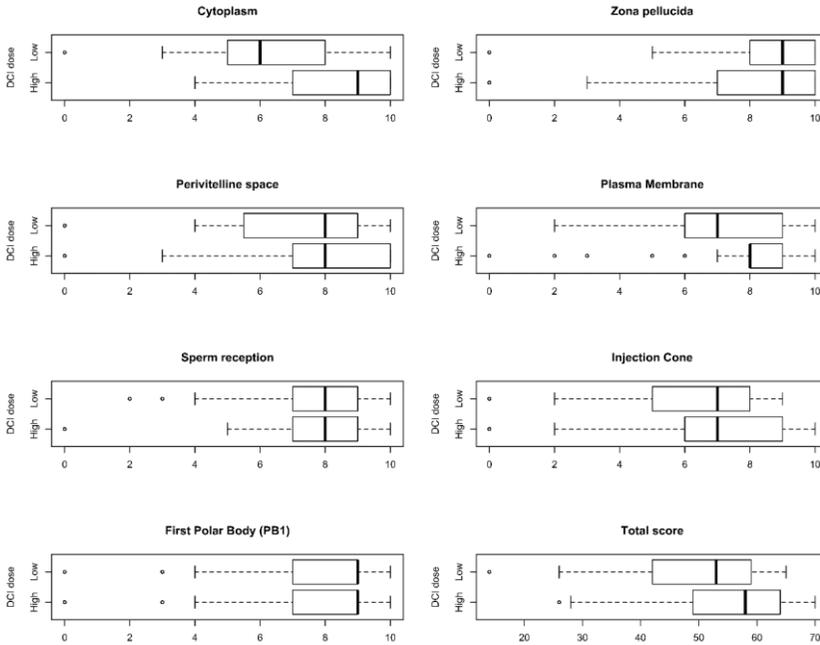


Figura 22. Box and whisker plot for CO markers.

## **V. TAREA 3**

### **5.1. OBJETIVO.**

Analizar la mejora de la CO con el score definido en la Tarea 1 en mujeres que hayan usado la hormona del crecimiento (GH) durante su estimulación ovárica.

Este estudio se llevó a cabo para evaluar los efectos de la administración de GH durante la estimulación ovárica en el número de ovocitos recuperados, en la CO y la calidad embrionaria, así como en los resultados de la TRA en mujeres jóvenes con fracasos previos de la ICSI.

En estudios previos realizados por nuestro grupo observamos que la GH mejora las tasas de implantación y de nacidos vivos en mujeres de más de 40 años sometidas a ICSI. Este efecto se atribuyó inicialmente a un efecto de la GH sobre la CO, pero estudios posteriores demostraron que la GH también puede mejorar la receptividad uterina para la implantación del embrión. En cuanto a las mujeres más jóvenes con fracasos previos de implantación embrionaria tras la ICSI, los datos recogidos en la literatura son ambiguos. (*Tesarik, J., et al.*).

### **5.2. DISEÑO DEL ESTUDIO, PARTICIPANTES Y SU ASIGNACIÓN A LOS GRUPOS.**

Estudio retrospectivo que compara el número y el aspecto morfológico de los ovocitos recuperados de mujeres con dos fracasos previos de ICSI y edades comprendidas entre 30 y 39 años, tratadas con GH. Los resultados se compararon con un grupo control de mujeres sin tratamiento con GH.

Este estudio retrospectivo fue aprobado por el comité ético de nuestra clínica. Todos los procedimientos realizados en este estudio se ajustaron a las normas éticas del comité de investigación institucional y nacional y a la declaración de Helsinki de 1964 y sus modificaciones posteriores. Todas las participantes firmaron un consentimiento informado.

En el estudio participaron 98 mujeres, con edades comprendidas entre los 30 y los 39 años, y que se habían sometido a al menos 2 intentos previos de ICSI sin éxito a pesar de haber generado un número aceptable de ovocitos y embriones. Fueron consideradas para un nuevo intento de tratamiento en la Clínica MAR&Gen en el período comprendido entre enero de 2014 y diciembre de 2017.

Cincuenta y dos de estas mujeres fueron tratadas con GH durante la estimulación ovárica, mientras que las otras 46 no lo fueron. La asignación de las pacientes a cada uno de los dos grupos se basó en la propia decisión de las parejas tras haber recibido información exhaustiva en relación con los conocimientos actuales sobre el uso de la GH en su situación.

De hecho, nuestro comité ético desaconsejó la realización de un ensayo controlado aleatorio porque, a la vista de nuestros resultados anteriores, la asignación deliberada de pacientes al grupo de control podría causar daños.

Así pues, todos los pros y los contras, así como la falta de pruebas sólidas a favor de la GH, se discutieron a fondo con cada pareja. La decisión fue tomada por las parejas, no por el personal médico.

Se explicó que se ha demostrado que la GH mejora claramente los resultados de la ICSI en las mujeres mayores, pero que sus beneficios para las mujeres más jóvenes que se someten a un tratamiento de ICSI son controvertidos.

Dado que el tratamiento breve con GH no tiene efectos secundarios sobre la salud de la paciente, la decisión de las pacientes en cuanto al uso de este tratamiento estaba motivada a veces por su coste.

Algunas pacientes también prefirieron no ser incluidas en el grupo de GH por la preocupación de una "sobremedicación" potencialmente inútil, añadiendo más inyecciones diarias al ya bastante complejo protocolo de estimulación ovárica.

A pesar de la ausencia de cualquier "emparejamiento" artificial, las pacientes que decidieron ser incluidas en el grupo de GH tenían características basales similares en comparación con las que prefirieron el protocolo de estimulación ovárica estándar (Tabla 6).

**Tabla 6:** Baseline characteristics of women (n=98) treated (n=52) and untreated (n=46) with GH.

Treatment	Age (year)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Infertility duration (years)	AFCm(n)	SerumAMH (ng/ml)
Without GH	34.5±4.9	21.9±4.2	3.9±1.8	6.8±4.1	2.3±1.4
With GH	34.8±4.1	22.2±4.3	4.1±2.1	6.4±4.0	2.2±1.5
<b>P-value</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>

Values are mean ± SD (%). Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188.

Si no fuera por la exclusión de la administración de GH del protocolo de estimulación ovárica, estas pacientes fueron tratadas exactamente igual que las del grupo GH. Sólo se incluyeron las parejas con parámetros espermáticos básicos normales y un porcentaje normal de espermatozoides con fragmentación del ADN (Tesarik J, Galán-Lázaro M., 2017).

### 5.3. TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

La ICSI se realizó en todas las pacientes que participaron en este estudio, tras la estimulación ovárica mediante un protocolo de antagonistas de la GnRH. Los detalles de los

protocolos clínicos y de laboratorio utilizados se publicaron en detalle anteriormente (Altmäe S, Mendoza-Tesarik R, et col., 2018).

Brevemente, las pacientes fueron tratadas con inyecciones diarias de hormona foliculoestimulante (FSH) recombinante (Puregon o Gonal F) y de gonadotropina menopáusica humana (HMG) (Menopur), iniciadas entre el segundo y el cuarto día después del comienzo de la hemorragia menstrual.

Las dosis iniciales de FSH y HMG se determinaron en función de los marcadores de reserva ovárica de las pacientes, el recuento de folículos antrales y la concentración sérica de LH el día anterior al inicio de la estimulación. Si el nivel sérico de LH antes del inicio de la estimulación ovárica era inferior a 2 UI/L, se añadía HMG a la FSH. Si el recuento de folículos antrales pequeños en ambos ovarios era igual o superior a 10 y la concentración sérica de LH estaba entre 1 y 2 UI/l, la dosis diaria habitual de HMG durante los primeros 4 días de estimulación era de 75 UI.

Cuando había <10 folículos antrales pequeños en ambos ovarios, la dosis habitual de HMG era de 150 UI.

El tratamiento con HMG se acompañó siempre de FSH, cuya dosis se adaptó en función de la concentración sérica basal de la hormona antimulleriana de la paciente.

Los siguientes exámenes ecográficos, así como las determinaciones de las concentraciones séricas de estradiol y LH se realizaron el 5º día de la estimulación y luego cada dos días hasta la administración del desencadenante de la

ovulación. Las dosis respectivas de FSH y HMG administradas se adaptaron, de manera flexible, en función de los resultados de cada uno de estos exámenes, de la misma manera que se describe para el protocolo de estimulación ovárica larga controlada por agonistas de GnRH (*Altmäe S, Mendoza-Tesarik R, et col., 2018*).

Brevemente, la dosis de FSH se determinó básicamente en función de la concentración sérica de estradiol y del número y tamaño de los folículos antrales. Si la concentración sérica de LH tendía a disminuir, especialmente tras el inicio del tratamiento con antagonistas de la GnRH, el crecimiento de todos los folículos era lento y no se observaba tendencia a la dominancia, se mantenían dosis más altas de HMG (75-150 UI). Si, por el contrario, las concentraciones séricas de LH aumentaban, el crecimiento folicular era rápido y algunos folículos crecían más rápidamente que otros, se mantenía la HMG a dosis mínimas o incluso se retiraba, terminando todo el procedimiento de estimulación ovárica con FSH sola.

Si se observaban tendencias diferentes, y a veces opuestas, en todos estos parámetros, el clínico tomaba la decisión después de ponderar las ventajas y desventajas de las diferentes proporciones de dosis de FSH a HMG, teniendo en cuenta la historia y el cuadro clínico completo de cada caso.

La ovulación se desencadenó mediante la inyección subcutánea de 250 µg de gonadotropina coriónica humana recombinante (HCG; Ovitrelle) cuando al menos dos folículos alcanzaron el tamaño de 17-18 mm. La punción ovárica para la

recuperación de ovocitos se realizó 36,5 h después de la inyección de HCG.

A pesar de que todos los varones tenían parámetros espermáticos normales, se utilizó en todos los casos la ICSI de alta magnificación, también llamada inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI) por precaución, teniendo en cuenta los antecedentes de fracasos de ICSI anteriores de las pacientes, como se ha descrito anteriormente (*Hazout A, et col., 2006*).

Todos los embriones se transfirieron el día 3 después de la ICSI. Al menos un embrión de calidad aceptable (puntuaciones acumuladas A, B o C, excluyendo la puntuación D) estaba disponible para la transferencia en todos los casos.

La fase lútea se apoyó con progesterona micronizada intravaginal, comenzando el día de la recuperación de los ovocitos, en dosis diarias que oscilaban entre 200 y 600 mg, según la concentración sérica de progesterona, determinada el día de la transferencia de los embriones y luego cada 7 días durante el primer mes después de la transferencia.

#### **5.4. PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE GH.**

Se administró una dosis total de 10 mg de GH (Nutropin) en 10 dosis diarias de 1 mg, comenzando el primer día de la estimulación ovárica. Cuando la estimulación ovárica fue inferior a 10 días, el resto de la dosis total de 10 mg se administró al día siguiente de la aplicación del disparador de la ovulación.

Este protocolo de administración de GH de corta duración se basó en nuestro trabajo anterior (*Tesarik J, et col., 2005*)

destinado a mejorar la calidad de los ovocitos más que la cantidad. De hecho, las mujeres incluidas en este estudio eran relativamente jóvenes y produjeron un número suficiente de ovocitos en sus anteriores intentos de tratamiento sin éxito.

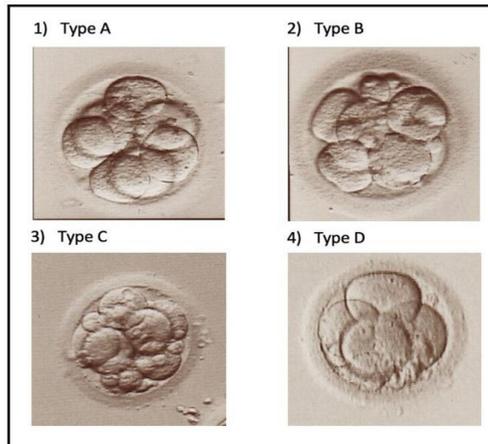
### **5.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE OVOCITOS, CIGOTOS Y EMBRIONES.**

La CO, de cigotos y de embriones se evaluó mediante un examen microscópico con un microscopio invertido (Olympus IX71) equipado con óptica de contraste de modulación Hoffman. A los ovocitos se les atribuyó una puntuación teniendo en cuenta el score definido en la Tarea 1.

Los cigotos y los embriones escindidos (Figura 24) se calificaron según lo descrito anteriormente (*Tesarik J, Greco E., 1999. Tesarik J. et al., 2000. Balaban B., et al., 2001. Rossi-Ferragut L., et al., 2003. Rienzi L., et al., 2002*).

Brevemente, los embriones escindidos se puntuaron según el número de células, la forma y la regularidad de las células y el volumen ocupado por los fragmentos anucleados (Figura 23).

**Figura 23:** Micrographs showing different types of cleaving embryos on day 3 after ICSI. (1) Type A embryo with adequate number of cells of equal size and only a few cell fragments. (2) Type B embryo with adequate number of cells but some of unequal size and a larger volume occupied by cell fragments. (3) Type C embryo with a lower number of cells and numerous cell fragments. (4) Type D embryo apparently blocked at the 4-cell stage and some cell fragments.



*Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188.*

## **5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis se realizó con el programa SPSS versión 16.0 para Microsoft Office (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE para las variables cuantitativas o porcentaje (%) de o cualitativas. Los datos entre los dos grupos se analizaron mediante la prueba t de Student para las variables cuantitativas y las pruebas X<sup>2</sup> para las cualitativas. Todas las pruebas fueron de dos colas y un  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## **5.7. DECLARACIÓN DE ÉTICA.**

Los estudios con participantes humanos fueron revisados y aprobados por la Fundación MAR&Gen Mendoza Tesarik. Granada, España. Los pacientes/participantes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio.

## **5.8. RESULTADOS.**

A pesar del carácter retrospectivo de este estudio, las pacientes tratadas y las no tratadas con GH eran similares en cuanto a su edad, duración de la infertilidad y parámetros básicos de la función ovárica.

Con el mismo protocolo de estimulación ovárica, teniendo en cuenta el estado individual de cada paciente y ajustando durante la estimulación según la respuesta de la paciente, no hubo diferencias en el número total de ovocitos y de ovocitos maduros (metafase II) (Tabla 7) recuperados de las mujeres coestimuladas con GH en comparación con aquellas en las que no se utilizó GH.

**Tabla7:** Effect of GH treatment during ovarian stimulation on oocyte quality.

Treatment	Metaphase II (MII) oocytes retrieved per patient <sup>a</sup>				
	Total MII oocytes	Type A	Type B	Type C	Type D
Without GH	6.5±3.2 (100)	2.9±2.7 (45)	1.6±1.4 (25)	1.0±1.3 (15)	1.0±1.3 (15)
With GH	6.9±2.9 (100)	4.1±2.9 (59)	1.7±1.7 (25)	0.8±0.9 (12)	0.3±0.6 (4)
<b>P-value</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&gt;0.05</b>

<sup>a</sup>Values are mean ± SD (%). Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188.

Por el contrario, el número y el porcentaje de ovocitos con la mejor puntuación de CO (Tipo A, Tabla 7) fue significativamente mayor, y los de ovocitos con la peor puntuación (Tipo D, Tabla 7) fue significativamente menor en las pacientes tratadas con GH en comparación con las no tratadas (Tabla 7).

En cuanto al número y el porcentaje de ovocitos con las puntuaciones de CO intermedias (Tipos B, y C, Tabla 7), no hubo diferencias entre los dos grupos de pacientes. No se detectaron diferencias significativas en el grosor del endometrio ( $P > 0,05$ ) entre los protocolos que incluían GH ( $9,0 \pm 1,3$  mm) y los que no ( $8,8 \pm 1,2$  mm).

**Tabla 8:** Effect of GH treatment during ovarian stimulation on zygote quality.

Treatment	Zygotes with normal and abnormal pronuclear pattern achieved per patient <sup>a</sup>		
	Total	Normal pattern	Abnormal patient
Without GH	4.6±2.5 (100)	0.6±0.8 (13)	4.0±2.0 (87)
With GH	5.8±2.5 (100)	1.4±1.2 (24)	4.4±2.4 (76)
<b>P-value</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&gt;0.05</b>

<sup>a</sup>Values are mean ± SD (%). Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188

Las pacientes tratadas con GH tuvieron un número significativamente mayor de cigotos totales y de cigotos de buena calidad, según la evaluación de la morfología pronuclear (Tabla 8), más embriones de escisión total y aquellos con la mayor puntuación de calidad morfológica (Tipo A) y menos embriones con las puntuaciones más bajas (Tipos C y D) en comparación con las pacientes no tratadas (Tabla 9).

Al igual que las puntuaciones de CO (Tabla 7), no hubo diferencias significativas en el número y el porcentaje de embriones con una puntuación de calidad intermedia (Tipo B) entre ambos grupos (Tabla 9).

**Tabla 9:** Effect of GH treatment during ovarian stimulation on the quality of embryos achieved.

Treatment	Embryos achieved per patient <sup>a</sup>				
	Total	Type A	Type B	Type C	Type D
Without GH	4.7±2.5 (100)	1.4±1.2 (30)	1.7±1.6 (36)	1.0±0.8 (21)	0.6±0.8 (13)
With GH	5.9±2.4 (100)	3.2±2.1 (54)	1.9±1.4 (32)	0.6±0.8 (10)	0.0
<b>P-value</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>

<sup>a</sup>Values are mean ± SD (%). Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188

Se transfirió un número similar de embriones en las pacientes tratadas y en las no tratadas con GH, pero las pacientes del primer grupo recibieron más embriones de alta calidad en comparación con las del segundo (Tabla 11).

**Tabla 10:** Effect of GH treatment during ovarian stimulation on the quality of embryos transferred.

Treatment	Embryos transferred per patient <sup>a</sup>			
	Total	Type A	Type B	Type C
Without GH	2.4±0.6 (100)	1.0±1.1 (42)	0.9±0.7 (37)	0.5±0.7 (21)
With GH	2.2±0.6 (100)	1.8±0.8 (82)	0.3±0.6 (14)	0.1±0.1 (4)
<b>P-value</b>	<b>&gt;0.05</b>	<b>&lt;0.05</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>

<sup>a</sup>Values are mean ± SD (%). Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188

Un mayor número de pacientes tratadas con GH se quedaron embarazadas tras la transferencia de embriones, y desarrollaron más sacos gestacionales, en comparación con el grupo de pacientes no tratadas (Tabla 11). En consecuencia, tanto la tasa de embarazo como la de implantación mejoraron significativamente con la administración de GH (Tabla 11).

**Tabla 11:** Effect of GH treatment on clinical pregnancy and delivery rate.

Treatment	Embryo transfers	Clinical pregnancies	Deliveries	Pregnancy rate	Delivery rate
Without GH	46	5	3	10.9%	6.5%
With GH	52	22	18	42.3%	34.6%
<b>P-value</b>				<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>

Values are mean  $\pm$  SD (%). *Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188*

En las pacientes tratadas con GH nacieron 18 bebés sanos, frente a sólo 3 en el grupo de pacientes no tratadas, lo que marca una diferencia significativa tanto en la tasa de partos (Tabla 12) como en la de nacimientos (Tabla 12) a favor del grupo de pacientes tratadas con GH.

**Tabla 12:** Effect of GH treatment on clinical implantation and birth rate.

Treatment	Embryo transferred	Gestational sacs with heartbeat	Babies born	Clinical implantation rate	Birth rate
Without GH	110	5	3	4.5%	2.7%
With GH	104	22	18	21.2%	17.3%
<b>P-value</b>				<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>

Values are mean  $\pm$  SD (%). *Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Sep 29;11:519572. doi: 10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188*

No se observaron complicaciones en ninguno de los dos grupos de pacientes durante y después de la estimulación ovárica.

## VI. DISCUSION.

### 6.1. TAREA 1.

Generalmente, los ovocitos son evaluados, por toda la comunidad científica, basándose en 6 parámetros como son, tamaño y forma del ovocito (*Ebner, T. et, 2008; Balakier, H. et al, 2002*), calidad del citoplasma (*Esfandiari, N. et al. 2006; Wallbutton, S. et al. 2010; Fancsovits, P. et al. 2011*), estructura del espacio perivitelino (*Farhi, J. et al. 2002*), zona pelúcida (*Balakier, H. et al. 2012*) y morfología del corpúsculo polar (*Ciotti, P.M. et al. 2004; Navarro, P.A. et al. 2009*).

De entre todos los parámetros de CO, tanto cualitativos como cuantitativos, que se pueden utilizar para la determinación de un ovocito MII, después de anotar datos de más de 2000 ovocitos, y tras 15 años de práctica en laboratorio, hemos elegido aquellos que nos ofrecen información de forma más clara, y que pueden ser rápidamente observados durante el proceso de microinyección intracitoplasmática (ICSI), que debe ser lo más rápido posible para alterar mínimamente los valores óptimos de temperatura, concentración de CO<sub>2</sub> y concentración de medios de cultivo en los que deben permanecer los ovocitos, y posteriormente los embriones, desde el momento de la punción folicular, hasta el de la transferencia embrionaria, o criopreservación.

En 2019, la Dra. Raquel Mendoza Tesarik, directora de la Clínica MAR&Gen, publicó su Tesis Doctoral “**Nuevos avances en la reproducción asistida, mejora de la CO y de la**

**receptividad uterina”** basándose en diez marcadores de CO observados y registrados en el laboratorio de la clínica entre los años 2016 a 2018.

Estos marcadores fueron: tamaño y forma del ovocito, calidad del citoplasma, morfología del primer corpúsculo polar, morfología de la zona pelúcida, espacio perivitelino, presencia de retículo endoplasmático, elasticidad de la membrana plasmática, recepción del espermatozoide y formación de cono de inyección.

Durante la práctica de laboratorio, con la utilización cotidiana de dichos marcadores como proveedores de información en tiempo real, hemos descartado el uso de algunos de ellos por no proporcionar información añadida.

Tal es el caso de la presencia de Retículo Endoplasmático, cuyos valores se solapan con el marcador de calidad referente a la calidad del citoplasma, y finalmente queda incluido dentro de este último marcador.

En el caso del marcador referente a tamaño y forma del ovocito, ha sido descartado porque ovocitos con morfología incorrecta suelen estar asociados a zonas pelúcidas deformes o tabicadas, y, además, se presenta una elevada tasa de aneuploidías en ovocitos dismórficos (Kahraman et al. 2000). Así mismo, ovocitos de menor tamaño del normal, que con relativa frecuencia se dan en mujeres con síndrome del ovario poliquístico (PCOS por sus siglas en inglés) o resistencia a la Insulina, son descartados para la microinyección, por el mayor riesgo de retraso en el desarrollo embrionario y restricción del

crecimiento, anatomía, defectos y fetos más pequeños (*Jungheim et al. 2010; Maquard et al, 2010*).

Aunque la utilización de los diez parámetros de CO usados en nuestro laboratorio inicialmente, frente a los seis clásicamente usados por la comunidad científica, nos ha ofrecido una mejor catalogación de los ovocitos, tras un trabajo continuado de observación en laboratorio a lo largo de estos años, la reducción de dichos parámetros de catalogación de CO a los siete presentados en este trabajo, nos ha otorgado una visión global más rápidamente perceptible de la calidad de los ovocitos durante el tiempo de microinyección, lo que mejora los tiempos de trabajo, dado que la exposición de los ovocitos a ambientes no controlados durante dicho proceso ha de ser la mínima posible.

Sería recomendable ampliar los estudios referentes a los tres parámetros más subjetivos, esto es, elasticidad de membrana, formación del cono de inyección, y recepción del espermatozoide, puesto que son grandes generadores de información con respecto a la fragilidad del ovocito. Pero su carácter subjetivo hace que estos parámetros dependan mucho de la pericia y visión subjetiva del embriólogo.

## **6.2. TAREA 2.**

Los principales resultados de este estudio muestran que una dosis de DCI más alta que la recomendada (*Facchinetti F., et al., 2019*) aumenta la CO, especialmente la calidad del citoplasma, en mujeres con PCOS que se someten a ICSI.

Hasta donde sabemos, este es el primer ECA que estudia el efecto de diferentes dosis de DCI sobre la CO.

Un estudio anterior mostró que las tasas de embarazo con la relación MYO / DCI no fisiológica eran más altas sin mejorar la maduración de los ovocitos o la calidad del embrión.

Se propusieron dos explicaciones: en primer lugar, la participación de la DCI en la implantación y el desarrollo embrionario; en segundo lugar, un efecto del ICD sobre otras variables de CO, que pasan desapercibidas en las clasificaciones que generalmente se hacen. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue estudiar en detalle el impacto de una dosis más alta de DCI en fabricantes específicos de CO (*Mendoza N. et al., 2019*).

La principal fortaleza del presente estudio es la combinación de análisis de siete marcadores de CO específicos.

El conocimiento sobre los marcadores morfológicos de CO es bajo. Un ovocito maduro óptimo es aquel que tiene una forma redondeada, con una zona pelúcida clara y uniforme de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de espesor, con un citoplasma translúcido, libre de inclusiones y un cuerpo polar de tamaño y forma adecuados (*Piomboni P., 2014; ESHRE, 2011*).

Sin embargo, el estado actual de conocimiento sobre los parámetros morfológicos del ovocito no permite establecer una correlación clara con los resultados de la reproducción. Por esta razón, todavía no podemos confiar en un puntaje de CO como lo hacemos para la calidad de los embriones, aunque cada vez es más evidente que deberían incluirse en el futuro a medida que exista más evidencia científica.

La principal debilidad de este estudio se relaciona con dos puntos: la subjetividad de la puntuación CO y el hecho de que forma parte del ECA. En nuestro centro, hemos utilizado una serie de marcadores morfológicos de CO que no se han publicado previamente y que utilizamos de forma rutinaria en el informe final que se envía a cada paciente después del ensayo ICSI. Dado que se trata de una evaluación especial, estos marcadores de CO no se incluyeron en el primer ECA multicéntrico (*Mendoza N., et al., 2019*).

Como ya hemos demostrado en el ECA original, todavía existe confusión acerca de la dosis de DCI que puede ser apropiada en mujeres con SOP, y aún ignoramos los mecanismos celulares subyacentes a las mejoras observadas en este estudio que subyacen a la CO. Se recomendó la combinación de MYO / DCI en una proporción de 40: 1 ya que esta es la proporción sanguínea fisiológica de las dos moléculas. Sin embargo, se pensó que la dosis total de DCI puede ser más importante que la proporción (*Albertini, DF., et al., 2003*).

En los marcadores analizados destacamos la calidad del citoplasma, con una mejora significativa con dosis más altas de DCI. Según el análisis multivariado que utiliza un modelo lineal de efectos mixtos, existe una fuerte evidencia de que el efecto positivo de un DCI alto sobre la masa citoplasmática aumenta en 1,6 unidades en comparación con un DCI bajo ( $\beta = 1,571$ ,  $\chi^2 = 7,420$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,00645$ ).

Nuestros datos son consistentes con la suposición de que cambios citoplasmáticos severos, como la presencia de granulaciones citoplasmáticas granulares ubicadas en el centro,

inclusiones, agregados del retículo endoplásmico liso o vacuolización excesiva, podrían afectar el desarrollo embrionario y su potencial de implantación. Además, esto apoya la hipótesis de que los efectos de los cambios extracitoplasmáticos no parecen correlacionarse con la calidad del embrión o las tasas de implantación (*Eini, F., et al., 2017*). La elasticidad de la membrana plasmática y la impresión del cono de inyección son otros marcadores aparentemente mejorados con un DCI elevado. Sin embargo, el análisis multivariado no muestra estas diferencias y probablemente serán necesarios ensayos con más participantes.

Por otro lado, también hemos observado que algunos marcadores (zona pelúcida, membrana plasmática, citoplasma y recepción de espermatozoides) se han mejorado con cualquier combinación de MYO / DCI al disminuir la testosterona o mejorar la sensibilidad a la insulina. Con respecto a la membrana plasmática de los ovocitos, observamos que había mejorado con la disminución de testosterona, independientemente de la dosis de DCI. La menor elasticidad de la membrana plasmática durante el procedimiento de ICSI puede provocar daño o muerte de los ovocitos, así como consecuencias reproductivas, ya que "permite que el embrión nazca y se implante en él" (*Bausenwein, J., et al., 2010*). Por tanto, la calidad de la membrana plasmática también podría mejorar la implantación de embriones, que es uno de los posibles resultados de una DCI a dosis altas.

Los beneficios de la DCI sobre la CO podrían explicarse por mecanismos que afectan al óvulo mismo o la composición del líquido folicular. Se sabe que la CO no solo está influenciada

a nivel genómico, sino también por el microambiente folicular, que afecta principalmente a la madurez / calidad citoplásmica (*Chattopadhyay, R., et al. 2010. Nestler, JE., et al., 1999. Morgante, G., et al., 2011. Zheng, W., et al., 2012. Zheng, W., et al., 2010. Zheng, W., Liu, K., 2011*).

A nivel de ovocitos, quizás porque la DCI es el sustrato de las fosfatidilinositol-3-quinasas (PI3K), una enzima involucrada en la activación de los ovocitos y en la supervivencia y actividad de las células de la granulosa de las que depende la CO, pero que pueden ser igualmente importantes en el ovocito. sí mismo. Los estudios que utilizaron modelos de ratón modificados genéticamente revelaron que la vía de señalización de PI3K dentro de los ovocitos conserva y activa los folículos originales (*Zheng, W., Liu, K., 2011*).

Además, según un estudio in vivo en ratones, es probable que la vía intracelular de PI3K sea superflua para la regulación de la reanudación meiótica de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano (*Zheng, W., et al., 2010. Zheng, W., Liu, K., 2011*).

Además de la necesidad de realizar más estudios con poblaciones más amplias, es importante el uso de marcadores de CO específicos y homogéneos. Para superar adecuadamente las dudas sobre los mecanismos intraquísticos de acción de la DCI, creemos que se requiere más investigación sobre el metabolismo intracelular del inositol y cada una de sus isoformas.

### **6.3. TAREA 3.**

Los presentes datos demuestran que, independientemente del eventual efecto sobre la receptividad uterina, la GH tiene una clara influencia beneficiosa sobre la cantidad y la calidad morfológica de los ovocitos cigotos y los embriones escindidos cuando se administra a mujeres jóvenes con fracasos previos de ICSI.

Estas mejoras se acompañan de un aumento significativo de las tasas de embarazo clínico, parto, implantación y nacimiento en este grupo de pacientes. No se estableció ningún embarazo múltiple en ninguno de los dos grupos, lo que resulta algo sorprendente, especialmente en el grupo de GH.

Aunque esto podría ser una cuestión de azar, también es posible que algunas de las pacientes tuvieran otros factores predisponentes para el fracaso de la implantación, no solucionables por el tratamiento con GH.

A diferencia del estudio de Jin et al. (*Jin, M., et al., 2018*), el número de ovocitos maduros (metafase II) recuperados en las pacientes tratadas y en las no tratadas con GH fue similar. Sin embargo, de acuerdo con esas observaciones previas (*Jin, M., et al., 2018*), hubo más ovocitos de buena calidad, ovocitos fertilizados y cigotos y embriones de buena calidad en el grupo de GH.

Se ha demostrado que la administración de GH aumenta la densidad de los receptores de FSH-LH y de la proteína morfogenética ósea (BMP) en las células foliculares de la granulosa del ovario (*Regan, SLP., et al., 2018*). Este efecto puede

conducir a un aumento del número de ovocitos recuperables en mujeres con una respuesta ovárica pobre (*Regan, SLP., et al., 2018. Chattopadhyay, R., et al., 2010*), mientras que puede mejorar la calidad más que la cantidad de ovocitos recuperados de mujeres con una respuesta ovárica básicamente normal.

Este tipo de pacientes fue predominante en el presente estudio. Esta hipótesis se ve corroborada por la presente observación de que la administración de GH en este grupo de pacientes no sólo mejoró la calidad morfológica de los ovocitos obtenidos, sino que también aumentó el número total de ovocitos fecundados (cigotos), el de cigotos normales y el de embriones de alta calidad, a juzgar por su aspecto morfológico. Entre estas características, la de la calidad del cigoto parece ser de particular importancia, ya que se demostró previamente que la morfología pronuclear del cigoto está relacionada no sólo con los resultados clínicos de la ICSI (*Tesarik, J., Greco, E., 1999 Tesarik, J., et al., 2000. Balaban, B., et al., 2001. Rossi-Ferragut, L., et al., 2003*) y la tasa de desarrollo del embrión hasta la fase de blastocisto (*Balaban, B., et al., 2001*), sino también con la ploidía normal de los blastocistos resultantes (*Gianaroli, L., et al., 2003. Balaban, B., et al., 2004. Gianaroli, L., et al., 2007*).

Cuando se utiliza en combinación con la evaluación posterior de la morfología del embrión durante las fases posteriores del desarrollo preimplantacional, el valor pronóstico de la morfología del cigoto, en cuanto a la probabilidad de establecer un embarazo normal, se incrementó aún más (*Rienzi, L., et al., 2002. Braga, DP., et al., 2013*).

Este estudio mostró una mejora significativa de la morfología tanto del cigoto como del embrión escindido mediante la administración de GH durante la estimulación ovárica. Esto sugiere que la mejora de la calidad de los ovocitos es un importante mecanismo de acción de la GH responsable de la mejora de las tasas de embarazo, implantación, parto y nacimientos vivos en mujeres jóvenes con fracasos previos de ICSI.

Si se confirma, la regulación al alza de los receptores de las células de la granulosa por parte de la GH puede estar implicada en la maduración citoplasmática de los ovocitos que, a su vez, puede estabilizar la función de la cohesina y otras proteínas clave implicadas en el correcto funcionamiento del huso meiótico durante las fases finales de la maduración nuclear de los ovocitos.

Un efecto de la GH sobre la implantación embrionaria puede haber actuado también como factor independiente en algunos de estos casos, pero parece ser marginal en comparación con el efecto sobre la calidad de los ovocitos, de acuerdo con la observación previa de una prevalencia relativamente baja de casos con fallos repetidos de implantación tras la donación de ovocitos resueltos mediante la administración de GH a las receptoras de ovocitos (*Altmäe, S., et al., 2018*).

El mecanismo a través del cual la GH exógena puede mejorar la calidad de los ovocitos en las mujeres jóvenes aún está por dilucidar. Es posible que esté relacionado con el aumento de la densidad de los receptores para FSH, LH, BMP

receptor 1B, así como su propio receptor (*Regan, SLP., et al., 2018*).

Sin embargo, las observaciones anteriores se obtuvieron con una población de pacientes de mayor edad en comparación con la de nuestro estudio. Queda por determinar si la GH produce efectos similares en mujeres más jóvenes con fracasos previos de ICSI, supuestamente relacionados con la mala calidad de los ovocitos. Queda por determinar si los efectos beneficiosos de la GH sobre la CO están mediados principalmente por una acción directa a través de sus propios receptores o por un aumento de la secreción de IGF-1.

Se están realizando estudios para abordar estas cuestiones con el fin de caracterizar mejor a las mujeres que pueden beneficiarse de la coestimulación con GH para mejorar los resultados de la ICSI. Además del efecto sobre la calidad de los ovocitos, la mejora de la receptividad uterina (*Altmäe, S., et al., 2018*), también puede haber contribuido a los efectos positivos de la GH sobre la implantación del embrión en algunas pacientes, aunque no se encontraron diferencias en el grosor del endometrio entre las pacientes que fueron tratadas con GH y las que no. Sin embargo, la receptividad endometrial no se refleja necesariamente en el grosor del endometrio, y el diseño de este estudio no permite discriminar entre estos dos mecanismos. Esto sólo sería posible con un modelo de donación de ovocitos.

También queda por determinar por qué la administración de GH tiene más efecto en algunas mujeres jóvenes que en otras. Mientras este trabajo estaba en revisión, hemos abordado específicamente esta cuestión, con otro grupo de pacientes.

Encontramos que algunas mujeres jóvenes tienen su "edad GH", determinada indirectamente midiendo sus concentraciones séricas de IGF-1 (la GH es demasiado fluctuante para dar un resultado fiable) hasta 20 años por encima de su edad cronológica (Tesarik, J., Mendoza-Tesarik, R., 2020). Esto no se hizo en las mujeres incluidas en el presente estudio. Parece que la GH administrada externamente tiene menos efecto en mujeres jóvenes con una producción intrínseca normal de GH (Tesarik, J., Mendoza-Tesarik, R., 2020).

#### **6.4. CONCLUSIONES.**

**Tarea 1:** Entre los diferentes marcadores morfológicos de calidad ovocitaria descritos en la literatura especializada y analizados en trabajos preliminares propios, hemos seleccionado siete, cuyo valor entre 1 y 10, ha ofrecido concordancia con la calidad de los embriones resultantes. Estos parámetros son: morfología de la zona pelúcida, morfología del espacio perivitelino, calidad citoplasmática, morfología del primer corpúsculo polar, elasticidad de membrana plasmática, recepción del espermatozoide y formación del cono de inyección.

**Tarea 2:** La combinación de MYO-DCI a altas dosis de DCI mejora la calidad citoplásmica de los ovocitos de las mujeres con PCOS sometidas a ICSI. La mejora de la calidad ovocitaria

depende sobre todo de los marcadores “citoplasma”, “espacio perivitelino”, “membrana plasmática” y “cono de inyección”.

**Tarea 3:** Independientemente de su posible contribución a la mejora de la receptividad uterina, la administración de GH durante la estimulación ovárica de mujeres jóvenes con fracasos previos de ICSI ha demostrado claramente que mejora los resultados de la ICSI al aumentar la calidad de los ovocitos, cigotos y embriones.

## **VII. CALIDAD ESPERMÁTICA: PERSPECTIVAS DEL FUTURO.**

Es posible, con los conocimientos actuales en cuanto a calidad espermática, especialmente en relación con las pruebas de fragmentación de ADN espermático (SDF), relacionar el uso de dichas pruebas con diferentes historias clínicas de parejas con problemas de infertilidad y sugerir una secuencia de opciones terapéuticas según la gravedad del daño espermático y su evolución en respuesta a los tratamientos aplicados previamente.

Se presta especial atención a situaciones en las que se desconoce la causa de la SDF o en las que la integridad del ADN espermático no mejora tras el tratamiento adecuado del supuesto factor causal, como el varicocele o la infección genitourinaria.

Dejando a un lado el intenso debate sobre la elección de las pruebas que determinan la indicación de búsqueda de diagnóstico de una posible SDF, y el planteamiento de si se debe y cuándo se debe realizar una prueba SDF con respecto al historial de infertilidad, podemos hablar de criterios más o menos estrictos para la primera aplicación de una SDF, tratando de evitar la negligencia, por un lado, y la sobreactuación por otro, siendo conscientes de que son necesarias futuras investigaciones que permitan una aplicación científicamente fundamentada en cada situación clínica concreta.

Si se aplica un criterio estricto, la prueba SDF se puede realizar en cualquier pareja infértil antes de comenzar el TRA. Pero esta no es la práctica común. En ausencia de factores de riesgo conocidos, la SDF se realiza después de, al menos, un fallo inexplicable de la TRA. La omisión de la prueba de SDF en casos con espermatozoides normales y sin factores de riesgo aparentes, independientemente de un fracaso previo en TRA se puede considerar una relativa falta de rigor.

En la mayoría de las clínicas, la prueba SDF se realiza si hay presente, al menos, un factor de riesgo de mayor daño en el ADN, incluso si las características basales de los espermatozoides son normales.

En centros equipados con la tecnología necesaria para el examen de la morfología de los orgánulos de los espermatozoides móviles (MSOME), se puede considerar la realización de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI), en el próximo intento de TRA tras un primer fallo.

**Tabla 13.** Options of using sperm DNA fragmentation (SDF) testing, with or without other functional tests, in the context of different clinical scenarios, going from the less stringent (A) through medium stringent (B) to the more stringent (C)

Scenario condition	Option A	Option B	Option C
1. Normal sperm, no risk factors	No DF test	DF test in case of previous ART failure	DF test always
2. Normal sperm, one risk factor	DF test in case of previous ART failure	DF test always	DF test and MSOME
3. Altered sperm and/or several risk factors	DF test always	DF test and MSOME	DF test, MSOME and PICS1 test

MSOME, motile sperm organelle morphology examination; PICS1, physiologic ICSI.

Si uno o más factores de riesgo de daño en el ADN están asociados con parámetros espermáticos basales anormales, la ejecución de una prueba de SDF parece obligatoria. Se puede realizar sola, o en combinación con MSOME.

En laboratorios equipados para la ICSI fisiológica (PICS1), usando espermatozoides seleccionados con ácido hialurónico, también se puede examinar la capacidad para unirse al ácido hialurónico para evaluar la utilidad de PICS1 en el tratamiento futuro.

En cualquier caso, el tratamiento de la causa de la SDF es la primera opción, siempre que esta causa pueda ser identificada. Este es el caso del varicocele o de los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida, como obesidad, tabaquismo, o exposiciones ambientales y laborales, donde

alcanzan mucha importancia los compuestos disruptores endocrinos (CDE).

La cirugía del varicocele, la pérdida de peso, el abandono del tabaco y la mejora de las condiciones laborales pueden ser suficientes para permitir la normalización progresiva del estado del ADN espermático.

Pero, si no se puede identificar la causa probable del SDF, o si los cambios en el estilo de vida no fueran posibles, o no tuvieran éxito, se pueden considerar diferentes opciones de tratamiento que varían desde opciones no invasivas (medicamentos orales y técnicas de tratamiento in vitro del espermatozoide), hasta opciones invasivas (biopsia testicular), o, incluso, utilización de semen de donante como última opción de tratamiento.

Los regímenes de medicación oral más usados incluyen el uso de antioxidantes. Debido a su carácter no invasivo, este tratamiento es un enfoque de primera línea adecuado antes de recurrir a opciones más invasivas o complicadas. Si se logran resultados positivos con antioxidantes, se pueden planificar intentos de FIV/ICSI, usando, eventualmente, las nuevas modificaciones de la técnica ICSI, esto es IMSI, PICSI, o ambas.

IMSI se desarrolló originariamente, para casos de teratozoospermia severa, pero luego se demostró que también era útil para casos de SDF. De manera similar, la técnica PICSI, basada en la capacidad del espermatozoide con integridad de membrana no comprometida para unirse al ácido hialurónico, ha

demostrado que permite una selección más eficiente de espermatozoides con ADN intacto.

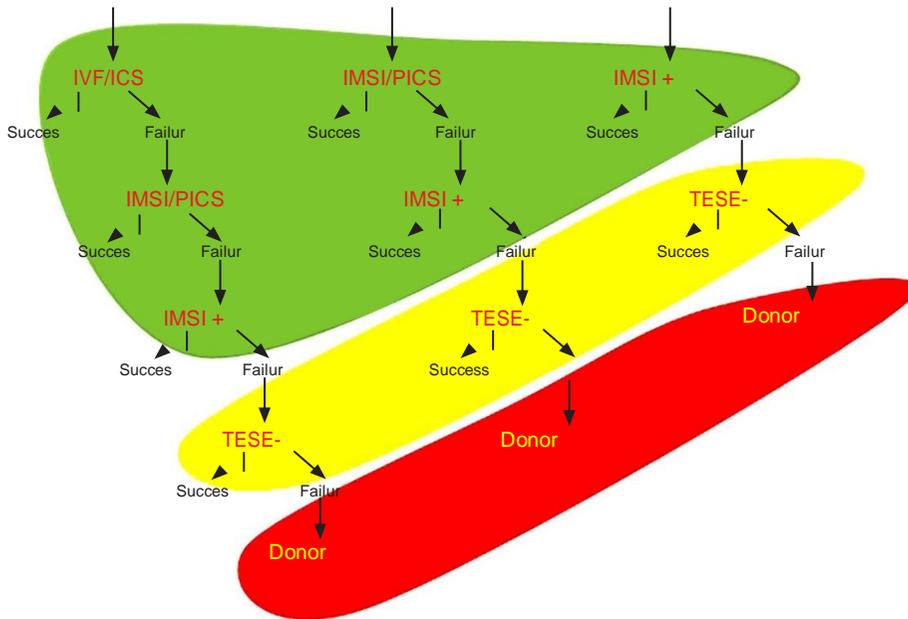
Con el uso de estas técnicas, se agotan las posibilidades de tratamiento no invasivo que ofrece el laboratorio de RA, y la extracción de espermatozoides de testículo para su posterior microinyección en el ovocito (TESE) se puede considerar como el siguiente paso en caso de fallo.

Se ha demostrado que los espermatozoides recuperados de testículo tienen un ADN menos fragmentado en comparación con los espermatozoides de eyaculado de los mismos hombres, y su uso en casos de alta incidencia de SDF permite mayores tasas de embarazo y nacimiento.

El recurso del semen de donante suele reservarse para los casos más graves en los que fallan tanto los métodos no invasivos, como los invasivos, con espermatozoides del paciente.

Por todos esto, propusimos (*Tesarik J., Galán-Lázaro, 2017*) un algoritmo de toma de decisiones terapéuticas, que debe considerarse una sugerencia basada en la disponibilidad, en lugar de una guía basada en la evidencia, y recomendamos encarecidamente un estudio multicéntrico sobre diferentes enfoques diagnósticos y terapéuticos, y sus

resultados.



**Figura 24:** Decision-making scheme showing several treatment options for cases with sperm DNA fragmentation (SDF) in the framework of different clinical scenarios, beginning with noninvasive ones (green), passing through surgical ones (yellow) and terminating by the recourse to donor sperm (red).

Además del grado de SDF, se deben tener en cuenta otros parámetros como la edad femenina y la reserva ovárica, la duración de la infertilidad, el número de intentos previos de TRA, la eventual presencia de patologías femeninas, etc.

Se pueden omitir pasos intermedios y usar las modalidades de tratamiento más eficientes en ciertas condiciones clínicas como edad materna avanzada y escasa reserva ovárica. Por otro lado, se puede optar por técnicas

menos invasivas en casos de muy baja edad materna o con ovocitos de donante, ya que se sabe que los ovocitos poseen una maquinaria de reparación del ADN, y se ha reportado que ovocitos de buena calidad provenientes de mujeres jóvenes son capaces de reparar, hasta cierto punto, el daño en el ADN espermático.

Teniendo en cuenta las graves complicaciones que puede causar un exceso de SDF tanto en la concepción natural como en TRA, parece necesario enfocar la investigación en el campo de la infertilidad masculina, en la mejora de los tratamientos no invasivos de reparación del ADN espermático.

*Nota: Todas la referencias bibliográficas no referenciadas en este punto se encuentran recogidas en Tesarik J, Galán-Lázaro M. Clinical scenarios of unexplained sperm DNA fragmentation and their management. Transl Androl Urol. 2017 Sep;6(Suppl 4):S566-S569. doi: 10.21037/tau.2017.03.70.*

En las últimas décadas, la Medicina Reproductiva ha avanzado de forma considerable en el conocimiento de la fisiología y la fisiopatología espermática y ovocitaria, descubriendo otras causas de esterilidad, entre ellas el EO. Aunque se necesita precisar cómo se diagnostica y cuál es el límite que marca lo anómalo, se proyectan interesantes perspectivas de tratamiento en forma de antioxidantes que pudieran hacer reversibles algunas de estas alteraciones.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Nov 24;12:112. doi: 10.1186/1477-7827-12-112. PMID: 25421286; PMCID: PMC4258799.

Albertini DF, Sanfins A, Combelles CM. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online*. 2003 Jun;6(4):410-5. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62159-1. PMID: 12831584.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011;26:1270–83. *Reprod Biomed Online* 2011; 22:632-646.

Altmäe S, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C, Mendoza N, Cucinelli F, Tesarik J. Effect of Growth Hormone on Uterine Receptivity in Women With Repeated Implantation Failure in an Oocyte Donation Program: A Randomized Controlled Trial. *J Endocr Soc*. 2017 Dec 19;2(1):96-105. doi: 10.1210/js.2017-00359. Erratum in: *J Endocr Soc*. 2018 Jan 08;2(2):133. PMID: 29379897; PMCID: PMC5779111.

Babayev E, Seli E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015 Jun;27(3):175-81. doi: 10.1097/GCO.000000000000164. PMID: 25719756; PMCID: PMC4590773. Barros F, Carvalho F, Barros A, Dória S. Premature ovarian insufficiency: clinical orientations for genetic testing and genetic counseling. *Porto Biomed J*. 2020 Jun 4;5(3):e62. doi: 10.1097/j.pbj.000000000000062. PMID: 33299945; PMCID: PMC7722400.

Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod*. 2001 Nov;16(11):2357-61. doi: 10.1093/humrep/16.11.2357. PMID: 11679520.

Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod Biomed Online*. 2004 Jun;8(6):695-700. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61651-3. PMID: 15169588.

Barton, K., 2018. *MuMIn: Multi-Model Inference*. R package version 1.42.1. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4*. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

*Bausenwein J, Serke H, Eberle K, Hirrlinger J, Jogschies P, Hmeidan FA, Blumenauer V, Spanel-Borowski K. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women. Mol Hum Reprod. 2010 Feb;16(2):117-24. doi: 10.1093/molehr/gap078. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19729414.*

*Blumenfeld Z, Amit T, Barkey RJ, Lunenfeld B, Brandes JM. Synergistic effect of growth hormone and gonadotropins in achieving conception in "clonidine-negative" patients with unexplained infertility. Ann N Y Acad Sci. 1991;626:250-65. doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb37920.x. PMID: 1905509.*

*Blumenfeld Z, Amit T. The role of growth hormone (GH), GH-receptor and GH-binding protein in reproduction and ovulation induction. J Pediatr Endocrinol Metab. 1996 Mar-Apr;9(2):145-62. PMID: 8887137.*

*Blumenfeld Z, Amit T. The role of growth hormone in ovulation induction. Ann Med. 1994 Aug;26(4):249-54. doi: 10.3109/07853899409147899. PMID: 7946243.*

*Braga DP, Setti AS, Figueira Rde C, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. The combination of pronuclear and blastocyst morphology: a strong prognostic tool for implantation potential. J Assist Reprod Genet. 2013 Oct;30(10):1327-32. doi: 10.1007/s10815-013-0073-3. Epub 2013 Aug 11. PMID: 23934020; PMCID: PMC3824860.*

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988 Mar 31;332(6163):459-61. doi: 10.1038/332459a0. PMID: 3352746.

Budani MC, Tiboni GM. Effects of Supplementation with Natural Antioxidants on Oocytes and Preimplantation Embryos. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 12;9(7):612. doi: 10.3390/antiox9070612. PMID: 32664650; PMCID: PMC7402117.

Chattopadhyay R, Ganesh A, Samanta J, Jana SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;69(3):197-202. doi: 10.1159/000270900. Epub 2009 Dec 24. PMID: 20051691.

Chiu TT, Rogers MS, Law EL, Briton-Jones CM, Cheung LP, Haines CJ. Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. *Hum Reprod*. 2002 Jun;17(6):1591-6. doi: 10.1093/humrep/17.6.1591. PMID: 12042283.

Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munné S, Levron J, Wu L, Brenner C, Warner C, Willadsen S. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod*. 1998 Mar;4(3):269-80. doi: 10.1093/molehr/4.3.269. PMID: 9570273.

Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet*. 1997 Jul 19;350(9072):186-7. doi: 10.1016/S0140-6736(05)62353-7. PMID: 9250192

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010 May-Jun;16(3):231-45. doi: 10.1093/humupd/dmp048. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19934213.

de Ziegler D, Streuli I, Meldrum DR, Chapron C. The value of growth hormone supplements in ART for poor ovarian responders. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1069-76. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.09.049. PMID: 22036051.

Demko ZP, Simon AL, McCoy RC, Petrov DA, Rabinowitz M. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. *Fertil Steril*. 2016 May;105(5):1307-1313. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.025. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26868992.

Dor J, Seidman DS, Amudai E, Bider D, Levran D, Mashiach S. Adjuvant growth hormone therapy in poor responders to in-vitro fertilization: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Hum Reprod*. 1995 Jan;10(1):40-3. doi: 10.1093/humrep/10.1.40. PMID: 7745068.

Du XF, Yang XH, Li J, Hao M, Guo YH. Growth hormone co-treatment within a GnRH agonist long protocol improves implantation and pregnancy rates in patients undergoing IVF-ET. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Oct;294(4):877-83. doi: 10.1007/s00404-016-4163-1. Epub 2016 Aug 3. PMID: 27488698.

Dviri M, Madjunkova S, Koziarz A, Antes R, Abramov R, Mashiach J, Moskovtsev S, Kuznyetsova I, Librach C. Is there a correlation between paternal age and aneuploidy rate? An analysis of 3,118 embryos derived from young egg donors. *Fertil Steril.* 2020 Aug;114(2):293-300. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.03.034. Epub 2020 Jul 9. Erratum in: *Fertil Steril.* 2020 Nov;114(5):1122. PMID: 32654815.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod.* 2002 Sep;17(9):2415-8. doi: 10.1093/humrep/17.9.2415. PMID: 12202433.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000 Feb;15(2):427-30. doi: 10.1093/humrep/15.2.427. PMID: 10655316.

Eini F, Novin MG, Joharchi K, Hosseini A, Nazarian H, Piryaei A, Bidadkosh A. Intracytoplasmic oxidative stress reverses epigenetic modifications in polycystic ovary syndrome.

*Reprod Fertil Dev.* 2017 Nov;29(12):2313-2323. doi: 10.1071/RD16428. PMID: 28442024.

Facchinetti F, Bizzarri M, Benvenga S, D'Anna R, Lanzone A, Soulage C, Di Renzo GC, Hod M, Cavalli P, Chiu TT, Kamenov ZA, Bevilacqua A, Carlomagno G, Gerli S, Oliva MM, Devroey P. Results from the International Consensus Conference on Myo-inositol and d-chiro-inositol in Obstetrics and Gynecology: the link between metabolic syndrome and PCOS. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015 Dec;195:72-76. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.09.024. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26479434.

Facchinetti F, Orrù B, Grandi G, Unfer V. Short-term effects of metformin and myo-inositol in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS): a meta-analysis of randomized clinical trials. *Gynecol Endocrinol.* 2019 Mar;35(3):198-206. doi: 10.1080/09513590.2018.1540578. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30614282.

Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online.* 2015 Oct;31(4):486-96. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.015. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26283017.

Fortuño C, Labarta E. Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Dec;31(12):1573-85. doi: 10.1007/s10815-014-0342-9. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25227694; PMCID: PMC4250468.

Fox, J., Weisberg, S., 2011. *An R Companion to Applied Regression, Second Edition*. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>

Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. *The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening*. *Fertil Steril*. 2014 Mar;101(3):656-663.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24355045.

Gat I, Blanco Mejia S, Balakier H, Librach CL, Claessens A, Ryan EA. *The use of coenzyme Q10 and DHEA during IUI and IVF cycles in patients with decreased ovarian reserve*. *Gynecol Endocrinol*. 2016 Jul;32(7):534-7. doi: 10.3109/09513590.2015.1137095. Epub 2016 Feb 1. PMID: 26829445.

Genazzani AD. *Inositol as putative integrative treatment for PCOS*. *Reprod Biomed Online*. 2016 Dec;33(6):770-780. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.08.024. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27717596.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. *Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection*. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):341-9. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00596-x. PMID: 12909497.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod.* 2007 Jan;22(1):241-9. doi: 10.1093/humrep/del334. Epub 2006 Aug 26. PMID: 16936301.

Gong Y, Luo S, Fan P, Jin S, Zhu H, Deng T, Quan Y, Huang W. Growth hormone alleviates oxidative stress and improves oocyte quality in Chinese women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Sci Rep.* 2020 Oct 30;10(1):18769. doi: 10.1038/s41598-020-75107-4. PMID: 33127971; PMCID: PMC7599233.

Goud PT, Goud AP, Joshi N, Puscheck E, Diamond MP, Abu-Soud HM. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2014 Jul;102(1):151-159.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.053. Epub 2014 May 10. Erratum in: *Fertil Steril.* 2014 Sep;102(3):908. PMID: 24825428.

Hart RJ. Use of Growth Hormone in the IVF Treatment of Women With Poor Ovarian Reserve. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Jul 24;10:500. doi: 10.3389/fendo.2019.00500. PMID: 31396160; PMCID: PMC6667844.

Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2006 Jan;12(1):19-25. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60975-3. PMID: 16454928.

Hazout A, Junca Am, Ménézo Y, Demouzon J, Cohen-Bacrie P. Effect of growth hormone on oocyte competence in patients with multiple IVF failures. *Reprod Biomed Online*. 2009 May;18(5):664-70. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60011-9. PMID: 19549445.

Heimark D, McAllister J, Lerner J. Decreased myo-inositol to chiro-inositol (M/C) ratios and increased M/C epimerase activity in PCOS theca cells demonstrate increased insulin sensitivity compared to controls. *Endocr J*. 2014;61(2):111-7. doi: 10.1507/endocrj.ej13-0423. Epub 2013 Nov 2. PMID: 24189751.

Herbert M, Kalleas D, Cooney D, Lamb M, Lister L. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr 1;7(4):a017970. doi: 10.1101/cshperspect.a017970. PMID: 25833844; PMCID: PMC4382745.

Homburg R, Eshel A, Abdalla HI, Jacobs HS. Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotrophins. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1988 Jul;29(1):113-7. doi: 10.1111/j.1365-2265.1988.tb00252.x. PMID: 3248352.

Hoque SAM, Kawai T, Zhu Z, Shimada M. Mitochondrial Protein Turnover Is Critical for Granulosa Cell Proliferation and Differentiation in Antral Follicles. *J Endocr Soc*. 2018 Dec 10;3(2):324-339. doi: 10.1210/js.2018-00329. PMID: 30652133; PMCID: PMC6330174.

*Jin M, Feng G, Zhu Y, Liu A. Effects of growth hormone supplementation in poor responders undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment. Int J Clin Exp Med. (2018) 11:6187–93. Available online at: [www.ijcem.com/ISSN:1940-5901/IJCEM0066673](http://www.ijcem.com/ISSN:1940-5901/IJCEM0066673)*

*Jin M, Yu Y, Huang H. An update on primary ovarian insufficiency. Sci China Life Sci. 2012 Aug;55(8):677-86. doi: 10.1007/s11427-012-4355-2. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22932883.*

*Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Louden ED, Schaffer JE, Moley KH. Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. Endocrinology. 2010 Aug;151(8):4039-46. doi: 10.1210/en.2010-0098. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20573727; PMCID: PMC2940512.*

*Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 2000 Nov;15(11):2390-3. doi: 10.1093/humrep/15.11.2390. PMID: 11056140.*

*Li XL, Wang L, Lv F, Huang XM, Wang LP, Pan Y, Zhang XM. The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2017 Mar;96(12):e6443. doi:*

10.1097/MD.00000000000006443. PMID: 28328856; PMCID: PMC5371493.

Lim J, Luderer U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 2011 Apr;84(4):775-82. doi: 10.1095/biolreprod.110.088583. Epub 2010 Dec 8. PMID: 21148108; PMCID: PMC3062040.

Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet.* 2004 Sep 4-10;364(9437):875-82. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16983-3. PMID: 15351195.

Ma L, Lu H, Chen R, Wu M, Jin Y, Zhang J, Wang S. Identification of Key Genes and Potential New Biomarkers for Ovarian Aging: A Study Based on RNA-Sequencing Data. *Front Genet.* 2020 Nov 16;11:590660. doi: 10.3389/fgene.2020.590660. PMID: 33304387; PMCID: PMC7701310.

Malter, H.E. Improving oocytes and embryos? Cytoplasmic manipulation in human reproduction. In *40 Years after In Vitro Fertilisation: State of the Art and New Challenges*; Tesarik, J., Ed.; Cambridge Scholars Publishing: Newcastle upon Tyne, UK, 2019; pp. 234–268.

*Mancini A, Di Segni C, Bruno C, Olivieri G, Guidi F, Silvestrini A, Meucci E, Orlando P, Silvestri S, Tiano L, Pontecorvi A. Oxidative stress in adult growth hormone deficiency: different plasma antioxidant patterns in comparison with metabolic syndrome. Endocrine. 2018 Jan;59(1):130-136. doi: 10.1007/s12020-017-1468-1. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29143180.*

*Marquard KL, Stephens SM, Jungheim ES, Ratts VS, Odem RR, Lanzendorf S, Moley KH. Polycystic ovary syndrome and maternal obesity affect oocyte size in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril. 2011 May;95(6):2146-9, 2149.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.10.026. Epub 2010 Nov 11. PMID: 21071018; PMCID: PMC3684964.*

*May-Panloup P, Boucret L, Chao de la Barca JM, Desquiret-Dumas V, Ferré-L'Hotellier V, Morinière C, Descamps P, Procaccio V, Reynier P. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. Hum Reprod Update. 2016 Nov;22(6):725-743. doi: 10.1093/humupd/dmw028. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27562289.*

*Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, Tesarik J. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. Hum Reprod. 1999 Mar;14(3):628-35. doi:*

10.1093/humrep/14.3.628. Erratum in: *Hum Reprod.* 2019 Mar 1;34(3):589. PMID: 10221687.

Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):1017-22. doi: 10.1093/humrep/17.4.1017. PMID: 11925399.

Mendoza N, Diaz-Ropero MP, Aragon M, Maldonado V, Llaneza P, Lorente J, Mendoza-Tesarik R, Maldonado-Lobon J, Olivares M, Fonolla J. Comparison of the effect of two combinations of myo-inositol and D-chiro-inositol in women with polycystic ovary syndrome undergoing ICSI: a randomized controlled trial. *Gynecol Endocrinol.* 2019 Aug;35(8):695-700. doi: 10.1080/09513590.2019.1576620. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30880505.

Mendoza N, Pérez L, Simoncini T, Genazzani A. Inositol supplementation in women with polycystic ovary syndrome undergoing intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Reprod Biomed Online.* 2017 Nov;35(5):529-535. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.07.005. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28756130.

Mendoza-Tesarik R, Tesarik J. Usefulness of individualized FSH, LH and GH dosing in ovarian stimulation of women with low ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2018 May 1;33(5):981-982. doi: 10.1093/humrep/dey063. PMID: 29596632.

*Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. Hum Reprod. 2001 Oct;16(10):2118-23. doi: 10.1093/humrep/16.10.2118. PMID: 11574502.*

*Mikhailova, A.A.; Shamanskyi, V.; Ushakova, K.; Mikhailova, A.G.; Oreshkov, S.; Knorre, D.; Tretiakov, E.O.; Zazhytska, M.; Lukowski, S.W.; Liou, C.-W.; et al. Risk of mitochondrial deletions is affected by the global secondary structure of the mitochondrial genome. bioRxiv 2020, 603282. [CrossRef]*

*Morgante G, Orvieto R, Di Sabatino A, Musacchio MC, De Leo V. The role of inositol supplementation in patients with polycystic ovary syndrome, with insulin resistance, undergoing the low-dose gonadotropin ovulation induction regimen. Fertil Steril. 2011 Jun 30;95(8):2642-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.035. Epub 2011 Feb 5. PMID: 21300338.*

*Morin SJ, Patounakis G, Juneau CR, Neal SA, Scott RT, Seli E. Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients <38 years old: a quantitative but not qualitative reduction in performance. Hum Reprod. 2018 Aug 1;33(8):1489-1498. doi: 10.1093/humrep/dey238. PMID: 30010882.*

*Mosher AA, Tsoulis MW, Lim J, Tan C, Agarwal SK, Leyland NA, Foster WG. Melatonin activity and receptor*

*expression in endometrial tissue and endometriosis. Hum Reprod.* 2019 Jul 8;34(7):1215-1224. doi: 10.1093/humrep/dez082. PMID: 31211323; PMCID: PMC6613342.

Naderpoor N, Shorakae S, de Courten B, Misso ML, Moran LJ, Teede HJ. *Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update.* 2015 Sep-Oct;21(5):560-74. doi: 10.1093/humupd/dmv025. Epub 2015 Jun 9. Erratum in: *Hum Reprod Update.* 2016 Apr;22(3):408-9. PMID: 26060208.

Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan G. *Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med.* 1999 Apr 29;340(17):1314-20. doi: 10.1056/NEJM199904293401703. PMID: 10219066.

Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. *The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. Hum Reprod.* 2004 Jul;19(7):1591-7. doi: 10.1093/humrep/deh258. Epub 2004 Jun 4. PMID: 15180981.

Owen EJ, West C, Mason BA, Jacobs HS. *Co-treatment with growth hormone of sub-optimal responders in IVF-ET. Hum Reprod.* 1991 Apr;6(4):524-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137372. PMID: 1918302.

Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, Walsh T, Lee MK, Malach D, Klevit RE, King MC, Levy-Lahad E. Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am J Hum Genet.* 2013 Apr 4;92(4):614-20. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.03.007. Epub 2013 Mar 28. PMID: 23541342; PMCID: PMC3617377.

Piomboni P, Focarelli R, Capaldo A, Stendardi A, Cappelli V, Cianci A, La Marca A, Luddi A, De Leo V. Protein modification as oxidative stress marker in follicular fluid from women with polycystic ovary syndrome: the effect of inositol and metformin. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Oct;31(10):1269-76. doi: 10.1007/s10815-014-0307-z. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25113619; PMCID: PMC4171408.

Piomboni P, Focarelli R, Capaldo A, Stendardi A, Cappelli V, Cianci A, La Marca A, Luddi A, De Leo V. Protein modification as oxidative stress marker in follicular fluid from women with polycystic ovary syndrome: the effect of inositol and metformin. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Oct;31(10):1269-76. doi: 10.1007/s10815-014-0307-z. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25113619; PMCID: PMC4171408.

Pizarro BM, Cordeiro A, Reginatto MW, Campos SPC, Mancebo ACA, Areas PCF, Antunes RA, Souza MDCB, Oliveira KJ, Bloise FF, Bloise E, Fortunato RS, Ortiga-Carvalho TM. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During *in vitro* Fertilization. *J Endocr Soc.*

2020 Jun 1;4(7):bvaa064. doi: 10.1210/jendso/bvaa064. PMID: 32666010; PMCID: PMC7326473.

Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*. 2015 Nov-Dec;21(6):787-808. doi: 10.1093/humupd/dmv036. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26243799; PMCID: PMC4594617.

R Core Team, 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Arfuso F, Dharmarajan A. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil Steril*. 2018 Dec;110(7):1298-1310. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.018. PMID: 30503129.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod*. 2002 Jul;17(7):1852-5. doi: 10.1093/humrep/17.7.1852. PMID: 12093851.

Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI

*outcome. Fertil Steril. 2008 Nov;90(5):1692-700. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.024. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18249393.*

*Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. Hum Reprod Update. 2011 Jan-Feb;17(1):34-45. doi: 10.1093/humupd/dmq029. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20639518; PMCID: PMC3001337.*

*Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency. Clin Genet. 2017 Feb;91(2):183-198. doi: 10.1111/cge.12921. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27861765.*

*Rossi-Ferragut LM, Iaconelli A Jr, Aoki T, Rocha CC, dos Santos DR, Pasqualotto FF, Borges E Jr. Pronuclear and morphological features as a cumulative score to select embryos in ICSI (intracytoplasmic sperm injection) cycles according to sperm origin. J Assist Reprod Genet. 2003 Jan;20(1):1-7. doi: 10.1023/a:1021286119979. PMID: 12656060; PMCID: PMC3455800.*

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

*Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of*

*intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1997 Jun;12(6):1267-70. doi: 10.1093/humrep/12.6.1267. PMID: 9222015.*

*Shoham Z, Homburg R, Owen EJ, Conway GS, Ostergaard H, Jacobs HS. The role of treatment with growth hormone in infertile patients. Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 1992 Jun;6(2):267-81. doi: 10.1016/s0950-3552(05)80086-0. PMID: 1424324.*

*Smith HL, Stevens A, Minogue B, Sneddon S, Shaw L, Wood L, Adeniyi T, Xiao H, Lio P, Kimber SJ, Brison DR. Systems based analysis of human embryos and gene networks involved in cell lineage allocation. BMC Genomics. 2019 Mar 5;20(1):171. doi: 10.1186/s12864-019-5558-8. PMID: 30836937; PMCID: PMC6399968.*

*Sortino MA, Salomone S, Carruba MO, Drago F. Polycystic Ovary Syndrome: Insights into the Therapeutic Approach with Inositols. Front Pharmacol. 2017 Jun 8;8:341. doi: 10.3389/fphar.2017.00341. PMID: 28642705; PMCID: PMC5463048.*

*Suikkari A, MacLachlan V, Koistinen R, Seppälä M, Healy D. Double-blind placebo controlled study: human biosynthetic growth hormone for assisted reproductive technology. Fertil Steril. 1996 Apr;65(4):800-5. doi: 10.1016/s0015-0282(16)58217-x. PMID: 8654642.*

*Tachibana M, Kuno T, Yaegashi N. Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. Reprod Med Biol. 2018 Sep 19;17(4):421-433. doi: 10.1002/rmb2.12230. PMID: 30377395; PMCID: PMC6194288.*

*Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, Tamura I, Maekawa R, Sato S, Taketani T, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. Int J Mol Sci. 2020 Feb 8;21(3):1135. doi: 10.3390/ijms21031135. PMID: 32046301; PMCID: PMC7036809.*

*Tang R, Yu Q. Novel variants in women with premature ovarian function decline identified via whole-exome sequencing. J Assist Reprod Genet. 2020 Oct;37(10):2487-2502. doi: 10.1007/s10815-020-01919-y. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32789750; PMCID: PMC7550486.*

*te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. Hum Reprod Update. 2002 Mar-Apr;8(2):141-54. doi: 10.1093/humupd/8.2.141. PMID: 12099629.*

*Tesarik J, Galán-Lázaro M, Conde-López C, Chiara-Rapisarda AM, Mendoza-Tesarik R. The Effect of GH Administration on Oocyte and Zygote Quality in Young Women With Repeated Implantation Failure After IVF. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Sep 29;11:519572. doi:*

10.3389/fendo.2020.519572. PMID: 33117271; PMCID: PMC7552188.

Tesarik J, Galán-Lázaro M. Clinical scenarios of unexplained sperm DNA fragmentation and their management. *Transl Androl Urol.* 2017 Sep;6(Suppl 4):S566-S569. doi: 10.21037/tau.2017.03.70. PMID: 29082179; PMCID: PMC5643676.

Tesarik J, Galán-Lázaro M. Clinical scenarios of unexplained sperm DNA fragmentation and their management. *Transl Androl Urol.* 2017 Sep;6(Suppl 4):S566-S569. doi: 10.21037/tau.2017.03.70. PMID: 29082179; PMCID: PMC5643676.

Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999 May;14(5):1318-23. doi: 10.1093/humrep/14.5.1318. PMID: 10325285.

Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Hum Reprod.* 2005 Sep;20(9):2536-41. doi: 10.1093/humrep/dei066. Epub 2005 Apr 28. PMID: 15860489.

Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Hum Reprod.* 2005

Sep;20(9):2536-41. doi: 10.1093/humrep/dei066. Epub 2005 Apr 28. PMID: 15860489.

*Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. Hum Reprod. 2000 Jun;15(6):1396-9. doi: 10.1093/humrep/15.6.1396. PMID: 10831576.*

*Tesarik J, Mendoza C. Effects of exogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and developmental competence. Hum Reprod. 2002 Dec;17(12):3129-37. doi: 10.1093/humrep/17.12.3129. PMID: 12456612.*

*Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. J Clin Endocrinol Metab. 1995 Apr;80(4):1438-43. doi: 10.1210/jcem.80.4.7714121. PMID: 7714121.*

*Tesarik J, Mendoza-Tesarik R. New criteria for the use of growth hormone in the treatment of female infertility. EC Gynaecol. (2020) 9.3:01–4. 10.1002/14651858.CD000547.pub2*  
[

*Tesarik J, Nagy ZP, Mendoza C, Greco E. Chemically and mechanically induced membrane fusion: non-activating methods*

for nuclear transfer in mature human oocytes. *Hum Reprod.* 2000 May;15(5):1149-54. doi: 10.1093/humrep/15.5.1149. PMID: 10783368.

Tesarik J, Yovich JL, Menezo Y. Editorial: Growth Hormone in Fertility and Infertility: Physiology, Pathology, Diagnosis and Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jan 28;12:621722. doi: 10.3389/fendo.2021.621722. PMID: 33584552; PMCID: PMC7876381.

Tesarik J. Customized assisted reproduction enhancement (CARE) for women with extremely poor ovarian reserve (EPOR). *J Gynecol Women's Health*. (2017) 3:555625 10.19080/JGWH.2017.03.555625

Tesarik J. Oocyte spindle transfer for prevention of mitochondrial disease: the question of membrane fusion technique. *Reprod Biomed Online*. 2017 Oct;35(4):432. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.05.014. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28739334.

Tesarik, J. Customized assisted reproduction enhancement (CARE) for women with extremely poor ovarian reserve (EPOR). *J. Gynecol. Women Health* 2017, 3, 555625. [CrossRef]

Tesarik, J. Forty years of in vitro fertilisation: A history of continuous expansion. In *40 Years after In Vitro Fertilisation: State of the Art and New Challenges*; Tesarik, J., Ed.;

*Cambridge Scholars Publishing: Newcastle upon Tyne, UK, 2019; pp. 1–24.*

*Tesarik, J. Melatonin attenuates growth factor receptor signaling required for SARS-CoV-2 replication. Melatonin Res. 2020, 3, 534–537. [CrossRef]*

*Tesarik, J.; Kopecný, V.; Plachot, M.; Mandelbaum, J. Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy. Dev. Biol. 1988, 128, 15–20. [CrossRef]*

*Tesarik, J.; Mendoza-Tesarik, R. Melatonin: The first noninvasive causal therapy for both endometriosis and adenomyosis? J. Gynecol. Women's Health 2018, 12, 555829. [CrossRef]*

*Tesarik, J.; Mendoza-Tesarik, R. New criteria for the use of growth hormone in the treatment of female infertility: Minireview and a case series. EC Gynaecol. 2020, 9, 1–4.*

*Tesarík J, Kopecný V, Plachot M, Mandelbaum J. Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro. J Reprod Fertil. 1986 Nov;78(2):463-70. doi: 10.1530/jrf.0.0780463. PMID: 2433438.*

*Tesarík J. Involvement of oocyte-coded message in cell differentiation control of early human embryos. Development.*

1989 Feb;105(2):317-22. doi: 10.1242/dev.105.2.317. PMID: 2806129.

Turan V, Oktay K. BRCA-related ATM-mediated DNA double-strand break repair and ovarian aging. *Hum Reprod Update*. 2020 Jan 1;26(1):43-57. doi: 10.1093/humupd/dmz043. PMID: 31822904; PMCID: PMC6935693.

Wang S, Zheng Y, Li J, Yu Y, Zhang W, Song M, Liu Z, Min Z, Hu H, Jing Y, He X, Sun L, Ma L, Esteban CR, Chan P, Qiao J, Zhou Q, Izpisua Belmonte JC, Qu J, Tang F, Liu GH. Single-Cell Transcriptomic Atlas of Primate Ovarian Aging. *Cell*. 2020 Feb 6;180(3):585-600.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.009. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32004457.

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*. 1997 Aug;12(8):1750-5. doi: 10.1093/humrep/12.8.1750. PMID: 9308806.

Xu Y, Nisenblat V, Lu C, Li R, Qiao J, Zhen X, Wang S. Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Mar 27;16(1):29. doi: 10.1186/s12958-018-0343-0. PMID: 29587861; PMCID: PMC5870379.

Xue-Mei W, Hong J, Wen-Xiang Z, Yang L. The effects of growth hormone on clinical outcomes after frozen-thawed

*embryo transfer. Int J Gynaecol Obstet. 2016 Jun;133(3):347-50. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.10.020. Epub 2016 Mar 9. PMID: 27101995.*

Yovich JL, Regan SLP, Zaidi S, Keane KN. *The Concept of Growth Hormone Deficiency Affecting Clinical Prognosis in IVF. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 Oct 4;10:650. doi: 10.3389/fendo.2019.00650. PMID: 31636602; PMCID: PMC6788257.*

Yovich JL, Stanger JD. *Growth hormone supplementation improves implantation and pregnancy productivity rates for poor-prognosis patients undertaking IVF. Reprod Biomed Online. 2010 Jul;21(1):37-49. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.03.013. Epub 2010 Apr 2. Erratum in: Reprod Biomed Online. 2011 Jan;22(1):100. PMID: 20457541.*

Zhang J, Liu H, Luo S, Lu Z, Chávez-Badiola A, Liu Z, Yang M, Merhi Z, Silber SJ, Munné S, Konstantinidis M, Wells D, Tang JJ, Huang T. *Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. Reprod Biomed Online. 2017 Apr;34(4):361-368. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.01.013. Erratum in: Reprod Biomed Online. 2017 Jul;35(1):49. Konstantinidis, Michalis [corrected to Konstantinidis, Michalis]. Erratum in: Reprod Biomed Online. 2017 Dec;35(6):750. PMID: 28385334.*

Zheng W, Gorre N, Shen Y, Noda T, Ogawa W, Lundin E, Liu K. *Maternal phosphatidylinositol 3-kinase signalling is crucial for embryonic genome activation and preimplantation embryogenesis. EMBO Rep. 2010 Nov;11(11):890-5. doi:*

10.1038/embor.2010.144. Epub 2010 Oct 8. PMID: 20930845; PMCID: PMC2966953.

Zheng W, Liu K. The emerging role of maternal phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling in manipulating mammalian preimplantation embryogenesis. *Cell Cycle*. 2011 Jan 15;10(2):178-9. doi: 10.4161/cc.10.2.14475. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21239876.

Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jun 5;356(1-2):24-30. doi: 10.1016/j.mce.2011.05.027. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21684319.