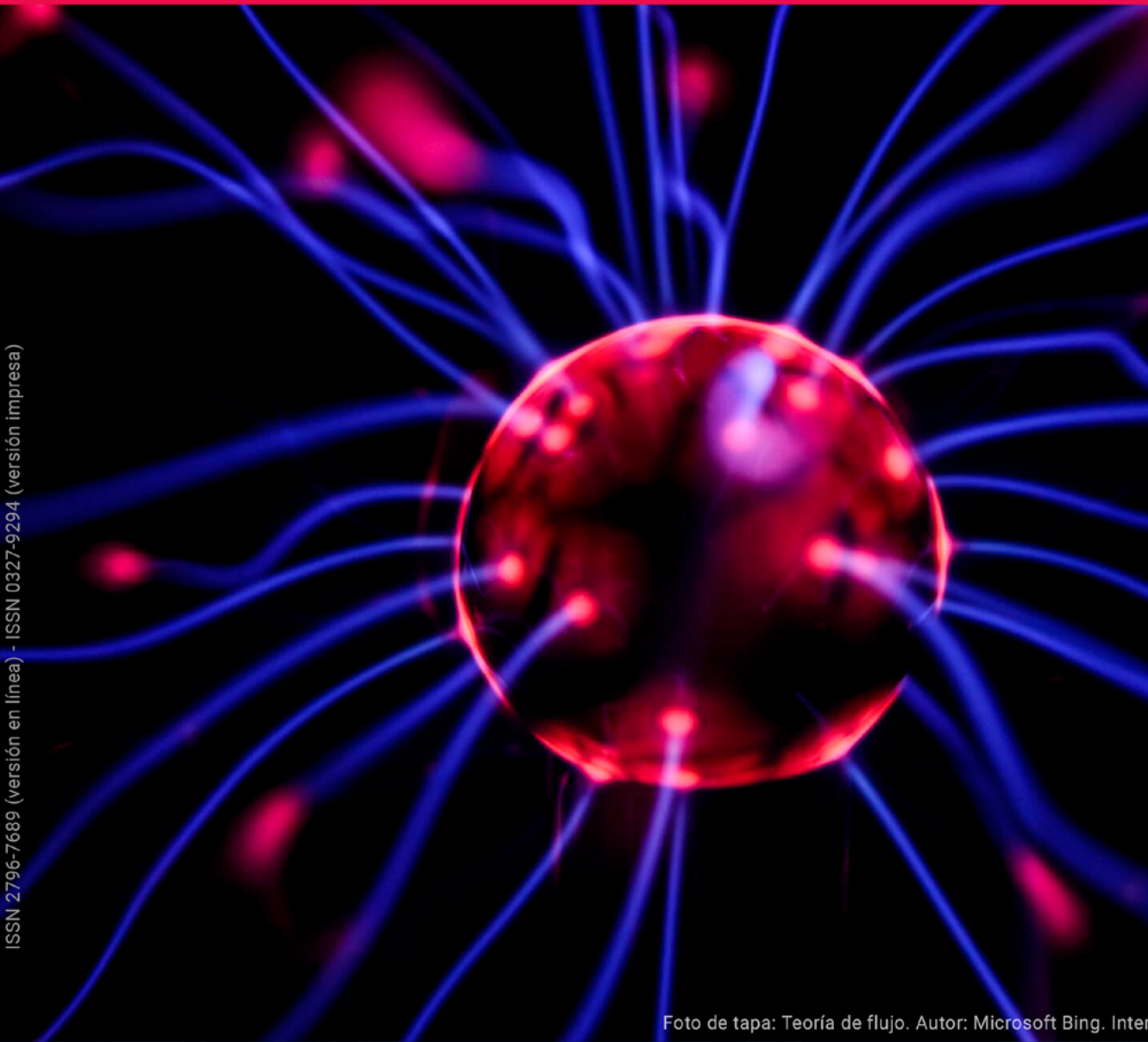


Reproducción

Órgano oficial de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva
y de la Sociedad Argentina de Embriología Clínica

Volumen: 37 / Año 2023 / N°1



ISSN 2796-7689 (versión en línea) - ISSN 0327-9294 (versión impresa)

Foto de tapa: Teoría de flujo. Autor: Microsoft Bing. Inter

Editora en Jefe: Prof. Dra. Serpa, Idelma - MD - PhD - Médica Ginecóloga especialista en Medicina Reproductiva; Miembro Comisión Directiva Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (SAMeR).

SYLVESTRE BEGNIS, ROSARIO – MD - Médica Tocoginecóloga especialista en Medicina Reproductiva (SAMeR), Staff de medicina reproductiva Instituto Gamma, Rosario.

LIMA, NATACHA SALOMÉ - Lima, Natacha Salomé - Psci. - Mg. - PhD – Psicóloga orientada en Reproducción Humana y Fertilización Asistida SAMeR; Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); Docente de la Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires.

BELTRAMONE, FERNANDO – MD - Médico Tocoginecólogo, especialista en Medicina Reproductiva y Cirugía videoasistida; Director Médico Centro Ovum, Córdoba.

BOTTI, GUSTAVO - MD – Médico Ginecólogo, especialista en Medicina Reproductiva, Ex Presidente de la Asociación de Obstetricia y Ginecología de Rosario (ASOGIR), Ex Presidente de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (SAMeR), Integrante del Programa de Asistencia Reproductiva de Rosario (PROAR).

GELLER, MARISA – MD – Médica Ginecóloga y Obstetra, especialista en Medicina Reproductiva y Endocrinología Ginecológica, Docente Facultad de Medicina, Universidad Favaloro, Directora Médica In Vitro Buenos Aires.

IRIGOYEN, MARCELA – MD – Médica especialista en Ginecología, Medicina Reproductiva y Endocrinología ginecológica y de la Reproducción, Co-Directora Médica de Fertilis Medicina Reproductiva.

LIMA, NATACHA SALOMÉ – Psci. – Mg. – PhD – Psicóloga orientada en Reproducción Humana y Fertilización Asistida SAMeR; Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); Docente de la Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires.

Editora asociada: Sícara, Laura - Médica especialista en Tocoginecología, Medicina Reproductiva, Endocrinología y Genética de la Reproducción, IFER; Coordinadora Departamento de Genética de la Reproducción, IFER; Docente adscripta de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

MACHADO, CARMEN - MD - Médica Ginecóloga y Obstetra, especialista en Medicina Reproductiva, Centro CRECER Mar del Plata, Docente Salud Integral de la mujer, Universidad Nacional de Mar del Plata.

MANNARA, JUAN IGNACIO – MD – Médico Asociado a Procreatee.

MARTÍNEZ, MARCELO – MD – Médico especialista en Tocoginecología y Reproducción Humana, Procreatee; Director Médico Centro Médico Larrea, Bs. As.

MOLINA, SONIA - MD - Médica especialista en Tocoginecología y Medicina Reproductiva, Jefe de Sección Medicina Reproductiva Hospital Rawson San Juan. Presidente de la Regional Cuyo SAMeR.

MORENO, DIEGO – Lic – Bioquímico, miembro de SAEGRE, SAMeR. Embriólogo Clínico Senior SAEC-SAMeR. Director de Laboratorio de Medicina Reproductiva de Sanatorio Argentino San Juan, Docente de la EIDFS, UNSJ.

NOTRICA, JUDITH – Lic – Licenciada en Ciencias Biológicas especialista en Biología Molecular. Embrióloga Clínica Senior. Coordinadora de Estudios Clínicos, FefyM. Miembro de SAMeR y SAEC.

PASQUALINI, AGUSTÍN – MD – Ginecólogo especialista en Medicina Reproductiva y Director Médico, Halitus Instituto Médico de Buenos Aires; Secretario del Consejo de Formación y Evaluación Profesional (COFEP), SAMeR; Miembro Comisión Directiva SAMeR.

PESCE, ROMINA - MD - MSc - Médica Ginecóloga especialista en Medicina Reproductiva, Servicio de Ginecología Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA); Jefa de Sección

Reproducción y Responsable Unidad Preservación de Fertilidad, HIBA; Docente Autorizada Obst/Ginecología, Universidad de Buenos Aires; Prof. Adjunta Ginecología, Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires; Directora Fellowship en Medicina Reproductiva, (SAMeR sede HIBA); Miembro Comisión Directiva SAMeR.

SÍCARO, LAURA - MD - Médica especialista en Tocoginecología, Medicina Reproductiva, Endocrinología y Genética de la Reproducción, IFER; Coordinadora Departamento de Genética de la Reproducción, IFER; Docente adscripta de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

SYLVESTRE BEGNIS, ROSARIO – MD - Médica Tocoginecóloga especialista en Medicina Reproductiva (SAMeR), Staff de medicina reproductiva Instituto Gamma, Rosario.

TORRES MONSERRAT, VALENTINA - Lic – Licenciada en Biotecnología- UNR, Especialista en Embriología Clínica, SAMeR. Directora del Laboratorio de Embriología y Andrología de Fertya Medicina Reproductiva, Grupo Oroño, Rosario. Miembro del la Comisión de educación de SAEC.

VENTURA, VIVIANA - MD - Médica Tocoginecóloga, especialista en Medicina Reproductiva, Jefa de Servicio de Medicina Reproductiva de Grupo Gamma, Rosario.

Revisores

ÁLVAREZ SEDO, CRISTIAN - Lic. – PhD – Director Laboratorio de Embriología FERTILIA y Director Científico FERTILIA, Tucumán, Miembro Comisión Directiva SAMeR.

AVENDAÑO, CONRADO - Bioq. – PhD – Director ANDROLAB; Coordinador del Laboratorio de Reproducción Humana, Gynesis Salud y Fertilidad, Córdoba.

BAUM, EUGENIA – MD – Médica especialista en Medicina Reproductiva.

BONILLA, FEDERICO - Bioq. – PhD – Director Laboratorio de Embriología, Instituto de Maternidad y Ginecología “Ntra. Señora de la Merced”; Director Laboratorio de Embriología, Centro Médico Reproducir; Profesor Adjunto, Cátedra de Biología de Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (UNT); Docente-Investigador, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), Tucumán.

CERISOLA, VALERIA - MD – Médica especialista en Medicina Reproductiva. Asociada al Servicio de Ginecología del Hospital Italiano de Buenos Aires, Sección Reproducción- Patología Benigna-Cirugía Miniinvasiva; Docente del Curso Superior BIANUAL de Medicina Reproductiva, SAMeR.

CULLERE, MARCELA – Bióloga. PhD en Ciencias Biológicas. Embrióloga de staff en Nascentis. Coordinadora del área de investigación de Nascentis. Miembro de ESHRE, SAMER Y SAEC

DOPAZO, HERNÁN - PhD – Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Madrid, Director Científico de Biocódices S.A. Investigador Independiente CONICET. Profesor FCEyN Universidad de Buenos Aires.

FIZSBAJN, GABRIEL – MD – Médico especialista en Medicina Reproductiva, Director Asociado de CEGYR, Miembro Comisión Directiva SAMeR.

GALLARDO, TREJO LUIS – Lic – Especialista en Biología de la Reproducción RedLARA, Director Laboratorio FIV C.M.R. FILIUS. San Luis Potosí, México.

HERNÁNDEZ, MARIANA - Biol – Especialista en Embriología Clínica y Co-Directora Laboratorio de Embriología CIGOR, Córdoba.

LORENZO, FABIÁN – MD – Médico Ginecólogo especialista en Medicina Reproductiva; Miembro Comisión Directiva SAMeR; Director General de Regionales SAMeR; Docente

Adscripto a la Catedra de Ginecología de la Universidad de Bs As (UBA); Miembro de ES-HRE, SAMeR, AAGL; IFER, Bs As.

MARTÍNEZ, GUSTAVO – Phd - Doctor En Ciencia Biológicas – UBA, especialista en Embriología Clínica – SAMeR – RedLaRA, Director del Laboratorio de Biología de la Reproducción de Fertilis, San Isidro, Profesor de la Universidad de Belgrano, Expresidente de SAMeR, Director del Comité de Acreditaciones SAMeR, Vicepresidente de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida.

NAVÉS, FLAVIA – Psi – Doctora en Psicología, UCES. Licenciada en psicología, UBA. Jefa de trabajos prácticos en la Práctica Profesional 824 y Docente de la Cátedra I de psicología, ética y derechos humanos, Facultad de Psicología, UBA. Docente posgrados, UNSAM y UB. Investigadora UBACyT. Presidente de la Sociedad Argentina de Psicología en Reproducción Humana Asistida.

NICOTRA, PAMELA - MD – Médica especialista en Medicina Reproductiva Staff, CEGYR - Eugin; Coordinadora Médica, Novagen; Docente Curso Bianual de Medicina Reproductiva, SAMeR.

PAZ, VALERIA – Lic – Bioquímica, Especialista en Embriología Clínica, SAMeR y Red-LaRA. Technical supervisor in Embryology, American Board of Bioanalysis, (ABB). Jefa

del Laboratorio de Embriología del Servicio de Medicina Reproductiva del Instituto Gamma, Rosario.

PABLETICH, FLORENCIA – MD - Médica Pediatra, especialista en Genética Médica, Miembro del equipo médico de CIGOR, Médica Staff del Servicio de Genética Médica del Hospital Privado Universitario de Córdoba.

PELLETAN, LEONARDO – Lic - Doctor en Ciencias Biológicas. Director del laboratorio de FIV en el Instituto de Medicina Reproductiva de Mendoza. Miembro de SAEC.

SDRIGOTTI, AGUSTINA – MD – Médica especialista en Medicina Reproductiva, Asociada a Procreate.

VAN THILLO, GERMÁN – MD – Médico especialista en Medicina Reproductiva.

ZEITLER, ELENA – MD - Médica de planta Hospital de Clínicas José de San Martín- Sección Fertilidad, Jefa de Trabajos Prácticos de Ginecología. Unidad Académica Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

ZITTA, MARCELA – MD – Doctora en Medicina y Cirugía; Especialista en Tocoginecología y Medicina Reproductiva, Médica Staff Gynesis, Córdoba.

REVISTA ARGENTINA DE REPRODUCCIÓN

Instrumento de la comunicación científica

La Revista Argentina de Reproducción Humana tiene su debut en el año 1992, de la mano del Dr. Roberto Tozzini como presidente de la Sociedad Argentina de Medicina reproductiva. Su tiraje fue bianual en sus inicios, alcanzando desde el 2008, 4 números anuales. La última gestión editorial estuvo a cargo de la Dra. Silvia Ciarmatori y la Licenciada Alicia Pené, quienes fueron responsables de la revista hasta el primer número del corriente año.

A partir del 2020 nace la necesidad de reestructurar el perfil de la revista, renovando su contenido y aumentando los estándares de calidad con el propósito de su indexación. El objetivo será adaptarla a un formato más económico, sustentable y moderno, que estimule y promueva un nuevo vínculo con el lector. Se dejará atrás el formato papel para pasar a uno completamente digital y de libre acceso.

La revista contará con un 80% de artículos originales de alta calidad científica, disponibles en idioma español e inglés, con una periodicidad semestral. Su contenido estará dirigido al profesional de la salud relacionado a la Reproducción Humana, como así también a la comunidad científica en general.

El objetivo primordial de la Revista será difundir el conocimiento científico, a través de trabajos originales producto de investigación básica, investigación clínica, y revisiones bibliográficas que impacten en el área médica, biológica, psicológica y otras áreas afines a la fertilidad. La meta será posicionar a la Revista Argentina de Reproducción como un espacio de producción nacional e internacional, que promueva la convocatoria y participación de investigadores, como así también la cooperación científica interdisciplinaria, manteniendo siempre los estándares que reflejen la esencia de la Sociedad.

Índice

EDITORIAL	Problemas actuales y futuras soluciones de la investigación científica en salud <i>Dra. Idelma Serpa</i>	8
INFERTILIDAD	Condicionamiento de la receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes de implantación en fertilización <i>in vitro</i> <i>M Irigoyen</i>	10
ANDROLOGÍA	Descenso brusco de peso en varones jóvenes sometidos a cirugía bariátrica: impacto sobre la función reproductiva <i>MC Craia; C Massoni; M Vicentin; M Grimoldi; R Martinelli; A Caille; R Tioni; A Marcolini; D Awruch; MJ Svetaz; M Posadas; MJ Munuce</i>	25
CIRUGÍA REPRODUCTIVA	Rol de la laparoscopia diagnóstica en las pacientes con aparente infertilidad inexplicada <i>G Botti; L Solari.</i>	40
INFERTILIDAD	Inyección de plasma rico en plaquetas intraovárico en pacientes pobres respondedoras <i>L Devenuto; G Rey Valzacchi; M Ercolano; O Etchegoyen</i>	48
CIENCIAS SOCIALES Y HUMANAS EN REPRODUCCIÓN	Genética y filiación. Un caso clínico de donación intrafamiliar <i>MV Stelluto</i>	60
INFERTILIDAD	Efecto de la suplementación de progesterona en ciclos de transferencia embrionaria con preparación endometrial artificial y niveles bajos de progesterona <i>D Tonelli; P Perfumo; V Ventura; L Domenech; M Parolin; R Sylvestre Begnis; Paula Hovanyecz</i>	66

Problemas actuales y futuras soluciones de la investigación científica en salud



Dra. Idelma Serpa
Editora en Jefe
Revista Reproducción
SAMeR

Hacer investigación científica en general, y en salud en particular, no ha sido nunca una tarea fácil. Muchos son los problemas asociados al diseño y ejecución de proyectos de investigación: la falta de remuneración económica en los medios privados, la disminución del número y monto de subsidios en el ámbito público, la falta de organización de registro de datos, la falta de formación científica.

En nuestro país, se vuelve particularmente dificultoso gestionar el tiempo para dedicarle a la investigación. Dada la escasez de salarios del personal de salud, crisis actual, el tiempo disponible debe repartirse entre el asistencialismo – fuente de ingresos- y la investigación – no remunerada-, por lo que

investigar se vuelve una tarea casi imposible. En este contexto actual, surgen perspectivas futuras alentadoras. Por ejemplo, la posibilidad de acceso a información almacenada en grandes cantidades disponible para su análisis (*“big data”*), permitirá que múltiples usuarios puedan acceder a estos datos interconectados desde cualquier parte, en vez de manejar una base de datos limitada a una sola institución. Otro ejemplo está asociado al avance en inteligencia artificial (IA) en el procesamiento del lenguaje natural para la obtención de datos directamente desde la historia clínica electrónica. Esta técnica tiene como objetivo principal la transformación de manera automática del texto libre en información estructurada, generando nuevas capas de conocimiento, de manera que se facilite la clasificación o fenotipado de los pacientes en distintos grupos, en función del contenido escrito por los profesionales.

Además, se podrán incluir nuevos modelos de ensayos clínicos con la incorporación de las hipótesis generadas a partir del análisis de grandes cantidades de datos y número de participantes, muchas veces una limitación metodológica, la cual no dependerá de una sola institución, sino que se trabajará en modelos multicéntricos.

Así, en función de los registros en la historia clínica sobre el perfil clínico,

molecular, de riesgo debido a exposición a factores ambientales y del conocimiento biomédico, síntomas y signos, el sistema podrá proporcionar recomendaciones terapéuticas personalizadas y adaptadas a la entidad clínica y molecular propia del paciente, avanzando así hacia la medicina personalizada de precisión y no teniendo que extrapolar los resultados de ciertas investigaciones a las realidades de nuestros pacientes, que no siempre son coincidentes con los participantes de la investigación de origen.

Por tanto, el uso conjunto de nuevas fuentes de datos y nuevas técnicas de

“Machine Learning” y *“Deep Learning”* (disciplinas de la IA), se intenta cambiar la práctica médica con la introducción de sistemas de apoyo a la decisión clínica, tendientes a mejorar la atención y contribuyendo al sostén de la investigación en el Sistema Sanitario.

Mientras tanto, debemos aunar esfuerzos para seguir publicando con pequeños y significativos aportes que podamos hacer, cada uno desde nuestro lugar, intentando sortear las dificultades económicas y de tiempo, que hoy nos condicionan para investigar.

Condicionamiento de la receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes de implantación en fertilización *in vitro*

Conditioning of endometrial receptivity in patients with recurrent in vitro fertilization failure

M Irigoyen¹; L Fernández²; E Soczewski²; MS Gori²; L Castagnola²; A Schafir²; G Martínez¹; C Pérez Leirós²; E Grasso²; R Ramhorst².

¹ FERTILIS Medicina Reproductiva. San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Inmunología Reproductiva y de la Fertilidad CONICET, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿La receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes de implantación (RIF) en tratamientos de fertilización *in vitro* está condicionada por alteraciones en el programa de decidualización?

Lo que se sabe: La decidualización de las células estromales endometriales involucra un espectro de cambios de los cuales dependerá la receptividad endometrial.

Respuesta resumida: Las pacientes con RIF presentan alteraciones en el programa de decidualización, en la respuesta inflamatoria asociada y en la adhesión del blastocisto.

Diseño del estudio: cuasi experimental controlado.

Materiales y Métodos: El análisis bioinformático integrado incluyó información de bases de datos públicas (Reactome, Gene Ontology, WikiPathways, KEGG, GEO) y el Software Gephi para el armado de las redes de genes asociados al proceso de decidualización. Como modelo *in vitro* de

ABSTRACT

Study question: *Is the endometrial receptivity in patients with recurrent implantation failures (RIF) conditioned by an alteration in the decidual program?*

What is known: *Decidualization of endometrial stromal cells involves a spectrum of changes from which endometrial receptivity arose.*

Summary answer: *Patients with RIF present alterations: in the decidualization program, in the associated inflammatory response and in the adhesion of the blastocyst.*

Study design: *exploratory, prospective case-control type.*

Materials and Methods: *The integrated bioinformatic analysis included information from public databases (Reactome, Gene Ontology, WikiPathways, KEGG, GEO) and used Gephi Software for the assembly of the networks. The HESC (Human endometrial stromal cells) cell line was used as an *in vitro* model of decidualization, and *ex vivo*,*

decidualización se usó la línea celular HESC (Human Endometrial Stromal Cells) y ex vivo, biopsias de endometrio de mujeres con RIF y fértiles. Los genes IFGBP1, Prolactina, NLRP3 e ITGA8 fueron cuantificados por RT-qPCR; IL-1 β por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo.

Resultados: El análisis in silico de los procesos de decidualización, inflamación y regulación genética permitió identificar una red de genes que los conectan. En las células HESC decidualizadas se confirmó el aumento de la respuesta inflamatoria (activación del inflammasoma NLRP3 y de la producción de IL-1 β activa). En otro análisis bioinformático se encontró la expresión diferencial de genes a partir de arrays de pacientes con RIF y de pacientes fértiles. La validación en biopsias de endometrio de pacientes con RIF, mostró una expresión disminuida significativamente de IFGBP1 y prolactina, NLRP3 e ITGA8 (integrina involucrada en la adhesión del blastocisto) comparado con la expresión de estos genes de pacientes fértiles.

Limitaciones del estudio: Si bien los resultados fueron validados en muestras de endometrio se necesitan más estudios para dilucidar si estos mecanismos operan de manera similar in vivo.

Implicancias de los hallazgos: El entendimiento de alteraciones en el programa de decidualización aportaría a esclarecer la “memoria del endometrio”, un campo muy poco explorado aún.

Palabras clave: decidualización, inflamación, fallas recurrentes en las fertilizaciones in vitro.

endometrial biopsies from women with RIF and fertile. The IFGBP1, Prolactin, NLRP3 and ITGA8 genes were quantified by RT-qPCR; IL-1 β by intracytoplasmic labeling and flow cytometry.

Results: *The in-silico analysis of the processes of decidualization, inflammation and genetic regulation allowed us to identify a network of genes that connect them. In decidualized HESC cells, we confirmed the increase in the inflammatory response (activation of the NLRP3 inflammasome and the production of active IL-1 β). In another bioinformatic analysis we studied the differential expression of genes from arrays of patients with RIF. Validation in endometrial biopsies from patients with RIF showed significantly decreased expression of IFGBP1 and prolactin, NLRP3 and ITGA8 (integrin involved in blastocyst adhesion).*

Study limitations: *Although the results were validated in endometrial samples, further studies are needed to elucidate whether these mechanisms operate similarly in vivo.*

Implications of the findings: *The understanding of alterations in the decidualization program would contribute to clarify the “memory of the endometrium”, a field that has not yet been explored.*

Keywords: *decidualization, inflammation, recurrent implantation failures.*

INTRODUCCIÓN

La decidualización es un proceso celular esencial para la implantación del embrión y posterior establecimiento del embarazo⁽¹⁾. Este proceso involucra un espectro de cambios biomecánicos y transiciones bioquímicas de las células estromales que dependerán del contexto de señalización, dado tanto por las hormonas como por mediadores locales, para establecer un ambiente uterino receptivo⁽²⁾. La decidualización también se caracteriza por el crecimiento de las arterias espiraladas uterinas y la infiltración del estroma por leucocitos maternos que junto con la producción de inmunomoduladores, regularán la invasión del trofoblasto y la formación de una interfase materno-fetal⁽³⁾.

De lo expuesto se desprende que un inadecuado fenotipo decidual, inevitablemente generará complicaciones en la gestación, que dependiendo del grado de severidad, puede reflejarse en fallas reiteradas de implantación en las fertilizaciones *in vitro* (RIF del inglés: recurrent implantation failures), pérdidas recurrentes del embarazo o complicaciones asociadas con una placentación inadecuada como la preeclampsia^(4,5). Sin embargo, los mecanismos que llevan a las alteraciones de este proceso aún se desconocen.

Cuando el blastocisto entra en contacto con el epitelio uterino comienza un diálogo embrio-endometrial que mediará la implantación embrionaria⁽⁶⁾. Particularmente, la adhesión estable es el resultado de los cambios moleculares tanto en la superficie del trofoblasto como en la del endometrio. Esta adhesión entre células de orígenes distintos está mediada por la inducción de moléculas de adhesión en la superficie celular uterina durante la ventana de implantación, especialmente por las

integrinas, responsables de mediar uniones estables. Seguidamente, la capa más externa, el trofoblasto, comenzará un camino invasivo en la decidua permitiendo su inclusión en el endometrio⁽⁶⁾.

La generación de un microambiente inflamatorio durante la implantación embrionaria es crucial y por ello fisiológicamente se incrementan la expresión de la mayoría de las citoquinas inflamatorias⁽⁷⁾. Entre ellos, la familia de IL-1 y particularmente sus miembros IL-1 α e IL-1 β que se expresan tanto en el endometrio como en el blastocisto⁽⁸⁾. En cuanto a la relevancia de la IL-1 β , la expresión de esta citoquina está altamente preservada en primates y ha sido propuesta como uno de los mediadores en la viviparidad placentaria que aumenta la receptividad del endometrio^(9,10). Actualmente, la evidencia señala que la IL-1 β contribuye a la decidualización por varios mecanismos tales como: la inducción de integrinas; la producción del factor inhibidor de leucemia (LIF) y de leptina⁽⁴⁾ y la disociación de actina filamentosa en células estromales humanas⁽¹¹⁾.

En el presente trabajo nos propusimos realizar un análisis bioinformático integrado exploratorio utilizando bases de datos públicas para estudiar aquellos genes que interconectan el proceso de decidualización, con la respuesta inflamatoria estéril, implantación y placentación. A través de la validación de los resultados en un modelo *in vitro* de decidualización y *ex vivo*, utilizando biopsias de endometrio de pacientes con RIF y de mujeres fértiles. De este modo, se pretende aportar al conocimiento de los mecanismos involucrados en el condicionamiento de la receptividad endometrial así como sus alteraciones en pacientes con RIF.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio: experimental controlado *in vitro*.

Análisis bioinformático integrado

Se realizó una búsqueda en de las posibles vías de señalización o *pathways* involucrados en los procesos de decidualización, placentación, angiogénesis, inflamación y regulación inmune en bases de datos públicas (Reactome, Gene Ontology, Wikipathways y KEGG). De esta búsqueda se obtuvieron 32 *pathways*, los cuales fueron asociados a cada uno de los procesos anteriormente indicados. Posteriormente, se extrajeron los genes que forman parte de los *pathways*, manteniendo su asociación con cada proceso y eliminando duplicados. A partir de estos datos, se generaron las tablas de nodos (996 genes + 5 procesos) y aristas (1154) y se construyó la red usando Gephi. La forma de la red se obtuvo por el algoritmo ForcedAtlas2 a partir de una distribución aleatoria hasta autoestabilizarse. El tamaño de los nodos es proporcional al número de aristas recibidas.

En una segunda etapa, se buscaron *arrays* públicos en la base de datos GEO del NCBI. Se seleccionaron *arrays* de células endometriales con estímulos inflamatorios o de mujeres con RIF (GSE58144, GSE92324, GSE103465, GSE111974, GSE174689). Se extrajeron los genes que se modulaban significativamente ($p < 0.05$; $FDR < 0.25$) utilizando la plataforma *genePattern*, y se aplicó este resultado sobre los genes de la red indicando con color su modulación.

Cultivo celular

Las células HESC, línea celular de estroma endometrial humano, fueron cultivadas a 37°C y 5% CO₂ en 3ml de medio DMEM F12 *high glucose* (Invitrogen)

suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB, Natocord), antibióticos (PenStrepto, Invitrogen) y glutamina (Invitrogen) 20mM (medio completo). Las células crecieron en monocapa en botellas de 25 cm² (Botellas T25) y se reemplazó el medio cada 48 h en cabina de seguridad biológica de clase II hasta alcanzar un 80% de confluencia, momento en el cual se expandieron. Para ello, las células fueron tratadas con TrypLE® (GIBCO) por 2 a 5 minutos a 37°C para lograr despegarlas de la placa. A continuación, se suspendieron en medio completo y se sembró el 20% de las células en una placa nueva.

Protocolo de decidualización de células HESC

Las células HESC, cultivadas como se indicó previamente, fueron sembradas en placa de 24 pocillos (20.000 células/pocillo) y se estimularon con 2,5mM de dibutirilAMPc (dbAMPc, SIGMA) y 0,1uM de medroxiprogesterona (MPA, SIGMA). El tratamiento se realizó por 8 días renovando el 50% del medio y los estímulos cada 48 h. Pasados los 8 días de diferenciación las células fueron lavadas con medio completo y utilizadas para los diferentes ensayos. Las células no diferenciadas (control negativo) se mantuvieron con medio completo durante la misma cantidad de días.

Reclutamiento de pacientes y obtención de Biopsias de endometrio

Pacientes con fallas reiteradas en las fertilizaciones in vitro

Las pacientes fueron invitadas a participar en el presente protocolo de investigación y seleccionadas según los siguientes criterios de inclusión:

- Mujeres entre 25 y 42 años.
- Firma del consentimiento informado.

- Dos o más FIV previas fallidas con al menos 1 embrión en estadio de blastocisto de buena calidad transferidos en cada intento (Consenso Estambul), de tratamientos con óvulos propios o donados.
- Cavidad uterina normal, evaluada por histerosalpingografía, histeroscopia y/o ecografía transvaginal.
- FSH de fase folicular menor a 10UI y/o HAM > a 1 ng/ml .
- Conteo folículos antrales basal ≥ 10 (en uno o en los dos ovarios).
- TSH menor a 2,5 UI.
- Medicación concomitante permitida: metformina, ácido fólico, levotiroxina, sulfato ferroso, antioxidantes, vitamina E.
Criterios de exclusión:
- Pacientes con hidrosalpinx uni o bilateral
- Útero con adenomiosis.

Mujeres Fértiles (Grupo control)

Criterios de inclusión:

- Mujeres entre 25 y 42 años.
- Firma del consentimiento informado.
- Cavidad uterina normal, evaluada por ecografía transvaginal.
- TSH menor a 2,5 UI.
- Medicación concomitante permitida: metformina, ácido fólico, levotiroxina, sulfato ferroso, antioxidantes, vitamina E.
Criterios de exclusión:
- Que hayan tenido alguna pérdida de embarazo.
- Pacientes con hidrosalpinx uni o bilateral.
- Adenomiosis.

Se les ofreció participar en el grupo control de mujeres fértiles, a aquellas que hubieren optado como método anticonceptivo la utilización de Dispositivo Intrauterino (DIU). Se realizó la biopsia endometrial el mismo día y previo a la colocación del DIU.

Obtención de las muestras de endometrio

Las muestras de biopsias de endometrio fueron obtenidas en ambos grupos, en la fase secretoria del ciclo menstrual. Fueron realizadas al día + 6 del pico endógeno de LH, el cual fue medido por tiras reactivas de ovulación en orina (One Step MedNet GmbH, sensibilidad a la LH > a 20 mIU/ml) o por LH sérica era > a 15 mUI/ml. Para confirmar que las mujeres se encontraban en la fase secretoria del ciclo, se midieron además los niveles de progesterona en sangre periférica al momento de la toma de muestra. (Valor de Progesterona > 3 ng/ml)

Las biopsias fueron realizadas en consultorio, con la paciente en posición ginecológica y previa antisepsia del introito vaginal e intravaginal y colocación de espéculo. Se utilizó cureta de Novak o Pipelle de Cornier o cánula Endomete para realizar el procedimiento.

Las muestras endometriales obtenidas se colocaron en Trizol (Life Technologies) para su transporte y fueron remitidas al laboratorio donde se procesaron para la obtención de cDNA (ver RT-qPCR a continuación).

Las mismas fueron codificadas con 4 caracteres con 2 letras correspondientes a las iniciales de paciente y 2 números comenzando desde 01 hasta el 20 y siguiendo en forma consecutiva. La identidad de la paciente fue mantenida en confidencialidad durante el desarrollo del proyecto.

RT-qPCR

Las células recuperadas luego de los distintos tratamientos fueron resuspendidas en 500 μ l de Trizol (Life Technologies) y se procedió a realizar la extracción de ARN total siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se agregan 100 μ l de cloroformo, se incuban por 5

minutos y se centrifuga por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. El ARN, disuelto en la fase acuosa, se transfiere a un tubo nuevo y se precipita agregando 250 µl de isopropanol e incubando 10 min. Luego se centrifugó 10 min a 12.000 g a 4°C. Se lava el pellet con 500 µl de etanol 75% y se resuspende en 30 µl de agua libre de RNAsas. El ARN se cuantificó por espectrometría (Nano-Drop) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Para realizar el pasaje a DNA copia (ADNc) se utilizó 1 µg de ARN previamente incubado 10 min a 60°C y la mezcla de reacción (dNTPs 25 mM (Embitec), oligodT 5 ng/µl (Biodynamics), RT M-MLV 100 U, RNAsin 15 U y Buffer RT M-MLV 1X (Promega) hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 1 h y se detuvo incubando durante 10 min a 90°C. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su uso. La qPCR se realizó mezclando 2 µl de ADNc de cada muestra con los *primers* correspondientes (0,20 µM) y MasterMix (Roche) hasta un volumen final de 20 µl. La qPCR se realizó en un termociclador BioRad MyiQ2. Se utilizó un paso previo de desnaturalización por 5 min a 94°C antes del programa, un paso de lectura luego de cada paso de extensión y un paso de extensión final de 10 min a 72°C al final del programa. Los *primers* utilizados para amplificar las

distintas secuencias se describen en la Tabla 1. Se utilizaron los genes GAPDH y YWHAZ como genes *housekeeping*.

Inmunofluorescencia y análisis por Citometría de flujo

Las células cultivadas fueron recuperadas por tratamiento con TrypLE® y centrifugadas 1500 rpm por 5 minutos. Los pellets celulares obtenidos se resuspendieron y se realizó la marcación intracelular de IL-1β. Para ello las células se fijaron con Cytofix/Cytoperm durante 20 min a 4°C y posteriormente se permeabilizaron por lavado con solución Perm/Wash (ambos de BD Biosciences). El Ac anti IL-1β (PE BD Biosciences 340516) se incubó junto con el buffer de permeabilización durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el anticuerpo no pegado lavando en presencia de ese mismo buffer. El procedimiento se repitió para el Ac. secundario. Finalmente, las células se resuspendieron nuevamente en solución fijadora/permeabilizadora hasta su análisis por citometría de flujo. En forma paralela se realizó la marcación con el correspondiente control de isotipo. Finalmente, las muestras se analizaron en un Citómetro de Flujo FacsAria II (BD) y se adquirieron entre 10.000 y 50.000 eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa FlowJo® versión 7.6.2.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de ARNm mediante PCR. Se indica la secuencia sentido (S) y antisentido (AS) desde el extremo 5' a 3'.

Gen	Secuencia S	Secuencia AS
YWHAZ	CAGAGAGAAAATTGAGACGGAGC	GTGACTGATCGACAATCCCTTTC
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
NLRP3	TCAGACAGAGAAGGCAGACC	GGCATATCACAGTGGGATTTCG
ITGA8	TGGGAGTTTCTACTGGCAAGG	GCAGCAACTGAGTATCCAAGGT
IFGBP1	GAGCCCTGCCAATAGAACT	GATGTCTCACACTGTCTGCTG
Prolactina	TCATCTGGTCACGGAAGTACG	GTTTCAGGATGAACCTGGCTG

Análisis estadístico

En el caso de los ensayos que involucran líneas celulares se utilizó la prueba T de Student. En el caso de los ensayos donde se utilizaron muestras de pacientes, se realizó el test no paramétrico Mann-Whitney U-test. Se utilizó el software GraphPad Prism 9 (GraphPad software Inc) para realizar las pruebas estadísticas, considerando $p < 0.05$ como diferencia significativa.

Resultados

Análisis bioinformático integrado: interconexión de procesos asociados a la implantación.

Dada la complejidad de los procesos asociados a la implantación y formación de la interfase materno-placentaria y al gran número de genes asociados a los mismos, en primer lugar, se estudiaron los genes involucrados en integrar estos procesos. Para ello se realizó un análisis bioinformático que integra simultáneamente los procesos de decidualización, angiogénesis, placentación, inflamación y regulación genética. Se analizaron *pathways* estandarizados en bases de datos públicas como describió en Materiales y Métodos.

Posteriormente se obtuvo un listado con todos los genes que forman parte de los *pathways* y su relación con cada proceso. A partir de este listado, se generó la red usando el programa Gephi con los procesos como nodos representados en verdes y los genes como puntos rosados (ver figura 1A). Esta primera red cuenta con 994 genes.

Para restringir la lista de genes a estudiar, se realizó un nuevo análisis *in silico* a partir de bases de datos públicas, pero ahora en base a dos *arrays* en los que se comparaba la expresión de genes entre células estromales sin tratar o tratadas con un estímulo inflamatorio (TNF α ,

IFN γ +LPS). Se buscaron cuáles genes se modulaban diferencialmente y sobre la red anterior, se aplicó colores indicando si los genes se modulaban significativamente representados en rosa, o no, representados en celeste (Ver Figura 1B). Finalmente, de este análisis surge una lista de genes que corresponde a aquellos más relevantes que interconectan los procesos de angiogénesis, placentación, decidualización, Inflamación y regulación inmunológica (ver Figura 1C).

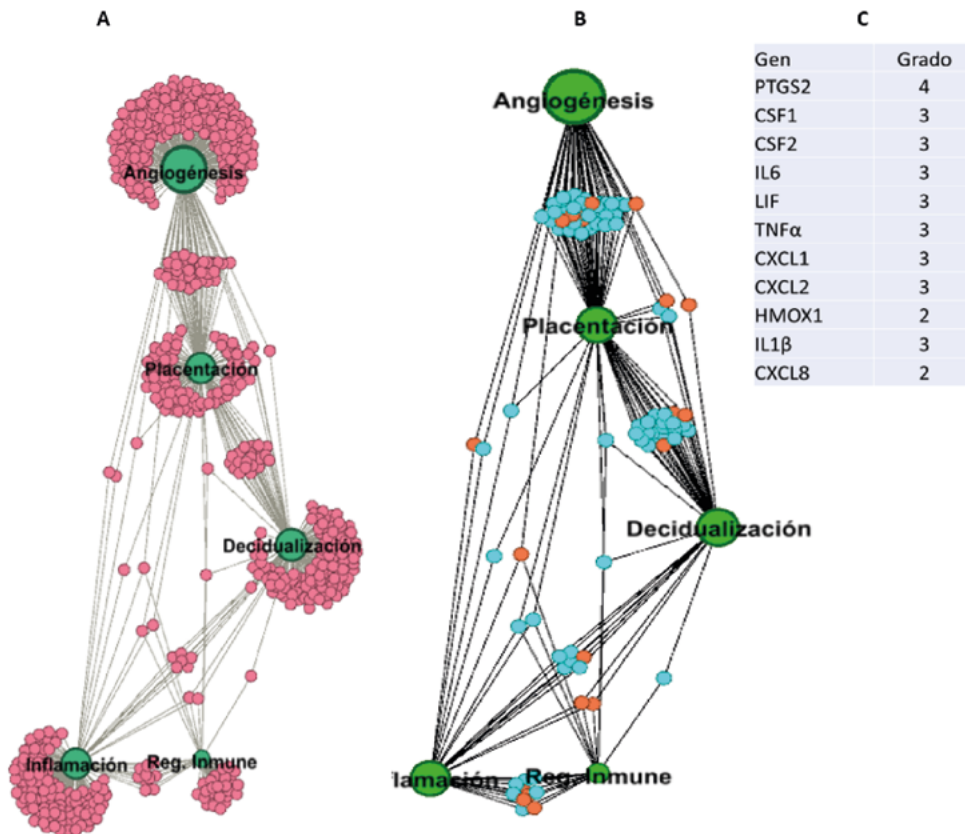
El programa de decidualización *in vitro* induce una respuesta inflamatoria estéril: producción de IL-1 β activa.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del análisis *in silico* y que la implantación se asocia a una respuesta pro inflamatoria estéril fisiológica, se investigó el mecanismo de activación que lleva a la producción de IL-1 β activa. Para ello se utilizó un modelo de decidualización *in vitro* basado en la línea celular HESC (Human Endometrial Stromal cells) previamente desarrollado en nuestro laboratorio y como se describió en la sección de Materiales y Métodos⁽¹²⁾.

Es importante aclarar que la producción de IL-1 β requiere la activación del inflammasoma para ser liberada en la forma activa. El inflammasoma es un complejo multiprotéico que es activado por un amplio rango de estímulos de diferentes fuentes y esta activación termina con la escisión y secreción de la forma activa de IL-1 β ⁽¹³⁾. La mayoría de los inflammasomas que se han descrito contienen una molécula sensora (la más estudiada es NLRP3), una proteína adaptadora y la caspasa-1, la cual es responsable de clivar la pro-IL-1 β a su forma activa IL-1 β .

Así, en primer lugar, nos enfocamos la expresión de NLRP3 y, como se observa

Figura 1. Análisis bioinformática integrado. A: Se analizaron *pathways* estandarizados en bases de datos públicas (Reactome, Gene Ontology, WikiPathways, KEGG, como se describió en Materiales y Métodos) que interconectan los procesos de angiogénesis, placentación, decidualización, Inflamación y regulación inmune. Se identificaron los genes que forman parte de los *pathways* y su relación con cada proceso. Con esta base se generó la red usando el programa Gephi con los procesos como nodos verdes y los genes como puntos rosados. La red cuenta con 994 genes y 1154 aristas. **B:** A partir de bases de datos públicas, se analizaron dos *arrays* de expresión comparando la expresión de genes entre células estromales sin tratar basales o tratadas con estímulo inflamatorio (TNF α , IFN γ +LPS). Los genes que se modulaban significativamente se muestran rosa, y los que no en celeste. Solo se muestran genes de grado 2 o mayor. **C:** Lista de genes relevantes en la red. El grado expresa en cuantos de los procesos (angiogénesis, placentación, decidualización, Inflamación y regulación genética) participa este gen.

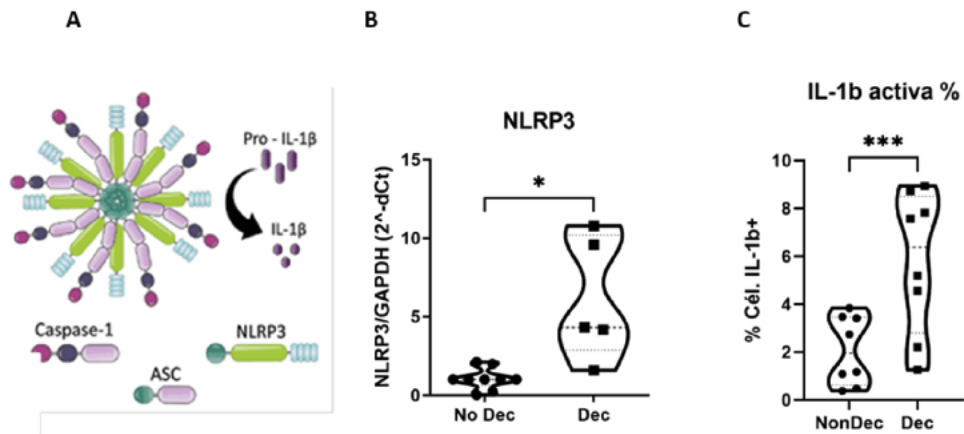


en la figura 2A, las células HESC al decidualizarse aumenta significativamente la expresión NLRP3 en comparación con las no decidualizadas. A continuación, investigamos la producción de IL 1 β antes y después de la decidualización por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo. La figura 2B muestra que la producción de IL-1 β aumenta significativamente luego de la decidualización en células HESC.

Receptividad endometrial: análisis de biopsias endometriales de pacientes con RIF y de mujeres fértiles.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelo in vitro de decidualización, realizamos un nuevo análisis bioinformático integrando *arrays* de biopsias endometrio. A partir de bases de datos públicas, se encontraron tres *arrays* en los que se comparaba la expresión de genes

Figura 2. Activación del inflammasoma NLRP3 y producción de IL-1 β . Dado que la producción de IL-1 β requiere la activación del inflammasoma para ser liberada en la forma activa, evaluamos la expresión de NLRP3 y la producción de IL-1 β . **A:** Esquema del inflammasoma NLRP3, complejo multiproteico formado por la molécula sensora (NLRP3), una la proteína adaptadora y la caspasa-1 (responsable de clivar a pro-IL-1 β a su forma activa IL-1 β). **B y C:** La línea celular HESC (Human Endometrial Stromal cells) fue cultivada hasta alcanzar la confluencia y decidualizadas en presencia de medroxiprogesterona y dibutilil AMPc durante 8 días. Las células no decidualizadas (No Dec) y decidualizadas (Dec) se analizaron para la expresión de NLRP3 por RT-qPCR. La expresión de NLRP3 se muestra normalizada con respecto a GAPDH. La producción de IL-1 β activa se cuantificó por marcación intracelular y análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran como porcentaje de células positiva para IL-1 β . Las barras corresponden a la media \pm SEM de al menos 5 ensayos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ prueba t de Student)



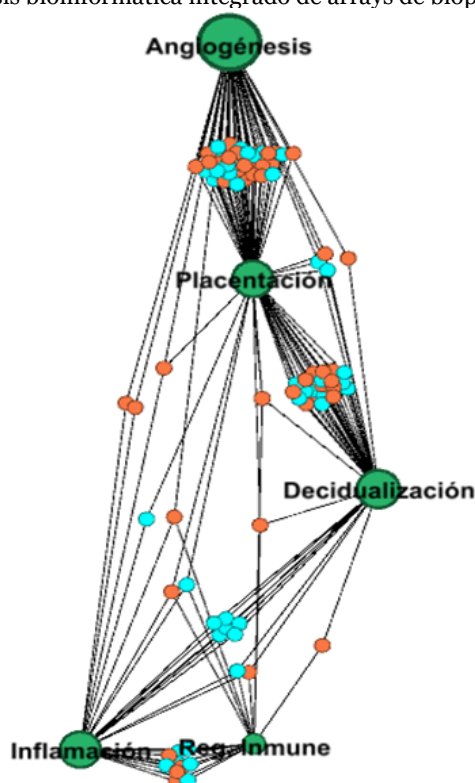
entre biopsias endometriales de mujeres fértiles vs pacientes con RIF.

Se buscaron cuáles genes se modulaban diferencialmente (en al menos un *array*) y sobre la red creada previamente (Figura 1B) que integraba los procesos, se aplicó colores indicando si los genes se modulaban significativamente (rosa) o no (celeste), (ver Figura 3). Es importante destacar que el 52% de los genes con grado 2 o más, es decir aquellos que intervienen en al menos dos procesos, están significativamente modulados, lo que denota la relevancia de estos genes para el estudio de las pacientes RIF.

A partir de bases de datos públicas, se encontraron tres *arrays* en los que se comparaba la expresión de genes entre biopsias endometriales de mujeres fértiles vs pacientes con fallas reiteradas en las

fertilizaciones *in vitro* (RIF). Se obtuvieron los genes modulados diferencialmente en al menos un *array* y sobre la red anterior, se identificó con colores indicando si los genes se modulaban significativamente (rosa) o no (celeste). En la red solo se muestran genes que estén involucrados en 2 o más procesos. El 52% de los genes mostrados presenta modulación.

A continuación, se validó la expresión de algunos de estos genes en biopsias de endometrio obtenidas de pacientes con RIF y se las comparó con la obtenida a partir de biopsias endometriales de mujeres fértiles. Las muestras de endometrio fueron obtenidas durante la fase secretoria del ciclo menstrual según los criterios detallados en Materiales y Métodos. En la tabla 2 se muestran las características de ambos grupos de mujeres.

Figura 3. Análisis bioinformática integrado de arrays de biopsias endometrio.**Tabla 2.** Datos clínicos de las pacientes con RIF y de mujeres fértiles. Los valores se muestran como mediana y rango.

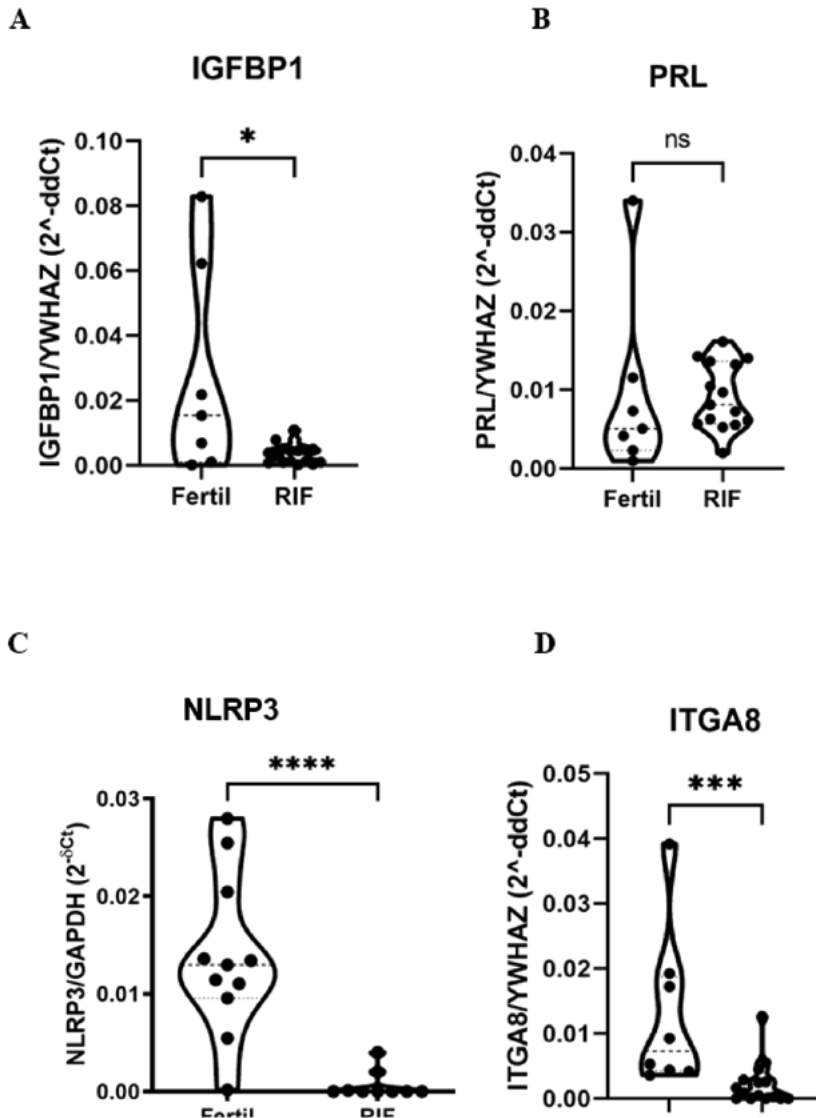
Características	Fértiles	RIF
N	17	14
Edad	38 (31-42)	35 (33-39)
Nacimientos	2 (1-5)	0
Fallas recurrentes en implantación	0	5 (2-9)

A partir de las biopsias obtenidas de ambos grupos de pacientes se obtuvo el correspondiente cDNA y se analizó la expresión génica por RT-qPCR. Como muestran las Figuras 4A y B, los endometrios obtenidos de pacientes con RIF presentaron disminuidos significativamente la expresión de los marcadores característicos de decidualización IFGB1 y prolactina en comparación con la observada en muestras de mujeres fértiles.

Dado que el programa de decidualización regula la respuesta inflamatoria y la

expresión de la familia de integrinas responsables de mediar la adhesión estable del blastocisto, se investigó la expresión de NLRP3 y de la integrina ITGA8^(14,15) en ambos grupos de pacientes. Como se observa en las Figuras 4C y D, la expresión de NLRP3 fue significativamente menor en las biopsias de pacientes con RIF en comparación con la observada en los endometrios de las mujeres fértiles; acompañado por una marcada reducción en la expresión de la integrina ITGA8.

Figura 4. Receptividad endometrial: análisis de biopsias endometriales. Se obtuvieron biopsias endometriales durante la fase secretora del ciclo menstrual de pacientes con RIF y de mujeres fértiles. Las muestras se procesaron mecánicamente, se aisló el ARN y se generó ADNc. Se estudió la expresión de **A:** IGFBP1, **B:** Prolactina, **C:** NLRP3 y **D:** ITGA8 por RT-qPCR. En las pacientes RIF, el proceso de decidualización fue acompañado de una menor expresión de los marcadores de decidualización IGFBP1 y PRL, así como de la subunidad NLRP3 del inflamasoma y de la integrina ITGA8. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$ normalizando a los genes house-keeping GAPDH o YWHAZ. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test



Estos resultados sugieren que el endometrio de las pacientes con RIF presenta alteraciones en el programa de decidualización que llevarían a una inadecuada

expresión de marcadores característicos, así como a alteraciones en la respuesta inflamatoria y en el mecanismo de adhesión del blastocisto.

Discusión

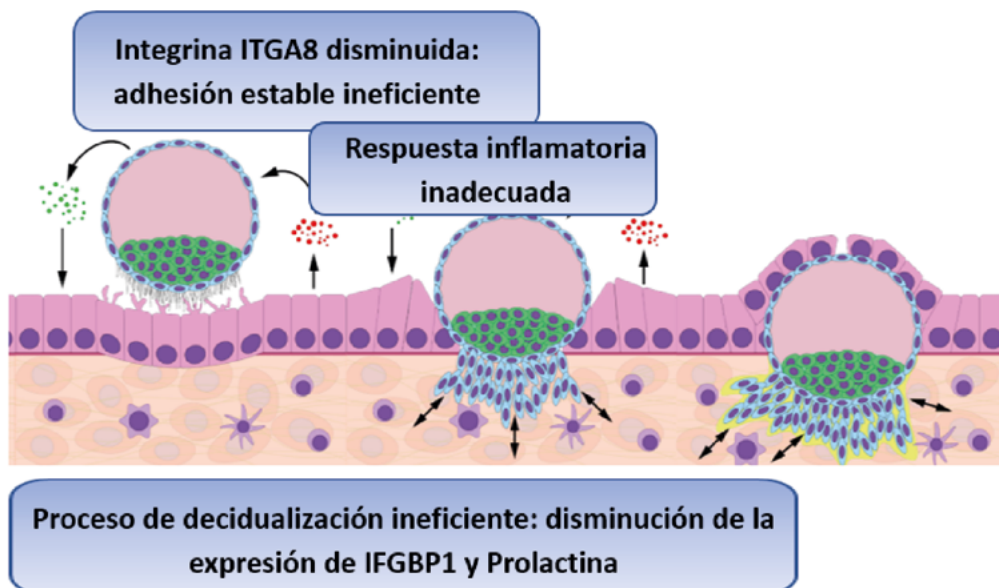
En este trabajo, nos enfocamos en algunos genes que resultan críticos para integrar procesos que acompañan la decidualización e implantación embrionaria; y cómo ciertas alteraciones en los mismos podrían pre condicionar el endometrio de pacientes con RIF.

En primer lugar, realizamos un análisis *in silico* integrado los procesos de angiogénesis, placentación, decidualización, inflamación y regulación inmune que nos permitió identificar una red de genes que los conectan. Luego utilizamos un modelo de decidualización *in vitro*, basado en la línea celular HESC, mediante el cual pudimos confirmar la decidualización se acompaña de la producción de IL-1 β activa. A su vez, en otro análisis integrado bioinformático abordamos la expresión

diferencial de genes a partir de arrays de pacientes con RIF, encontrando que más de la mitad de los genes que unen los distintos procesos están alterados en pacientes con RIF. Finalmente, validamos algunos de los genes identificados en muestras de pacientes con RIF y fértiles lo que nos permitió concluir que el endometrio de las pacientes con RIF presenta alteraciones en el programa de decidualización, en la respuesta inflamatoria y en consecuencia en el mecanismo de adhesión (*attachment*) del blastocisto (Figura 5).

En trabajos ya publicados, el modelo *in vitro* de decidualización permitió estudiar la generación de un microambiente proinflamatorio asociado a la implantación embrionaria exitosa^(12,17). Con respecto a la producción de IL-1 β , esta citoquina resulta clave en la regulación de la

Figura 5. Condicionamiento de la receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes en las fertilizaciones *in vitro*: resumen gráfico del trabajo. El endometrio de las pacientes con RIF presenta alteraciones en el programa de decidualización asociado a una inadecuada expresión de marcadores característicos; llevando a alteraciones en la respuesta inflamatoria fisiológica y en consecuencia disminuiría la adhesión estable (*attachment*) del blastocisto al epitelio uterino.



respuesta inflamatoria en el período peri-implantacional^(3,18). Particularmente, un nivel moderado de IL-1 β tiene función proimplantatoria, modulando la expresión de proteínas de remodelación de matriz extracelular e incrementado la expresión de integrinas en el endometrio, que luego mediarán la adhesión estable del blastocisto^(14,15,19). Las integrinas son las glicoproteínas dominantes en la adhesión debido a su capacidad para unirse a los ligandos de la matriz extra celular para mediar la adhesión y de reorganizar citoesqueleto para estabilizar la adhesión del blastocisto. La contribución de las integrinas a la adhesión del blastocisto al epitelio luminal ha sido muy bien caracterizado en distintos modelos animales y específicamente la ITGA8 en el modelo bovino⁽¹⁵⁾.

Cuando estudiamos las biopsias de pacientes con RIF, encontramos una disminución en los marcadores IFGBP1 y prolactina, ambos marcadores del programa de decidualización. Este programa cíclico en humanos contribuye al “precondicionamiento” del endometrio y de él depende la receptividad endometrial^(20,21).

Más aún, las pacientes con RIF también presentaron disminuida significativamente la expresión NLRP3, una subunidad del inflammasoma, lo que indica una respuesta inflamatoria inadecuada. A su vez, la respuesta inflamatoria también es responsable de inducir la activación de las integrinas, en consecuencia, se afectaría la adhesión

estable del blastocisto. En ese sentido, evidenciamos una marcada disminución de la expresión de la integrina ITGA8, que nos sugiere que la adhesión estable del blastocisto estaría disminuida en este grupo de pacientes.

Finalmente, el uso de herramientas bioinformáticas que combinan múltiples vías de señalización junto con el análisis de expresión de genes en *arrays* públicos, presenta una gran oportunidad para explorar posibles genes clave en la regulación de los procesos asociados a la reproducción. En el presente trabajo utilizando herramientas bioinformáticas muy novedosas, exploramos los potenciales genes más relevantes y sentamos las bases para profundizar en los mecanismos asociados a la decidualización y a la implantación embrionaria. Además, exploramos los cambios en la expresión génica tanto en un modelo *in vitro* de decidualización, como en endometrios de mujeres fértiles y mujeres con RIF, evidenciando en este último grupo (RIF) una respuesta inflamatoria inadecuada que a su vez condiciona la adhesión del blastocisto, aportando así al entendimiento que subyacen a las fallas reiteradas en las implantaciones *in vitro*.

Identificar los mecanismos alterados en la receptividad endometrial aportaría desde la investigación básica al diseño de nuevas estrategias terapéuticas impactando a futuro en el éxito de los tratamientos de fertilización asistida y especialmente en pacientes con RIF.

REFERENCIAS

1. Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1995;10 Suppl 2:14-21.
2. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Lentjes EG, Fauser BCJM, Heijnen CJ, et al. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod Oxf Engl.* junio de 2009;24(6):1427-35.
3. Soczewski E, Grasso E, Gallino L, Hauk V, Fernández L, Gori S, et al. Immunoregulation of the decidualization program: focus on the endoplasmic reticulum stress. *Reproduction.* abril de 2020;159(4):R203-11.
4. Dimitriadis E, White C a, Jones RL, Salamonsen L a. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 2005;11(6):613-30.
5. Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, Paiva P, Salamonsen LA. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int J Dev Biol.* enero de 2010;54(2-3):313-22.
6. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol.* agosto de 2017;17(8):469-82.
7. Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, et al. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol Baltim Md.* enero de 2012;26(1):203-17.
8. Dinarello CA. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* octubre de 2019;15(10):612-32.
9. Paulesu L, Bigliardi E, Paccagnini E, Ietta F, Cateni C, Guillaume CP, et al. Cytokines in the oviparity/viviparity transition: evidence of the interleukin-1 system in a species with reproductive bimodality, the lizard *Lacerta vivipara*. *Evol Dev.* 7(4):282-8.
10. Geisert R, Fazleabas A, Lucy M, Mathew D. Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1 β . *Cell Tissue Res.* septiembre de 2012;349(3):825-38.
11. Strakova Z, Srisuparp S, Fazleabas AT. Interleukin-1 β Induces the Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 during Decidualization in the Primate 1. *Endocrinology.* diciembre de 2000;141(12):4664-70.
12. Fernández L, Soczewski E, Gori MS, Sabbione F, Papparini D, Vota D, et al. Decidualized cells respond differentially contributing to a tolerogenic microenvironment accordingly blastocyst quality. *Med B Aires.* 2018;78.
13. Lerner AG, Upton JP, Praveen PVK, Ghosh R, Nakagawa Y, Igarria A, et al. IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* agosto de 2012;16(2):250-64.
14. Kumar V, Soni UK, Maurya VK, Singh K, Jha RK. Integrin beta8 (ITGB8) activates VAV-RAC1 signaling via FAK in the acquisition of endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation. *Sci Rep.* diciembre de 2017;7(1):1885.
15. Yamakoshi S, Bai R, Chaen T, Ideta A, Aoyagi Y, Sakurai T, et al. Expression of mesenchymal-related genes by the bovine trophectoderm following conceptus attachment to the endometrial epithelium. *REPRODUCTION.* marzo de 2012;143(3):377-87.
16. Grasso E, Gori S, Soczewski E, Fernández L, Gallino L, Vota D, Martínez G, Irigoyen M, Ruhlmann C, Lobo TF, Salamone G, Mattar R, Daher S, Leirós CP, Ramhorst R. Impact of the Reticular Stress and Unfolded Protein Response on the inflammatory response in endometrial stromal cells. *Sci Rep.* 2018; 16;8(1):12274.
17. Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Silasi M, Mor G. Understanding the Complexity of the

- Immune System during Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* agosto de 2014;72(2):107-16.
18. Ramhorst R, Grasso E, Papparini D, Hauk V, Gallino L, Calo G, et al. Decoding the chemokine network that links leukocytes with decidual cells and the trophoblast during early implantation. *Cell Adhes Migr.* marzo de 2016;10(1-2):197-207.
19. Ihnatovych I, Hu W, Martin JL, Fazleabas AT, de Lanerolle P, Strakova Z. Increased Phosphorylation of Myosin Light Chain Prevents *In Vitro* Decidualization. *Endocrinology.* 1 de julio de 2007;148(7):3176-84.
20. Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* junio de 2009;200(6):615.e1-6.
21. Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep.* febrero de 2014;4(1):3894.
22. Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(40):E8468-77.
23. ER Stress and Angiogenesis. Binet F, Sapiha P. *Cell Metab.* 2015 6;22(4):560-75.

Descenso brusco de peso en varones jóvenes sometidos a cirugía bariátrica: impacto sobre la función reproductiva

Sudden weight loss in young men undergoing bariatric surgery: impact on reproductive function

MC Craia¹; C Massoni²; M Vicentin³; M Grimoldi³; R Martinelli⁴; A Caille⁵; R Tioni³; A Marcolini³; D Awruch³; MJ Svetaz²; M Posadas⁶; MJ Munuce⁷.

¹ Laboratorio de Medicina Reproductiva, Área Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

² Laboratorio de Endocrinología, Hospital Provincial del Centenario de Rosario.

³ Unidad de Cirugía Bariátrica y Metabólica-Sanatorio Británico de Rosario.

⁴ Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

⁵ Laboratorio de Medicina Reproductiva, Área Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Universidad Nacional de Rosario.

⁶ Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

⁷ Laboratorio de Medicina Reproductiva, Área Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Se modifica el patrón de hormonas sexuales y la calidad seminal en varones jóvenes obesos mórbidos sometidos a cirugía Bariátrica?

Respuesta resumida: junto con la pérdida brusca de peso tras la cirugía Bariátrica se observa una mejora en el patrón de hormonas sexuales con algún deterioro en la calidad seminal.

Lo que ya se sabe: Existe una estrecha relación entre la obesidad y la infertilidad masculina.

Diseño: Estudio prospectivo longitudinal analítico desarrollado en 18 meses.

Materiales y Métodos: Se incluyeron varones jóvenes (n=9) con obesidad mórbida (IMC \geq 40 Kg/m²), evaluados antes y 6-10 meses después de la cirugía Bariátrica. El estudio seminal se realizó de acuerdo a normas OMS (2010) utilizando un sistema computarizado de análisis del movimiento. Se incluyó el índice de

ABSTRACT

Study question: Does Bariatric surgery modifies sex hormone profile and seminal quality in morbidly obese young males?

Summary response: along with the sudden loss of weight after Bariatric surgery, an improvement in sex hormones with a deleterious effect in seminal quality, is observed.

What is already known: There is a close relationship between obesity and male infertility.

Study design: Prospective matched study performed in 24 months.

Materials and Methods: Young men (n=9) with morbid obesity (BMI \geq 40 kg/m²), evaluated before and 6-10 months after Bariatric surgery, were included. Seminal study was conducted according to WHO (2010) standards using a computerized motion analysis system. The teratozoospermia index, DNA fragmentation state, and nuclear immaturity were

teratozoospermia, el estado de fragmentación del ADN y la inmadurez nuclear. Se determinó el perfil FSH, LH, Testosterona total y libre y SHBG por ECLIA. Todos los pacientes firmaron consentimiento.

Resultados: La pérdida brusca de peso tras la cirugía Bariátrica, se asoció con aumento en la FSH y SHBG y una disminución en la calidad seminal reflejada en la disminución del volumen seminal, el recuento total de espermatozoides, la velocidad curvilínea y la amplitud lateral de la cabeza. La variación del IMC correlacionó positivamente con la del volumen seminal y la SHBG. El perfil glucolipídico mostró una disminución en la insulino-resistencia señalada por HOMA-IR y en los valores de colesterol No-HDL.

Limitaciones del estudio: Dado que los pacientes fueron reclutados a partir del Servicio de Cirugía Bariátrica y Metabólica, y por no presentar problemas reproductivos carecen de evaluación uro / andrológica previa.

Implicancias de los hallazgos: Los resultados sugieren recomendar consejería reproductiva a fin de alertar a los jóvenes obesos sobre posibles riesgos de disminución del potencial fértil a corto plazo tras la cirugía Bariátrica.

Se requieren más estudios que contemplen posibles deficiencias nutricionales post-quirúrgicas y un período de evaluación mayor (12-24 meses) para confirmar los efectos observados y su reversibilidad.

Palabras clave: Laparoscopia diagnóstica, infertilidad inexplicada, embarazo.

also evaluated. The profile of FSH, LH, Total and Free Testosterone and SHBG were assayed by ECLIA. All patients signed a written consent.

Results: *The sudden loss of weight after Bariatric surgery was associated with an increase in FSH and SHBG and a decrease in seminal quality reflected in the decrease in seminal volume, total sperm count, curvilinear velocity and lateral head amplitude. The variation in BMI correlated positively with seminal volume and SHBG. The glycolipid profile showed a decrease in insulin-resistance indicated by HOMA-IR and in non-HDL cholesterol values.*

Study limitations: *Since patients were recruited from the Bariatric and Metabolic Surgery Service, and because they did not present infertility problems, they lack prior uro/andrological evaluation.*

Implications of the findings: *The results suggest recommending reproductive counseling in order to alert young obese males to possible risks of diminishing fertile potential in the short term after Bariatric surgery.*

More studies looking at possible post-surgical nutritional deficiencies and a longer evaluation period (12-24 months) are required to confirm the observed effects and the reversibility.

Keywords: *obesity, bariatric surgery, semen analysis, DNA fragmentation.*

Introducción

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica, multifactorial que se ha convertido en las últimas décadas en una “pandemia” global^(1,2). Se postula que la obesidad podría ser una causa asociada a trastornos reproductivos en el varón⁽³⁾.

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en el impacto de la obesidad materna, hoy día se debaten los posibles efectos de la obesidad sobre el potencial reproductivo masculino⁽⁴⁾. Se ha demostrado que las células del tejido graso secretan adipocinas que afectan a diferentes procesos metabólicos, reproductivos, de coagulación, de resistencia vascular, entre otros. Algunos de estos factores tienen principalmente un efecto paracrinos y otros tienen efectos sistémicos⁽⁵⁾. El tejido adiposo aumentado produce una mayor conversión de Testosterona (T) en Estradiol (E2), estableciendo un estado de hipogonadismo hiperestrogénico secundario que afecta al desarrollo normal de la espermatogénesis⁽⁶⁾.

Por otro lado, dado que los adipocitos expresan receptores específicos para hormonas hipofisarias y factores liberadores hipotalámicos, el tejido adiposo podría considerarse un “órgano endocrino” bajo regulación de un eje hipotalámico-pituitario-adiposo⁽⁷⁾.

La obesidad masculina y la infertilidad pueden asociarse a través de una desregulación endocrina, de la acumulación de toxinas ambientales liposolubles, del aumento de la temperatura escrotal y de la disfunción eréctil^(8,9). Además, el estrés oxidativo a nivel del micro-ambiente testicular generado por acción de los productos tóxicos liberados por el adipocito, puede dañar el ADN espermático⁽¹⁰⁾.

Algunos estudios previos que evaluaron el efecto de la obesidad sobre las hormonas

sexuales y la calidad seminal, concluyen que existe una asociación entre el incremento del IMC y niveles más bajos de T total y SHBG, con mala relación con E2 y T libre. Sin embargo no hay evidencia sólida sobre la relación entre el IMC y la calidad del semen⁽¹¹⁾.

Existe poca información sobre la salud sexual y reproductiva de varones obesos que transitan un proceso de adelgazamiento. La cirugía Bariátrica (CB) es una alternativa que promueve una pérdida de peso mayor y más duradera, lo que mejora la calidad y esperanza de vida de los pacientes⁽¹⁰⁾. La información disponible sobre los beneficios de la CB y la reversión de la infertilidad masculina, es escasa y contradictoria^(12,13). Algunos autores describen una mejoría en algunos parámetros del semen y más lentamente en el perfil de las hormonas sexuales, mientras otros no detectan cambios u observan un empeoramiento^(14,15).

La CB y la reproducción médicamente asistida son tratamientos recientemente incorporados al Programa Médico Argentino Obligatorio de Asistencia Social. Teniendo en cuenta que los beneficios de la pérdida de peso asociados con la infertilidad masculina aún son altamente contradictorios, decidimos analizar el impacto de la CB sobre las hormonas reproductivas y la calidad seminal en varones jóvenes obesos.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental: Estudio prospectivo longitudinal analítico desarrollado en 18 meses.

Sujetos:

Criterio de inclusión: Varones menores de 45 años con Índice de masa corporal (IMC) ≥ 40 Kg/m² (obesos mórbidos) que se les indicó Cirugía Bariátrica y que

voluntariamente quisieron participar del proyecto.

Criterio de exclusión: Varones mayores de 45 años con Índice de masa corporal (IMC) ≥ 40 Kg/m² (obesos mórbidos) que se les indicó Cirugía Bariátrica.

Técnicas y procedimientos: Se incluyeron inicialmente 11 participantes, las primeras determinaciones se realizaron antes de la cirugía (bypass gástrico laparoscópico o gastrectomía en manga). Una segunda evaluación del paciente se realizó entre 6-10 meses post-cirugía. Quince días antes de la cirugía, los pacientes fueron suplementados con Supradyn forte (Bayer, Leverkusen, Alemania), después de la cirugía con Centrum (Pfizer, Nueva York, E.E.U.U). Un equipo de nutricionistas guió la dieta posquirúrgica controlando el perfil metabólico evaluando: glucosa, insulina, HOMA-IR, colesterol (total, HDL, LDL, No HDL) y triacilglicérolos.

Medidas antropométricas: Los datos correspondientes a la talla, el peso corporal y el IMC de los pacientes fueron obtenidos de las historias clínicas de acuerdo con los estándares del Sanatorio Británico de la ciudad de Rosario.

Determinación de hormonas reproductivas: La muestra de sangre se extrajo el mismo día en que se obtuvo la muestra de semen; el suero se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Los niveles séricos de hormona folículo estimulante (FSH) (rango normal: 1,5-12,5 mUI/ml), hormona luteinizante (LH) (rango normal: 1,7-8,7 mUI/ml), testosterona total (TT) (rango normal: 2,43-8,36 ng/ml), testosterona libre (TL) (rango normal: 57,0-178,0 pg/ml), testosterona biodisponible (TB) (rango normal: 1,25-4,10 ng/ml), globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (rango normal: 16,5-55,9 nmol/l) y estradiol (E2) (rango

normal: 25,8-60,70 pg/ml), fueron determinados por el método de inmunoensayo competitivo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) (Cobas e 411, Roche Diagnostics, Ltd Rotkreuz, Suiza). También se midió la concentración sérica de albúmina (Cobas c 311, Roche Diagnostic, Suiza) (rango normal: 3,40-4,80 g/dl) para permitir el cálculo matemático de TB a partir de TT y SHBG.

Análisis de semen: El semen se obtuvo por masturbación tras dos a siete días de abstinencia sexual y se recogió en un colector estéril provisto por el laboratorio. Después de la licuefacción se registró el volumen, la viscosidad y el pH. El análisis de semen se realizó de acuerdo a las normativas de la Organización Mundial de la Salud⁽¹⁶⁾ con la ayuda de un Sistema Integrado de Análisis de Semen ISAS v1 (Proiser R&D, Valencia, España) que analiza 25 fotogramas por segundo (s) (tiempo total analizado 1 s). El equipo discrimina el movimiento espermático en: grado a (VAP > 25 μ m/s; STR \geq 80%), grado b (25 μ m/s \geq VAP \geq 10 μ m/s), grado c (10 μ m/s > VAP \geq 4 μ m/s) y grado d (VAP < 4 μ m/s); se registraron el porcentaje de móviles totales (grado a + b + c) y porcentaje de móviles progresivos (grado a + b).

Las características cinéticas del movimiento espermático se clasifican como: VAP (velocidad de trayecto medio), VSL (velocidad rectilínea), VCL (velocidad curvilínea), ALH (amplitud lateral de la cabeza), BCF (frecuencia de batido flagelar), STR (índice de rectitud) y LIN (índice de linealidad).

La morfología de los espermatozoides se informó como porcentaje de formas normales y se obtuvo el índice de deformidad teratozoospermica (TZI) según criterios estrictos.

Estado de fragmentación del ADN: Se

evaluó mediante la prueba de dispersión de cromatina espermática, descrito por Fernández y cols. (2003), según las instrucciones del fabricante del kit de Golcycyto (Microptic, Barcelona, España)⁽¹⁷⁾. Los espermatozoides con halos grandes o medianos se consideraron no fragmentados y los espermatozoides con halos pequeños, sin halos o degradados se consideraron fragmentados. Se contaron 200 espermatozoides por duplicado y se calculó el índice de fragmentación (IF) = $100 \times (\text{número de espermatozoides con ADN fragmentado}) / (\text{número de espermatozoides contados})$. IF <15% se consideró fragmentación normal, IF >15% se consideró fragmentación moderada y IF > 30% fragmentación severa.

Inmadurez nuclear: Se evaluó la compactación o maduración de la cromatina espermática según Sellami y col. (2013) con la ayuda de una solución de azul de anilina (18). Los núcleos inmaduros ricos en histonas se muestran teñidos de azul, mientras que los núcleos maduros ricos en protamina permanecieron sin teñir. Se contaron 200 espermatozoides por duplicado y se calculó el Índice de inmadurez (II) = $100 \times (\text{número de espermatozoides en la cabeza teñida de azul}) / (\text{número de espermatozoides contados})$. II > 30% se consideró inmadurez severa.

Perfil glucolipídico: Los datos del perfil glucolipídico de los pacientes fueron extraídos de sus historias clínicas en el Sanatorio Británico de la ciudad de Rosario. Las variables analizadas fueron Glucosa (rango normal: 70-110 mg/dl), Insulina (rango normal: 2-20 μ U/ml), HOMA-IR (rango normal: < 2,0), Colesterol (rango normal: < 200 mg/dl), HDL-Col (rango normal: > 40 mg/dl), LDL-Col (rango normal: < 100 mg/dl), No HDL-Col (rango normal: < 130mg/dl), Triacilgliceroles (rango normal: < 150 mg/dl).

Análisis de los datos: El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa R (versión 3.4.0 (2017-04-21)). Los resultados se presentan como mediana y (rango intercuartil 25-75% (IQR)). La estadística comparativa se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. Las correlaciones se evaluaron mediante el método de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0,05$.

Aspectos éticos: El presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad de Rosario, el Comité de Ética del Hospital Provincial del Centenario y el Sanatorio Británico de Rosario. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

RESULTADOS

Siguiendo los criterios de inclusión, inicialmente fueron reclutados para el estudio once pacientes, sin embargo, uno de ellos debió ser excluido por no tener la aprobación por parte de su Obra Social para realizarse la cirugía y otro se mudó al extranjero después de la cirugía y no regresó para los controles, por lo tanto, el estudio completo apareado se llevó a cabo con nueve pacientes (32 (6,5) años).

Debido a episodios febriles en el invierno y a las medidas de aislamiento social, preventivo y obligatorio dispuestas por el Gobierno nacional frente a la pandemia de COVID 19, las evaluaciones post-quirúrgicas previstas a los seis meses, en algunos pacientes debieron reprogramarse hasta los 10 meses. Ninguno de los pacientes incluidos informó enfermedad por SARS-COV 2 durante el estudio.

Como era de esperar, la cirugía Bariátrica posibilitó una disminución significativa del IMC de 45,4 (8,1) vs 29,0 (5,4) kg/m^2 , $p = 0,003$.

La Tabla 1 muestra los valores de mediana (IQR) para las variables hormonales antes y después de la cirugía. Se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en FSH y SHBG post-cirugía. Sólo un paciente presentó valores compatibles con hipogonadismo en la evaluación pre-quirúrgica (TT $< 2,5$ ng/mL) con FSH, LH y E2 normales; en este paciente no se evidenció una mejoría de su condición luego de la cirugía.

Inicialmente y según los valores de referencia dispuestos por OMS 2010, el 66% (6/9) de los pacientes incluidos para el estudio fueron normozoospermicos.

Después de la cirugía 4 de los 6 pacientes oligozoospermico y teratozoospermico continuaron siéndolo, un paciente que era teratozoospermico antes de la cirugía mejoro su condición pasando a ser

considerado normozoospermico.

La Tabla 2 que muestra los valores obtenidos del análisis seminal permite observar que luego de la cirugía hubo una reducción significativa en el volumen seminal y en el recuento total de espermatozoides en el eyaculado. A pesar de que la motilidad progresiva no se vio afectada por la pérdida de peso, el análisis cinético del movimiento mostró que la VCL y la ALH disminuyeron.

No se observaron cambios ppost-cirugía sobre la viabilidad de los espermatozoides, el % de formas normales, TZI, estado de inmadurez de la cromatina y fragmentación del ADN espermático.

Es de destacar que, si bien los datos del IF parecieron mostrar una mejoría, no se alcanzó significancia estadística (Figura 1).

Tabla 1. Variación de los niveles de hormonas reproductivas antes y después de la cirugía Bariátrica.

VARIABLES (UNIDADES)	VALORES DE REFERENCIA	PRE CIRUGÍA MEDIANA (IQR)	POST CIRUGÍA MEDIANA (IQR)	P
FSH (mUI/ml)	1,5 – 12,5	2,7 (1,3)	3,3 (1,6)	0,021*
LH (mUI/ml)	1,7 – 8,6	4,3 (1,1)	4,5 (0,8)	0,426
TT (ng/ml)	2,5 – 8,4	4,5 (1,3)	4,6 (0,2)	0,734
TL (pg/ml)	57,0 – 178,0	98,1 (13,3)	80,4 (23,7)	0,129
TB (ng/ml)	1,25 – 4,1	2,5 (0,2)	2,0 (0,7)	0,098
E2 (pg/ml)	16,5 – 55,9	59,6 (16,7)	49,9 (22,4)	0,074
SHBG (nmol/l)	25,8 – 60,7	27,5 (20,1)	69,4 (58,8)	0,007*

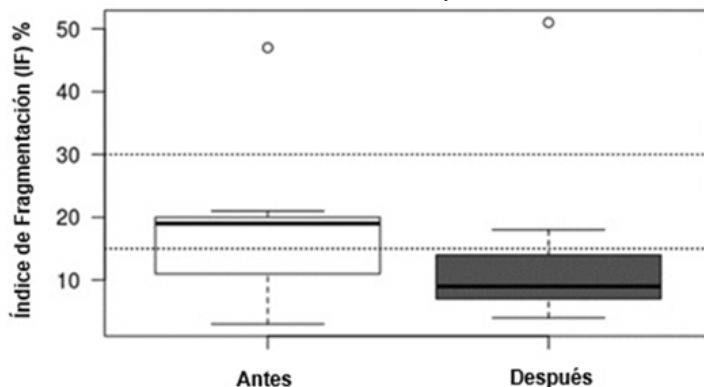
Perfil de hormonas reproductivas antes y después de la cirugía Bariátrica, expresado en mediana (IQR). FSH: hormona Foliculo-estimulante, LH: hormona Luteinizante, TT: Testosterona Total, TL: Testosterona Libre, TB: Testosterona Biodisponible, E2: Estradiol, SHBG: Globulina fijadora de Hormonas Sexuales. Los datos se muestran en mediana (IQR), (*) $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo, (n=9).

Tabla 2. Variación de las variables seminales antes y después de la cirugía Bariátrica.

Variables (Unidades)	Valores de referencia al percentil 5to	Pre Mediana (IQR)	Post Mediana (IQR)	p
Volumen (ml)	1,5	3,5 (0,5)	3,0 (1,5)	0,04*
Concentración (x 10 ⁶ /ml)	15	53 (64)	28 (58)	0,1
Recuento Total (x 10 ⁶)	39	218 (186)	74 (170)	0,02*
Movilidad Progresiva (%)	32	81,1(36,1)	67,5(29,2)	0,07*
Formas Normales (%)	4	6(5)	6(5)	0,9
TZI	1,5	1,3(0,1)	1,4(0,2)	0,6
IF (%)	< 30	19(9)	9(7)	0,3
II (%)	< 30	12(6)	14(18)	0,6
Viabilidad (%)	58	95(6)	90(3)	0,1
VAP(um/s)	-	40,7(3,8)	39,1(12,1)	0,1
VCL (um/s)	-	58,7(6,8)	55,0(16,4)	0,02*
VSL(um/s)	-	31,2(4,8)	33,0(9,3)	0,3
ALH (um)	-	3,1(0,3)	3,0(0,8)	0,01*
BCF (Hz)	-	9,0(0,8)	9,4(1,8)	0,9
LIN (%)	-	53,1(6,9)	55,2(10,1)	0,2
STR (%)	-	76,7(9,0)	79,3(6,2)	0,2

Variables seminales antes y después de la cirugía, expresadas en mediana (IQR). TZI: índice de teratozoospermia, IF: índice de fragmentación, II: Índice de inmadurez, VAP (velocidad de trayecto medio), VSL (velocidad rectilínea), VCL (velocidad curvilínea), ALH (amplitud lateral de la cabeza), BCF (frecuencia de batido flagelar), LIN (índice de linealidad) y STR (índice de rectitud). Los datos se muestran en mediana (IQR), (*) $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo, (n=9).

Figura 1. Fragmentación del ADN espermático antes y después de la cirugía Bariátrica. La línea continua señala los valores de referencia para dicha variable IF > 30% daño severo, IF > 15 % daño moderado. (NS, n=9).



Como se observa en el gráfico la mediana pre-cirugía se encontraba por encima del 15% mientras que este parámetro (y todo el IQR) post-cirugía se halla por debajo de este valor. Cuando se analizaron los datos en forma individual, se observó que, en el análisis inicial, seis de los nueve pacientes (66,7%) presentaban un IF > 15 %, mientras que al analizar los datos post-cirugía observamos que esta frecuencia se había reducido a solo dos de nueve (22%). (Figura 2).

Se encontró una correlación positiva (Rho=0,66) entre la variación del IMC (Δ IMC) y la variación del volumen seminal (Δ volumen) ($p < 0,05$). Respecto a las variables hormonales, se observó una correlación también positiva (Rho=0,8) entre la variación del IMC (Δ IMC) y la variación de la concentración sanguínea de SHBG (Δ SHBG) ($p < 0,01$) (Figura 3).

Respecto al perfil glucolípido, al extraer los datos de la historia clínica de los pacientes, no fue posible obtener los valores de todas las variables y todos los pacientes con el mismo lapso post-quirúrgico por diferentes razones: los pacientes no regresaron al control luego del descenso de peso al mismo tiempo, el médico tratante no consideró necesario solicitar la

determinación plasmática de alguno de los parámetros o la pandemia de COVID 19 impidió el control de laboratorio entre 6 –10 meses post-cirugía, etc. Por lo antes dicho, no se efectuaron comparaciones antes-después de la cirugía, pero aún sin poder avalar estadísticamente las diferencias, se aprecia que éstas son notorias y específicamente, después de la cirugía se normalizan HOMA-IR y No HDL-Col (Tabla 3).

DISCUSION

El presente estudio mostró el seguimiento de nueve varones jóvenes con obesidad mórbida, sin antecedentes de infertilidad, que realizaron una cirugía Bariátrica. El diseño experimental proporciona resultados confiables ya que todas las determinaciones fueron realizadas en las mismas instituciones y por los mismos operadores. Los datos muestran que la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio, si bien tenían un IMC > 40 Kg/m² presentaban valores dentro del rango normal en las hormonas reproductivas analizadas, aunque cercano al límite inferior. Solamente un paciente presentó valores compatibles con hipogonadismo (Paciente N° 7, TT: 1,2 ng/ml, TL: 21,7 pg/ml y TB: 0,5 ng/ml) pero no hipogonadotrópico (FSH y

Figura 2. Datos del IF (%) individual antes y después de la cirugía Bariátrica. (---) IF = 30%, un IF > 30% fragmentación severa del ADN espermático. (---) IF = 15% valores mayores daño moderado en el ADN. (▲) valores antes de la cirugía y (●) valores obtenidos después de la cirugía. (n=9).

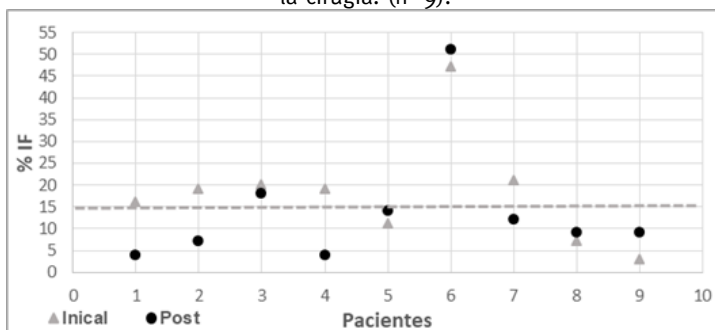


Figura 3. Los gráficos muestran la correlación entre la variación en el IMC antes y después de la Cirugía Bariátrica (Δ IMC) y la variación (Δ) en: a) Volumen seminal, b) SHBG. $p < 0,05$

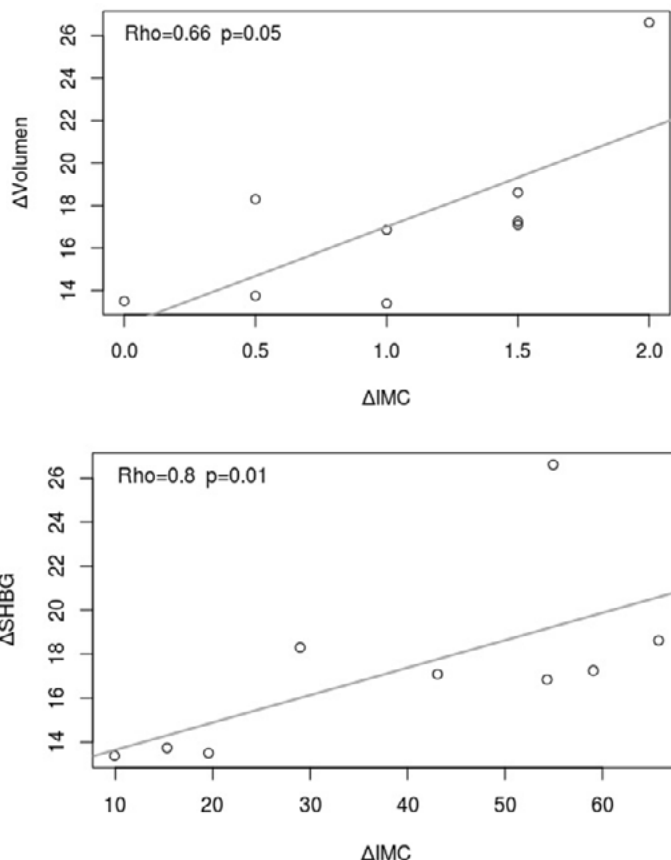


Tabla 3. Evaluación del perfil glucolipídico antes y después de la cirugía Bariátrica.

Variables plasmáticas (Unidades)	Pre-cirugía Mediana (IQR) (n=11)	Post-cirugía Mediana (IQR) (n=5)	Valor de referencia
Glucosa (mg/dl)	93 (9,5)	84,5 (7,0)	70-110
Insulina (μ U/ml)	19,8 (18,9)	4,6 (2,2)	2-20
HOMA-IR	5,2 (5,5)	0,7 (0,4)	$< 2,0$
Colesterol (mg/dl)	181,0 (29,0)	182,0 (61,0)	< 200
HDL-Col (mg/dl)	39,0 (11,0)	52,0 (11,0)	> 40
LDL-Col (mg/dl)	114,0 (36,5)	111,0 (59,0)	< 100
No HDL-Col (mg/dl)	140,0(24,0)	125,0 (74,0)	< 130
Triacilgliceroles (mg/dl)	119,0 (100,0)	70,0 (13,0)	< 150

Valores plasmáticos del perfil glucolipídico antes y después de la cirugía expresados como Mediana (IQR).

LH normales) ni hiperestrogénico (E2 normal).

Respecto a la calidad seminal y según los valores establecidos por la OMS 2010 para el percentil quinto, podemos afirmar que nuestra población inicial no manifestaba el efecto nocivo de la obesidad sobre las variables seminales ya que el 66,7 % (6/9) de los pacientes eran normozoospermicos antes de la cirugía. Estos resultados coinciden con los aportados por Rufus y col. quienes no encontraron diferencias en la calidad del semen, entre varones con IMC normal y elevado (con sobrepeso u obesidad)⁽¹⁹⁾. Sin embargo, en una revisión sistemática, Sermondade y col., observaron un riesgo aumentado de infertilidad asociado a baja calidad seminal, en las parejas en las que el varón tenía sobrepeso u obesidad⁽²⁰⁾.

En cuanto a la fragmentación del ADN inicial, 6/9 pacientes presentaban un valor de IF superior al 15 %, cabe suponer que esto se debe al deterioro de la función mitocondrial característica de la obesidad, que conlleva a una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) muy nocivas para el ADN⁽²¹⁾. Estudios recientes en modelos animales sugieren que los excesos dietarios y las dislipemias afectarían la función epididimaria⁽²²⁾. Sin embargo, nuestros datos muestran que la inmadurez nuclear (como medida de la maduración epididimaria), se mantuvo dentro del rango de normalidad (<30%). Se ha demostrado también que, en ratones con obesidad inducida con dieta rica en grasas, los niveles de ROS intracelulares aumentan y el estrés oxidativo induce daño en el ADN de los espermatozoides disminuyendo la capacidad de fertilización⁽²³⁾. Esto nos lleva a suponer que la fragmentación nuclear moderada observada en este grupo de obesos, es debida a la agresión del medio (rico

en ROS) sobre el ADN espermático en una etapa posterior al tránsito epididimario.

Nuestros datos mostraron que la pérdida significativa de peso después de la cirugía Bariátrica llevó a la normalización de los valores séricos de FSH y SHBG sin cambios en T y E2. Además, se observó una correlación positiva entre la variación en el IMC y la variación en la concentración de SHBG. Se sabe que la obesidad está inversamente asociada con los niveles de SHBG, lo

que se explica, al menos parcialmente, por la disminución de SHBG provocada por la insulino-resistencia que habitualmente acompaña a la obesidad. La producción hepática de SHBG, -disminuida en individuos obesos- se restablece tras la cirugía Bariátrica ya que la pérdida de peso disminuye la insulino-resistencia; también se generan cambios y mejoras en la histología hepática^(24, 25).

La Tabla 4 resume los datos obtenidos en estudios similares al nuestro. En coincidencia, varios de estos artículos informaron una clara mejoría en FSH y SHBG⁽¹⁵⁾ ⁽²⁶⁻²⁸⁾. En nuestro estudio no detectamos aumento de T ni disminución de E2 después de la cirugía.

En contraposición parcial, Lee y col. en una revisión sistemática y un meta-análisis (1022 pacientes) confirmaron aumento en TT, TL, LH, FSH y SHBG y disminución significativa de E2 después de la cirugía Bariátrica⁽²⁹⁾.

Con respecto a la calidad seminal, nuestros datos estuvieron concordantes con Calderón y col., quienes describieron que la disminución en el IMC se correlaciona positivamente con disminución en el volumen seminal⁽²⁷⁾. El menor recuento de espermatozoides sin cambios en la motilidad de los mismos descrito en este estudio, también fue observado por Wood y

Tabla 4. Comparativa entre trabajos similares y el presente trabajo.

Variable (Unidades)	Presente Trabajo n=9	Samavat y col. 2017 n=23	El Bardisi y col. 2016 n=46	Calderón y col. 2019 n=20	Wood y col. 2020 n=18
IMC Pre-cirugía (Kg/m ²)	45,4	45,8	71,4	50	43,9
IMC Post-cirugía (Kg/m ²)	29,05	34,7	46,9	32	32,3
Tiempo transcurrido para la evaluación Post-ciru- gía (meses)	6-10	6	12	24	6
FSH (mUI/ml)	↑	↑	×	↑	↑
LH (mUI/ml)	×	↑	×	×	×
TT (ng/ml)	×	↑	↑	↑	↑
TL (pg/ml)	×	↑	NA	↑	↑
SHBG (nmol/l)	↑	↑	NA	↑	↑
E2 (pg/ml)	×	↓	×	×	×
Volumen seminal (ml)	↓	↑	×	↓	×
Cantidad de espermato- zoides en el eyaculado (Mill.)	↓	×	×	×	↓
% formas mótils	×	×	×	×	×
% formas normales	×	↓	×	×	×
% deformidad (TZI)	×	NA	NA	NA	NA
% formas vivas	×	↑	NA	×	NA
% fragmentación	×	×	NA	NA	↓
% de inmadurez	×	×	NA	NA	NA

Comparación entre el presente trabajo y cuatro trabajos similares de diseño prospectivo longitudinal. NA: No analizado, ↑ aumentó significativamente ($p < 0,05$) post-cirugía respecto del inicial, ↓ disminuyó significativamente ($p < 0,05$) post-cirugía respecto del inicial, × no hubo diferencia ente post-cirugía respecto del inicial.

col.⁽²⁸⁾. El ventajoso empleo de un sistema computarizado de análisis espermático nos permitió evaluar el desplazamiento cinético de los espermatozoides (además de su % de motilidad) y detectar una disminución en la VCL y la ALH. Aunque no existen parámetros de referencia para dichas variables, se asume que la VCL es una estimación confiable de la capacidad de fertilización de los espermatozoides humanos; poblaciones con mejores chances de fecundar presentarían velocidades mayores⁽³⁰⁾. Asimismo, el envejecimiento (como proceso degenerativo) se asocia a una disminución tanto de la VCL como de la ALH, tal como observamos post-cirugía por lo que ambos parámetros estimarían el deterioro de la calidad seminal⁽³¹⁾.

En cuanto al grado de fragmentación del ADN, se describe que la pérdida de peso mejora el estado de fragmentación del ADN ya que al disminuir la adiposidad disminuye la cantidad de subproductos oxidantes causados por los productos tóxicos⁽³²⁾. De acuerdo con Samavat y col., también observamos una mejoría (sin que se alcance significancia estadística) en la cantidad de espermatozoides fragmentados; post-cirugía el IF cayó del 19% medido inicialmente al 9%⁽¹⁵⁾. Recientemente Wood y col., también mostraron en 18 pacientes un efecto beneficioso de la pérdida de peso sobre el grado de fragmentación del ADN⁽²⁸⁾.

Existen algunas consecuencias no deseadas debido a la cirugía, como complicaciones por deficiencias de micronutrientes (hierro, calcio) y macronutrientes (desnutrición, falta de vitaminas D, B1, B12 y B9) en períodos cortos (12 a 18 meses), que pueden afectar la espermatogénesis normal⁽³³⁻³⁶⁾. En ratones, la deficiencia de vitamina D afecta el desarrollo testicular y la espermatogénesis. La vitamina D ejerce

un efecto directo sobre la calidad seminal (mejorando la motilidad y activación del calcio intracelular que conduce a una reacción acrosómica⁽³⁷⁾). La deficiencia nutricional también puede conducir a una disminución en la pulsatilidad de la GnRh hipotalámica que afecta el eje reproductivo⁽³⁸⁾.

Los resultados del presente trabajo sugieren recomendar consejería reproductiva a fin de alertar a los varones jóvenes obesos sobre posibles riesgos de disminución en el potencial fértil a corto plazo tras la cirugía Bariátrica. Las características espermáticas al menos entre los 6 y 10 meses post-cirugía, pueden no mejorar a pesar de los cambios beneficiosos en las hormonas reproductivas. El estado de malnutrición podría revertir pasados los 24 meses, con normalización del eje hormonal y la espermatogénesis. Se requieren más estudios que contemplen las posibles deficiencias nutricionales post-quirúrgicas y un periodo de evaluación mayor para confirmar los efectos observados.

En el caso de pacientes con deseo reproductivo a corto plazo post-quirúrgico una opción preventiva sería la criopreservación de semen ya que es un procedimiento simple, no invasivo y de costo moderado ampliamente utilizado en Medicina Reproductiva⁽³⁹⁾.

Fortalezas: Es la primera vez que se realiza un estudio prospectivo apareado el que no solo se midieron variables de espermograma estándar, sino pruebas opcionales que evalúan la funcionalidad espermática.

Limitación: Dado que los pacientes fueron reclutados a partir del Servicio de Cirugía Bariátrica y Metabólica, y por no presentar problemas de infertilidad, carecen de evaluación uro / andrológica previa.

Conclusión

La pérdida masiva de peso después de la cirugía Bariátrica en hombres jóvenes con obesidad mórbida se asoció con un aumento de las hormonas reproductivas y una disminución en algunas variables del semen que reflejan la pérdida de su calidad en el corto plazo.

Agradecimientos: los autores agradecen a la Dra. Celia Castellarin y su cuerpo técnico (Laboratorio Clínico del Sanatorio Británico de Rosario) por el soporte técnico en la extracción y almacenamiento de muestras de sangre.

Fuente de financiación: Proyecto de la Secretaria de Vinculación Tecnológica y Desarrollo Productivo de la Universidad Nacional de Rosario, Resolución CS 573/2018.

Conflicto de intereses: los autores no presentan conflicto de intereses alguno.

Participación en el trabajo: Todos los autores aceptan su participación en el presente trabajo en el orden establecido y con la siguiente distribución de tareas: MCC realización de estudios experimentales, preparación de reactivos y muestras, interpretación datos y escritura de trabajo, CM y MJS: determinaciones hormonales, AM, MV, MG, RT, DA: reclutamiento pacientes, procedimiento quirúrgico, seguimiento pre y post quirúrgico, RM y AC: diseño experimental y análisis estadístico, MP y MJM: diseño experimental, gestión fuente financiamiento, puesta a punto de metodologías y logística, análisis e interpretación de datos, escritura de manuscrito.

REFERENCIAS

1. Pollack A. A.M.A. Recognizes obesity as a disease. (2013) Consultado el 25 de enero de 2020, hora 7:35 pm. Disponible en: <http://www.nytimes.com/2013/06/19/business/ama-recognizes-obesity-as-a-disease.html>.
2. World Health Organization. Consultado 21 de enero 2019, hora 4:37 pm. Disponible en <https://www.who.int/topics/obesity>.
3. Oliveira PF, Sousa M, Silva BM, et al. Obesity, energy balance and spermatogenesis. *Reproduction*. 2017; 153(6):173-185.
4. ESHRE Task Force on Ethics and Law, including, Dondorp W, de Wert G, Pennings G, et al. Lifestyle-related factors and access to medically assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2010; 25(3):578-83.
5. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, et al. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metab. Clin. Exp*. 2013; 62(4):457-78. Review.
6. Scheja L, Heeren J. The endocrine role of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15(9):507-524.
7. Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C. The role of 'adipotropins' and the clinical importance of a potential hypothalamic-pituitary-adipose axis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006; 2(7):374-83.
8. Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. *Curr Opin Urol*. 2017; 27(5):441-445.
9. Liu Y, Ding Z. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction*. 2017; 154(4):R123-R131.
10. Reis L, Dias F. Male Fertility, Obesity, and Bariatric Surgery. *Reprod. Sci*. 2012; 19(8), 778-785.
11. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, et al. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive

- hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010; 16(3):293-311.
12. Rosenblatt A, Faintuch J, Cecconello I. Abnormalities of Reproductive Function in Male Obesity before and After Bariatric Surgery-A Comprehensive. *Obes Surg*. 2015; 25(7):1281-92.
 13. Best D, Avenell A, Bhattacharya S. How effective are weight-loss interventions for improving fertility in women and men who are overweight or obese? A systematic review and meta-analysis of the evidence. *Hum Reprod Update*. 2017; 23(6):681-705.
 14. Abiad F, Awwad J, Abbas HA, et al. Management of weight loss in obesity-associated male infertility: a spotlight on bariatric surgery. *Hum Fertil (Camb)*. 2017; 20(4):227-235.
 15. Samavat J, Cantini G, Lotti F, et al. Massive weight loss obtained by bariatric surgery affects semen quality in morbid male obesity: a preliminary prospective double-armed study. *Obes Surg*. 2018;28(1):69-76
 16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. Cambridge: Cambridge University fifth edition.
 17. Fernández, JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003; 24(1):59-66.
 18. Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, et al. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Adv Urol*. 2013; 2013:578631.
 19. ufus O, James O, Michael A. Male obesity and semen quality: Any association? *Int J Reprod Biomed*. 2018; 16(4):285-290.
 20. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum. Reprod*. 2013; 19, 221-231.
 21. Abbasihormozi SH, Babapour V, Kouhkan A, et al (2019). Stress hormone and oxidative stress biomarkers link obesity and diabetes with reduced fertility potential. *Cell Journal*, 21(3), 307-313.
 22. Saez F, Whitfield M, Drevet JR. Impairment of sperm maturation and capacitation due to diet-dependent cholesterol overload. *Andrology*. 2019; 7(5):654-661.
 23. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, et al. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl*. 2011; 34(5 Pt 1):402-10.
 24. Díaz Coppe-Gutiérrez A, Velázquez-Fernández D, Herrera-Hernández M F, et al. El papel de la cirugía bariátrica en el manejo de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Rev Hosp Jua Mex* 2018; 85(2): 86-93.
 25. Cooper LA, Page ST, Amory JK, Anawalt BD, Matsumoto AM. The association of obesity with sex hormone-binding globulin is stronger than the association with aging--implications for the interpretation of total testosterone measurements. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015; 83(6):828-33.
 26. El Bardis H, Majzoub A, Arafa M, et al. Effect of bariatric surgery on semen parameters and sex hormone concentrations: a prospective study. *Reprod. Biomed. Online*. 2016; 33(5), 606-611.
 27. Calderón B, Huerta L, Galindo J. Lack of improvement of sperm characteristics in obese males after obesity surgery despite the beneficial changes observed in reproductive hormones. *Obes. Surg*. 2019; 29, 2045-2050.
 28. Wood GJA, Tiseo BC, Paluello DV. Impact of bariatric surgery on reproductive hormones, semen analysis, and sperm DNA fragmentation in severely obese men: prospective study. *Obes. Surg*. 2020; 30 (12): 4840-4851

29. Lee Y, Dang JT, Switzer N, et al. Impact of Bariatric Surgery on Male Sex Hormones and Sperm Quality: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg.* 2019; 29(1):334-346.
30. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 2001; 18(4):213-8
31. Fréour T, Jean M, Mirallie S, et al. Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Syst Biol Reprod Med.* 2012; 58(2):102-106.
32. Mir J, Franken D, Andrabi SW, et al. Impact of weight loss on sperm DNA integrity in obese men. *Andrologia.* 2018.
33. Handzlik-Orlik G, Holecki M, Orlik B, et al. Manejo nutricional del paciente postoperatorio de cirugía bariátrica *Nutr Clin Pract.* 2015; 30 (3): 383-92
34. Majumder S, Soriano J, Louie Cruz A, et al. Vitamin B12 deficiency in patients undergoing bariatric surgery: preventive strategies and key recommendations. *Surg Obes Relat Dis.* 2013; 9(6):1013-1019.
35. Lupoli R, Lembo E, Saldamacchia G, Avola CK, Angrisani L, Capaldo B. Bariatric surgery and long-term nutritional issues. *World J Diabetes.* 2017; 8(11):464-474.
36. Fu L, Chen YH, Xu S, et al. Vitamin D deficiency impairs testicular development and spermatogenesis in mice. *Toxicol reprod.* 2017; 73:241-249.
37. de Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, et al. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017; 18(3):285-305.
38. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr J.* 2009; 56(6):729-737.
39. Auger J, Sermondade N, Eustache F. Semen quality of 4480 young cancer and systemic disease patients: baseline data and clinical considerations. *Basic Clin Androl.* 2016; 26:3.

Rol de la laparoscopia diagnóstica en las pacientes con aparente infertilidad inexplicada

Role of diagnostic laparoscopy in patients with apparent infertility unexplained

G Botti; L Solari.

Centro de Cirugía Ginecológica Mini-Invasiva del Sanatorio Centro. Rosario. Argentina.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Es de utilidad la realización de una laparoscopia diagnóstica en pacientes con una aparente infertilidad inexplicada?

Respuesta resumida: Realizando laparoscopías diagnósticas en este grupo de pacientes se diagnosticaron patologías pelvianas (endometriosis y enfermedad pélvica inflamatoria crónica) inadvertidas en los estudios por imágenes previos y se logró una tasa de embarazo por paciente post laparoscopia muy satisfactoria (50%) con tratamiento expectante (TE), inducción de ovulación (IO) o inseminación intrauterina (IIU).

Lo que ya se sabe: Es controvertida la indicación de una laparoscopia diagnóstica en pacientes con los estudios básicos de infertilidad normales (ovulatorias, histerosalpingografía normal y factor masculino normal o leve) consideradas como portadoras de infertilidad inexplicada.

Diseño: Estudio retrospectivo descriptivo.

Materiales y Métodos: Se estudiaron 92 pacientes ovulatorias, con histerosalpingografía normal y factor masculino normal o

ABSTRACT

Study question: *Is it useful to perform a diagnostic laparoscopy in patients with apparent unexplained infertility?*

Summary response: *Performing diagnostic laparoscopies in this group of patients diagnosed pelvic pathologies (endometriosis and chronic pelvic inflammatory disease) unnoticed in previous imaging studies and achieved a very satisfactory pregnancy rate per patient post laparoscopy (50%) with expectant treatment (ET), ovulation induction (OI) or intrauterine insemination (IUI).*

What is already known: *The indication of a diagnostic laparoscopy in patients with normal basic infertility studies (ovulatory, normal hysterosalpingography and normal or mild male factor) considered as carriers of unexplained infertility is controversial.*

Study design: *Retrospective descriptive study.*

Materials and Methods: *We studied 92 ovulatory patients, with normal hysterosalpingography and normal or mild male factor during the period from January*

leve durante el período comprendido entre enero de 2015 y diciembre de 2018.

Se efectuó a todas ellas una laparoscopia diagnóstica bajo anestesia general e internación ambulatoria.

Se indicó luego del estudio tratamiento expectante (TE) o inducción de ovulación (IO) por 4 a 6 meses y en caso de no lograrse el embarazo un máximo de 3 ciclos de inseminación intrauterina (IIU) y finalmente reproducción asistida de alta complejidad (FIV/ICSI).

Resultados: Se incluyeron en el estudio 92 pacientes, el promedio de edad fue de 33,2 años (rango 24-38) y los hallazgos laparoscópicos fueron: normales en 10 casos (10.9%), endometriosis mínima en 25 casos (27.1%), leve en 37 (40.2%), moderada en 6 (6.6%), severa en 2 casos (2.2%) y adherencias secundarias a enfermedad pélvica inflamatoria crónica (EPIC) en 12 casos (13%).

Se obtuvieron luego de la laparoscopia 60 embarazos, 46 de ellos sin utilizar técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (16 con TE, 18 con IO y 12 con IIU), es decir una tasa de embarazo por paciente del 50% (46/92) sin FIV o ICSI.

Limitaciones del estudio: Es un estudio retrospectivo y carece de un grupo control para comparar estos resultados con otras estrategias como son indicar tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad (FIV/ICSI) directamente, luego de realizados los estudios básicos de infertilidad y catalogarlas como infertilidad inexplicada.

Palabras clave: Laparoscopia diagnóstica, infertilidad inexplicada, embarazo.

2015 to December 2018.

All of them underwent a diagnostic laparoscopy under general anesthesia and outpatient hospitalization.

Expectant treatment (ET) or ovulation induction (IO) was indicated after the study for 4 to 6 months and if pregnancy is not achieved, a maximum of 3 cycles of intrauterine insemination (IUI) and finally IVF or ICSI.

Results: *Ninety-two patients were included in the study, the mean age was 33.2 years (range 24-38) and the laparoscopic findings were: normal in 10 cases (10.9%), minimal endometriosis in 25 cases (27.1%), mild in 37 (40.2%), moderate in 6 (6.6%), severe in 2 cases (2.2%) and adhesions secondary to chronic pelvic inflammatory disease (PID) in 12 cases (13%).*

After laparoscopy, 60 pregnancies were obtained, 46 of them without using highly complex assisted reproduction techniques (16 with ET, 18 with OI and 12 with IUI), that is, a pregnancy rate per patient of 50% (46/92) without IVF or ICSI.

Study limitations: *It is a retrospective study and lacks a control group to compare these results with other strategies such as indicating highly complex assisted fertilization treatments (IVF / ICSI) directly, after performing the basic studies of infertility and cataloging them as unexplained infertility.*

Keywords: *Diagnostic laparoscopy, unexplained infertility, pregnancy.*

Introducción

La infertilidad inexplicada está definida en el Glosario Internacional de Infertilidad y Cuidado de la Fertilidad publicado en 2017 como aquella que afecta a parejas con función ovárica normal, al igual que las trompas de Falopio, útero, cérvix y pelvis, con una adecuada frecuencia coital además de una función testicular, aparato genitourinario y eyaculado también normales⁽¹⁾.

Los estudios que deben realizarse a una pareja que no ha logrado un embarazo luego de 1 año de relaciones sexuales sin utilizar un método anticonceptivo (6 meses cuando la mujer es mayor de 35 años) son aquellos para determinar si la mujer tiene una ovulación normal (determinaciones hormonales en fase folicular temprana y progesterona plasmática durante la fase lútea), una histerosalpingografía (HSG) para evaluar la cavidad uterina y la permeabilidad tubaria y finalmente un espermograma⁽²⁾.

Luego de estos estudios básicos de infertilidad normales, alrededor del 30% de las parejas son diagnosticadas como portadoras de infertilidad inexplicada⁽³⁾.

Sin embargo, debemos tener en cuenta, por ejemplo, que la HSG tiene limitada sensibilidad (0.65) y especificidad (0.85) para diagnosticar la permeabilidad de las trompas y la presencia de adherencias peritubarias⁽⁴⁾ y no brinda información sobre la presencia de alteraciones pelvianas compatibles con estadios tempranos de endometriosis⁽⁵⁾.

La laparoscopia diagnóstica puede ser de mucha utilidad en estos casos para completar el estudio de las trompas en busca de alteraciones sutiles en su anatomía (divertículos, ostiums y trompas accesorias, quistes de Morgagni o paratubáricos, fimosis, aglutinación de las fimbrias,

etc) que no se pongan en evidencia en la HSG y evaluar el resto de la pelvis en busca de lesiones endometriósicas típicas o atípicas o adherencias secundarias a una enfermedad pelviana inflamatoria que tampoco pueden detectarse en los estudios por imágenes.

La Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) sugiere la laparoscopia diagnóstica en pacientes jóvenes, con más de 3 años de infertilidad y el resto de los estudios normales⁽²⁾ y las guías del Instituto Nacional de Salud de Inglaterra (NICE) sugieren realizar una laparoscopia diagnóstica en las pacientes infértiles si se sospechan co-morbilidades⁽⁶⁾.

Existen publicaciones en la bibliografía como la de Ochoa y col.⁽⁷⁾ que realizaron laparoscopia diagnóstica a 92 pacientes con 2 años o más de infertilidad luego de 4 ciclos de inducción de ovulación con citrato de clomifeno y encontraron patología pelviana en el 64.1% de los casos (endometriosis 48.9%, adherencias pelvianas 32.6% y enfermedad tubaria 1.1%).

De Cicco y col.⁽⁸⁾ estudiaron 170 pacientes con diagnóstico de infertilidad inexplicada realizándoles laparoscopia e histeroscopia encontrando con este estudio combinado patologías en el 49,4% de los casos, siendo las lesiones endometriósicas y las alteraciones peritubo-ováricas las más frecuentes.

Evidentemente, teniendo en cuenta estos datos, no se puede rotular a una pareja como portadora de una infertilidad inexplicada cuando existen patologías como la endometriosis (sobre todo en los estadios tempranos), la enfermedad pelviana inflamatoria crónica con la presencia de adherencias peritubo-ováricas o las alteraciones sutiles de la anatomía tubaria (divertículos, trompas y ostiums accesorios, quistes paratubáricos, etc.) que no

se pueden diagnosticar con los exámenes ginecológicos o los estudios con imágenes que se solicitan habitualmente (ecografía intravaginal, sonohisterografía, etc. y que sin duda afectan a la fertilidad.

Indicar tratamientos de fertilización asistida de baja y alta complejidad (inseminación intrauterina y FIV/ICSI) en estos casos con diagnóstico de “supuesta” infertilidad inexplicada suponen un gasto económico, pérdida de tiempo y frustración para estas parejas que puede evitarse profundizando el diagnóstico con una laparoscopia, que nos permite, además del diagnóstico, tratar la patología en caso de existir.

OBJETIVO

Primario: Describir los hallazgos obtenidos en una laparoscopia diagnóstica realizada a pacientes con aparente infertilidad inexplicada.

Secundario: Analizar los embarazos obtenidos luego de la laparoscopia diagnóstica de manera espontánea o con inducción de ovulación (Citrato de Clomifeno o Letrozole), inseminación intrauterina o fertilización asistida de alta complejidad (FIV/ICSI) (FIV/ICSI).

MATERIALES Y METODOS

Estudio retrospectivo descriptivo
Se estudiaron 92 pacientes durante el período comprendido entre enero de 2015 y diciembre de 2018, que cumplían con los siguientes criterios de inclusión:

- 1- Igual o menores de 38 años.
- 2- Infertilidad de más de 2 años de evolución.
- 3- Ovulatorias o con inducción de ovulación hasta 6 meses.
- 4- Histerosalpingografía normal.
- 5- Factor masculino normal o teratozoospermia leve.

Se define como infertilidad a la falta de embarazo luego de 1 año de relaciones sexuales no protegidas.

Se consideró ovulatorias a las pacientes que presentaban ciclos regulares con dosis hormonales normales (FSH, LH, PRL Plasmática, Estradiol Basal, Hormona Antimulleriana, TSH, T4 libre y ATPO), progesterona plasmática en fase lútea media ovulatoria (> de 10 ng/ml) y/o monitoreos de desarrollo folicular por ecografía ovulatorias ya sea en ciclos espontáneos o inducidos durante no más de 6 meses.

Se definió a una histerosalpingografía (HSG) como normal cuando se observó una cavidad uterina sin alteraciones, con trompas de aspecto normal, sin evidencia de obstrucción y con pasaje bilateral de la sustancia de contraste a la cavidad peritoneal⁽⁹⁾.

Para la evaluación del factor masculino se utilizaron los parámetros descritos en el Manual de la OMS publicado en 2010⁽¹⁰⁾, incluyéndose pacientes con factor masculino normal o teratozoospermias leve (morfología normal: igual o mayor del 3%).

Fueron criterios de exclusión: HSG patológica, patología anexial en ecografías previas, diagnóstico previo de endometriosis ovárica o pelviana, cirugía anexial o pelviana previa y factor masculino moderado o severo.

Se efectuó a todas ellas una laparoscopia bajo anestesia general e internación ambulatoria. Durante los procedimientos se realizó cromotubación con azul de metileno, destrucción de las lesiones típicas y atípicas de endometriosis con energía bipolar; fimbriólisis, salpingooforolisis y enterolisis en casos de endometriosis y enfermedad pelviana inflamatoria crónica (EPIC) con disección aguda y roma; corrección de las alteraciones de la anatomía tubaria (divertículos, quistes paratubáricos, hidátides de Morgagni quísticas, fimosis

y/o aglutinación de las fimbrias, etc) y miomectomías en los casos con miomas intramurales y subserosos que se consideró pudieran producir infertilidad o afectar la evolución de embarazos futuros.

Todos los procedimientos laparoscópicos fueron realizados por el mismo equipo quirúrgico utilizando la misma metodología y criterios diagnósticos y terapéuticos. El protocolo de tratamiento utilizado para este grupo de pacientes luego de la laparoscopia fue tratamiento expectante o inducción de ovulación con citrato de clomifeno o letrozole según las características endócrinas de las pacientes por 4 a 6 meses, luego un máximo de 3 ciclos de inseminación intrauterina y finalmente en caso de no lograrse el embarazo con los tratamientos previos, fertilización asistida de alta complejidad (FIV/ICSI).

RESULTADOS

El promedio de edad de las 92 pacientes estudiadas fue de 33,2 años (rango 24-38) y los hallazgos fueron: normales en 10

casos (10.9%), endometriosis mínima 25 casos (27.1%), leve en 37 (40.2%), moderada en 6 (6.6%), severa en 2 casos (2.2%) y adherencias compatibles con enfermedad pelviana inflamatoria (EPIC) en 12 casos (13%). Tabla 1.

Se registraron 60 embarazos en las 92 pacientes estudiadas (65.2%), 5 en las 10 pacientes con laparoscopias normales (50%), 46 en las 70 pacientes con diagnóstico de endometriosis (65.7%) y 9 en las 12pacientes en la que se diagnosticó EPIC (75%). Tabla 2.

En cuanto a los embarazos registrados según el tipo de tratamiento utilizado, hubieron 16 embarazos luego de ciclos espontáneos (26.7%), 18 con inducción de la ovulación (30%), 12 con inseminación intrauterina (20%) y 14 en las pacientes que realizaron FIV/ICSI (23.3%) Tabla 3.

De los 60 embarazos registrados, 46 se obtuvieron sin apelar a técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (16 con CE, 18 con IO y 12 con IIU), es decir una tasa de embarazo por paciente del

Tabla 1. Hallazgos laparoscópicos

Pacientes	n	%
Normales	10	10,9
Endometriosis	70	76,1
Mínima	25	27,1
Leve	37	40,2
Moderada	6	6,6
Severa	2	2,2
EPIC	12	13
Total	92	100

Tabla 2. Embarazos post laparoscopia

Pacientes	n	embarazos	%
Normales	10	5	50
Endometriosis	70	46	65,7
EPIC	12	9	75
Total	92	60	65,2

Tabla 3. Embarazos según el tipo de tratamiento

Pacientes (n)	TE	IO	IU	FIV/ICSI	TOTAL (%)
Normales (n: 10)	1	1	3	-	5 (50%)
E. Mínima (n: 25)	1	7	5	7	20 (80%)
E. Leve (n: 37)	8	8	4	3	23 (62.2%)
E. Moderada (n: 6)	2	-	-	-	2 (33.3%)
E. Severa (n: 2)	1	-	-	-	1 (50%)
EPIC (n: 12)	3	2	-	4	9 (75%)
Total (n: 92)	16	18	12	14	60 (65,2%)
TE: Tratamiento Expectante, IO: Inducción de Ovulación, IU: Inseminación intrauterina					

50% (46/92) luego de la laparoscopia y con el protocolo terapéutico descrito anteriormente.

DISCUSION

En el presente estudio, luego de una laparoscopia diagnóstica, en pacientes con una aparente infertilidad inexplicada, se pudo diagnosticar endometriosis en diferentes estadios y enfermedad pelviana inflamatoria crónica, pudiendo esclarecer el diagnóstico real y quitando el rótulo de ESCA, cuando realmente no lo era.

Se debe considerar que son pacientes que concurren a una clínica privada de infertilidad por lo que la prevalencia de la endometriosis es alta, los resultados podrían ser diferentes si este estudio se hiciera a nivel hospitalario donde seguramente se incrementaría la prevalencia de pacientes con EPIC.

Luego de la laparoscopia 60 pacientes de las 92 en incluidas en el estudio lograron embarazarse (65,2%) y 46 de las 92(50%) sin necesidad de apelar a técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

Si bien este es un estudio retrospectivo y carece de un grupo control para comparar estos resultados con otras estrategias como son indicar tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad (FIV/ICSI) directamente luego de realizados los

estudios básicos de infertilidad, estos datos apoyan la estrategia de profundizar en el diagnóstico con una laparoscopia diagnóstica en estas pacientes con una “aparente” infertilidad inexplicada.

Por otra parte, las laparoscopias fueron realizadas por el mismo equipo quirúrgico y con el mismo criterio diagnóstico y terapéutico lo que disminuye la posibilidad de sesgo en la interpretación de los hallazgos.

Creemos que esta estrategia es útil en mujeres jóvenes, menores de 38 años, y luego de 2 años de infertilidad. En mujeres mayores a esa edad no es conveniente “perder tiempo” con otros estudios y en esos casos sí indicar tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad para evitar el impacto de la edad sobre la calidad genética de los ovocitos.

La laparoscopia es una intervención quirúrgica mínimamente invasiva que, si bien puede realizarse en forma ambulatoria, debe llevarse a cabo en un ámbito hospitalario, con anestesia general y es un procedimiento que implica una agresión física a las pacientes y no es carente de complicaciones⁽¹⁾.

La fertilización asistida de alta complejidad, que es el tratamiento alternativo que muchas veces se propone en su lugar, también requiere una sedación para la aspiración folicular y tiene complicaciones

como son el síndrome de hiperestimulación ovárica⁽¹²⁾, hemoperitoneo post-punción y finalmente el embarazo múltiple⁽¹³⁾.

Además, son tratamientos que tienen un costo económico elevado y que si bien gracias a la ley de Reproducción Médicamente Asistida sancionada en Argentina en 2013⁽¹⁴⁾ su acceso está garantizado a las parejas infértiles sin costo, éste sí tiene que ser absorbido por el sistema de salud público o privado.

Por otra parte, la tasa de embarazo por transferencia luego de tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad (FIV/ICSI) publicada por el Registro Argentino de Fertilización Asistida (RAFA) en 2017 fue de 23.2%⁽¹⁵⁾ y que puede ser algo mayor si se tiene en cuenta la tasa acumulativa de embarazo, es decir contando los embarazos obtenidos por la transferencia de los embriones descongelados en los casos que los hubiera, este porcentaje de embarazos por paciente es bastante menor al obtenido en este estudio que fue del 50% (46 embarazos en 92 pacientes) luego de la laparoscopia y sin técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

Hay que tener en cuenta, además, que mediante esta intervención se puede restituir la normalidad de la pelvis y las trompas para poder intentar nuevos embarazos en el futuro sin tener que recurrir a nuevos tratamientos de alta complejidad.

CONCLUSION

En base a estos resultados no se puede rotular a una pareja como portadora de una infertilidad inexplicada o sin causa aparente sin antes (en las mujeres jóvenes) realizar una laparoscopia diagnóstica y eventualmente aprovechando la oportunidad, una histeroscopia diagnóstica, para evaluar en forma conjunta y en el mismo acto quirúrgico la cavidad uterina y la pelvis (el útero, las trompas y el peritoneo pelviano) en busca de patología causante de infertilidad y además, en caso de hallarla y de poder solucionarla, se logra una tasa de embarazo por paciente muy satisfactoria y que no parece inferior a la que se pudiera lograr con ciclos de alta complejidad desde el vamos y sin la observación laparoscópica previa de la pelvis.

REFERENCIAS

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *FertilSteril* 2017; 108:393–406.
2. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *FertilSteril*. 2015;103(6):e44–e50. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.019
3. Collins JA, Van Steirteghem A. Overall prognosis with current treatment of infertility. *HumReprod Update* 2004; 10:309–16.
4. Swart P, Mol BW, van der Veen F, van Beurden M, Redekop WK, Bossuyt PM. The accuracy of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. *FertilSteril*. 1995;64(3):486–491. doi:10.1016/s0015-0282(16)57781-4
5. Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist?. *HumReprod*. 2006;21(8):1951–1955. doi:10.1093/humrep/del135
6. NICE Guidelines. Investigation of suspected tubal and uterine abnormalities <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/chapter/Recommendations#unexplained-infertility>
7. Capelo FO, Kumar A, Steinkampf MP, Azziz R. Laparoscopic evaluation following

- failure to achieve pregnancy after ovulation induction with clomiphene citrate. *FertilSteril.* 2003;80(6):1450-1453. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.05.012
8. De Cicco S, Tagliaferri V, Selvaggi L, et al. Expectant management may reduce overtreatment in women affected by unexplained infertility confirmed by diagnostic laparoscopy. *ArchGynecolObstet.* 2017;295(2):427-433.
 9. Lavy Y, Lev-Sagie A, Holtzer H, Revel A, Hurwitz A. Should laparoscopy be a mandatory component of their fertility evaluation in infertile women with normal hysterosalpingogram or suspected unilateral distal tubal pathology?. *Eur J ObstetGynecolReprod Biol.* 2004;114(1):64-68. doi: 10.1016/j.ejogrb.2003.09.035
 10. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *HumReprodUpdate.* 2010;16(3):231-245. doi:10.1093/humupd/dmp048
 11. Fuentes MN, Rodríguez-Oliver A, Naveiro Rilo JC, Paredes AG, Aguilar Romero MT, Parra JF. Complications of laparoscopic gynecologic surgery. *JLS.* 2014;18(3):e2014.00058. doi:10.4293/JLS.2014.00058
 12. Klemetti R, Sevón T, Gissler M, Hemminki E. Complications of IVF and ovulation induction. *HumReprod.* 2005;20(12):3293-3300. doi:10.1093/humrep/dei253
 13. Murray SR, Norman JE. Multiple pregnancies following assisted reproductive technologies--a happy consequence or double trouble?. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014;19(4):222-227. doi: 10.1016/j.siny.2014.03.001
 14. REPRODUCCION MEDICAMENTE ASISTIDA. Ley 26862 (2013) <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-26862-216700>
 15. REGISTRO ARGENTINO DE FERTILIZACIÓN ASISTIDA - RAFA RESULTADOS 2017 <http://www.samer.org.ar/rafa.asp>

Inyección de plasma rico en plaquetas intraovárico en pacientes pobres respondedoras

Injection of intraovarian platelet-rich plasma in poor responders

L Devenuto ¹; G Rey Valzacchi ²; M Ercolano¹; O Etchegoyen³

¹ Médico/a Staff, Centro de Medicina Reproductiva Procreate, Buenos Aires, Argentina

² Director Médico, Centro de Medicina Reproductiva Procreate, Buenos Aires, Argentina

³ Director de Laboratorio Biológico, Centro de medicina Reproductiva Procreate, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿se pueden mejorar los parámetros de reserva ovárica y la recuperación de ovocitos en pacientes bajas respondedoras que realizan inyección intraovárica de plasma rico en plaquetas (PRP)?

Respuesta resumida: la inyección de PRP intraovárica mejoró los parámetros de reserva ovárica en pacientes bajas respondedoras en un lapso de 3 meses, sin aumentar el número de ovocitos recuperados.

Lo que ya se sabe: se postula que el PRP podría ser beneficioso para retrasar la atresia del folículo y la degeneración de los ovocitos, además de promover el desarrollo de los folículos primordiales y primarios hasta el estadio preantral.

Diseño del estudio: estudio de cohorte prospectivo.

Materiales y métodos: se incluyeron 61 pacientes bajas respondedoras que realizaron inyección de PRP entre octubre 2021 a marzo 2022 en nuestra institución, comparando la función ovárica previa y posterior

ABSTRACT

Study question: *Is it possible to improve ovarian reserve parameters and oocyte retrieval in low responders who undergo intraovarian injection of platelet-rich plasma (PRP)?*

Summary answer: *intraovarian PRP injection improved ovarian reserve parameters in low responders within 3 months, without increasing the number of oocytes retrieved.*

What is already known: *it is postulated that PRP could be beneficial in delaying follicle atresia and oocyte degeneration, as well as promoting the development of primordial and primary follicles up to the pre-antral stage.*

Study design: *prospective cohort study.*

Materials and methods: *we included 61 low responder women who underwent PRP injection between October 2021 to March 2022 in our institution, comparing pre and post PRP ovarian function. In addition, we studied IVF outcomes of a subgroup of patients after*

a la misma. Además, se compararon los resultados de fertilización asistida de un subgrupo de pacientes luego de la intervención con respecto a la última previa.

Resultados: se observó una mejoría de la reserva ovárica con respecto a los valores previos: FSH (14,25 vs. 10,28, $p=0,04$), HAM (0,43 vs. 0,54, $p=0,11$), conteo de folículos antrales (3,86 vs. 5,57, $p=0,001$); así como también un mayor número de embriones evolutivos (0,65 vs. 1,4, $p=0,01$); sin impacto en el número de ovocitos recuperados ni en el número de embriones producidos.

Limitaciones: estudio con pequeño tamaño muestral y corto período de seguimiento, sin resultados de transferencias embrionarias.

Implicancias: la inyección de PRP intraovárico permitiría restaurar la función ovárica y postularse como una alternativa a la ovodonación en pacientes con baja reserva ovárica que no acepten dicho tratamiento y dentro de un marco experimental. Faltan ensayos controlados randomizados que avalen estos hallazgos.

Palabras clave: plasma rico en plaquetas, reserva ovárica, fertilización in vitro.

the intervention with respect to the latest previous one.

Results: *an improvement in ovarian reserve was observed in relation to previous values: FSH (14.25 vs. 10.28, $p=0.04$), AMH (0.43 vs. 0.54, $p=0.11$), antral follicle count (3.86 vs. 5.57, $p=0.001$); as well as a higher number of evolved embryos (0.65 vs. 1.4, $p=0.01$); with no impact on the number of oocytes retrieved or the number of embryos produced.*

Limitations: *the main limitation of this study is the small sample size, the short follow-up period, and the fact that it does not evaluate pregnancy outcomes after embryo transfers.*

Implications: *although experimental, intraovarian PRP could restore ovarian function and be postulated as an alternative to oocyte donation in patients with low ovarian reserve who do not accept this treatment. There is a lack of randomized controlled trials to support these findings.*

Keywords: *platelet-rich plasma, ovarian reserve, in vitro fertilization.*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la insuficiencia ovárica producto del envejecimiento ovárico de mujeres con edad reproductiva avanzada, constituye una de las principales causas de infertilidad en el mundo^[1]. La misma implica una disminución tanto en la cantidad como en la calidad de los ovocitos, con el consecuente compromiso en los resultados de tratamientos de fertilización asistida, en lo que respecta a las bajas tasas de fertilización y de blastulación y las altas tasas de aneuploidías embrionarias^[2].

Las mujeres denominadas “pobres respondedoras”, definidas por la combinación de ciertos parámetros de reserva ovárica disminuidos y baja recuperación de ovocitos tras la estimulación ovárica, presentan un envejecimiento ovárico acelerado^[3]. Esta población representa entre el 9 y el 24% de pacientes que realizan fertilización in vitro (FIV), lo que implica que hasta una de cada cuatro pacientes tendrá un mal pronóstico reproductivo^[4,5].

Recientemente se han introducido diferentes enfoques orientados a mejorar este pronóstico, sin embargo, aún no se ha logrado identificar estrategias lo suficientemente efectivas. Dentro de un marco experimental, con el fin de promover la activación de folículos y aumentar el número de ovocitos recuperados, se ha descrito la fragmentación ovárica con o sin activación in vitro y posterior autotrasplante^[6]; así como también el trasplante ovárico autólogo de células madre^[7]. Dichas técnicas son invasivas y aún no se han desarrollado ensayos randomizados que demuestren su eficacia.

En la misma línea, un procedimiento mucho menos invasivo y que también se encuentra en etapa de investigación, es la inyección intraovárica de plasma

rico en plaquetas (PRP). Se trata de un concentrado derivado de sangre entera centrifugada que contiene hasta siete veces más plaquetas con respecto a las del suero circulante, y sus propiedades regenerativas radican en sus altas concentraciones de factores de crecimiento como: TGF- β (transforming growth factor- β), IGF-1 e IGF-2 (insulin-like growth factors 1 and 2), VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) y HGF (hepatocyte growth factor)^[8]. Varios de estos factores promueven la cicatrización y la regeneración de los tejidos al inducir la quimiotaxis, la migración y la diferenciación celular. Además, contribuyen a la angiogénesis y a los cambios inflamatorios que desempeñan un papel fundamental en la reparación y regeneración de los tejidos^[9,10].

Se cree que el PRP podría ser beneficioso para retrasar la atresia del folículo y la degeneración de los ovocitos^[8], además de promover el desarrollo de los folículos primordiales y primarios hasta el estadio preantral^[11]. Otro de los beneficios a destacar es que, como preparado autógeno, el tratamiento con PRP elimina los riesgos de enfermedades transmisibles y el rechazo inmunológico^[12].

El objetivo del presente estudio fue caracterizar los parámetros de reserva ovárica y los resultados de la FIV en una cohorte de mujeres bajas respondedoras tratadas con inyección intraovárica de PRP autólogo.

Como hipótesis nos planteamos que la inyección intraovárica de plasma rico en plaquetas (PRP) puede mejorar los parámetros de reserva ovárica y la recuperación de ovocitos en pacientes bajas respondedoras que realizan un tratamiento de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio y selección de pacientes

Estudio observacional de cohorte prospectivo de parámetros de reserva ovárica y de resultados de FIV en mujeres bajas respondedoras luego de la inyección intraovárica de PRP autólogo. El mismo fue llevado a cabo en un Centro de Medicina Reproductiva de Buenos Aires, desde octubre de 2021 a marzo de 2022.

Se incluyeron 61 pacientes menores a 45 años de edad, todas con antecedente de al menos un tratamiento de fertilización asistida con recuperación de menos de 5 ovocitos y/o perfil de baja reserva ovárica (Poseidon 1,2, 3 y 4).

La baja reserva ovárica fue definida como: hormona antimulleriana (HAM) <1 ng/ml y/o conteo de folículos antrales en fase folicular temprana <5.

Se excluyeron pacientes con enfermedad oncológica activa, antecedentes de quimio o radioterapia, enfermedad cardíaca grave, endometriosis ovárica y/o profunda, poliquistosis ovárica, enfermedad de transmisión sexual activa, múltiples cirugías pelvianas previas, trastorno conocido en la función plaquetaria, plaquetopenia moderada-severa, coagulopatías y tratamiento anticoagulante.

Se evaluó la función ovárica en cada paciente mediante estudios hormonales (FSH, LH, estradiol y HAM) y ecografía transvaginal con conteo de folículos antrales, comparando resultados previos (dentro de los 6 meses) y a los 3 meses posteriores al procedimiento. Además, en las pacientes que realizaron tratamiento de fertilidad de alta complejidad, se compararon los resultados de fertilización y desarrollo embrionario posteriores a la inyección de PRP con respecto al último tratamiento realizado antes de la misma.

Todas las mujeres incluidas en el estudio

firmaron un consentimiento informado previo, en el cual se aclaraba el enfoque experimental del procedimiento, así como también los posibles riesgos asociados, que debían aceptar. Los pacientes que decidieron participar

devolvieron a la clínica una copia firmada del formulario de consentimiento informado.

Procedimientos

Por cada paciente se extrajeron 60 ml de sangre en condiciones estériles de la vena antebraquial mediana entre hora y media y dos horas antes de la inyección intraovárica. En todos los casos se indicó no consumir aspirina durante 7 días previos al procedimiento y ayuno mínimo de 6 horas.

La sangre se colocó en dos tubos estériles de 50 ml con 7,5 ml de ACD-A (relación 1 vol ACD-A : 4 vol sangre). Se realizó doble centrifugación a 2000 y 2500 rpm, durante 6 y 10 min respectivamente. Se suspendió y homogeneizó el concentrado de plaquetas en 7,5 ml de plasma autólogo a una concentración de $1,5 \times 10^6$ /ul. Se agregó 2,5 ml de solución fisiológica dado que la dilución aumenta el efecto regenerativo y de neovascularización ya que diluye factores de crecimiento que inhiben esta función. Posteriormente se colocó la suspensión en heladera a 4°C durante 30 min y se activó con Cl_2Ca 22-25 mM al 10%, es decir para 10 ml se agregó 1 ml de Cl_2Ca . Todo el procesamiento de la muestra de sangre y preparación del PRP, se realizó en ambiente de acceso restringido, bajo condiciones de asepsia y empleando campana de flujo laminar.

Previo a la intervención, se realizó una evaluación del estado general de las pacientes mediante hemograma, coagulograma, función renal, electrocardiograma y serologías (HIV, hepatitis B, hepatitis C,

sífilis). Además, se evaluaron parámetros de reserva ovárica con perfil hormonal (FSH, LH, estradiol y HAM) y ecografía transvaginal con recuento de folículos antrales entre el segundo y el cuarto día del ciclo menstrual.

La inyección de PRP se realizó en todos los casos al menos 2 meses posteriores al último tratamiento de fertilidad fallido, en fase folicular (día 7 a 10 del ciclo menstrual). Se realizaron entre 1 a 3 aplicaciones consecutivas mensuales. La preparación de la paciente se realizó de acuerdo a protocolo de punción aspiración ovárica de nuestra institución, en litotomía dorsal bajo anestesia local o neuroleptoanestesia. En primera instancia se procedió a la visualización de ambos ovarios por ecografía transvaginal, accediendo a la porción central de los mismos mediante una aguja con lumen único de 17 GA/30 cm Cook®. Posteriormente se realizó la infusión gradual en el área subcortical y estromal, empleando 3 ml de PRP activado por ovario, a través de una jeringa de 5 ml conectada al tapón de silicona de la aguja. Aunque los ovarios de pacientes de edad materna avanzada y pobres respondedoras pueden ser pequeños y fibróticos, la inyección se logró mediante la creación de nuevos planos mediante la distensión y la inyección en múltiples sitios. El tiempo máximo empleado fue de 20 minutos.

Después del procedimiento, las pacientes fueron llevadas a la sala de recuperación y dadas de alta el mismo día después de un período de observación de 30-40 minutos. Se indicó antibioticoprofilaxis de acuerdo a protocolo de punción folicular de nuestra institución. Luego de la intervención se examinó la pelvis minuciosamente mediante ecografía, con el fin de comprobar integridad vascular total. Se recomendó la posición supina durante los 15 minutos

posteriores a la infusión.

Durante el tercer mes posterior a la inyección, se realizó un monitoreo de la función ovárica mediante perfil hormonal (FSH, LH, estradiol y HAM) y conteo de folículos antrales por ecografía transvaginal, entre días 2 a 5 del ciclo menstrual.

De acuerdo a la respuesta obtenida (al menos 3 folículos antrales visualizados por ecografía transvaginal) y a los deseos de la pareja, se indicó un tratamiento de fertilidad de alta complejidad en el tercer ciclo menstrual posterior al procedimiento, empleando un protocolo con antagonistas de GnRH y 300 UI de gonadotrofinas (filitropina alfa y/o gonadotrofina menopáusica humana) desde el día 2 del ciclo. Se prescribió antagonista de GnRH con folículo de al menos 14 mm de diámetro y/o estradiol de 300-400 pg/ml. La descarga de la ovulación fue desencadenada con gonadotrofina coriónica humana recombinante con folículo de al menos 18 mm de diámetro. Se realizó la punción aspiración ovocitaria a las 36 horas de la descarga e inseminación por ICSI.

Análisis estadístico

Se describieron las variables cuantitativas mediante media y desvío estándar. Se compararon las diferencias en las variables cuantitativas entre los grupos con t-test. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a las probabilidades menores a 0.05. El análisis estadístico se realizó con el software Epi Info 7.2.5.0.

RESULTADOS

Las 61 pacientes incluidas en el estudio tenían una edad promedio de 39,85 años (33-44) al momento del procedimiento, habían realizado entre 1 a 6 estímulos previos para alta complejidad (media de 1,72) y el 78,68% (48) de ellas realizó una única

inyección de PRP. El 9,83% (6 pacientes) realizó dos inyecciones mensuales consecutivas y el otro 11,47% (7 pacientes), 3 inyecciones mensuales consecutivas.

En lo que respecta a la función ovárica, se observó una mejoría en los valores de HAM, FSH y en el conteo de folículos antrales posterior a la inyección de PRP, resultando estos dos últimos parámetros estadísticamente significativos (Tabla 1). Dado el reducido número de pacientes que realizaron dos o tres infusiones consecutivas, no se analizaron resultados

estratificando por dicha variable.

Se realizó un subanálisis de los resultados de acuerdo a diferentes rangos etarios categorizados como grupo 1 (menores a 40 años), grupo 2 (40 a 42 años) y grupo 3 (mayores a 42 años). Si bien, las pacientes más beneficiadas en lo que respecta a la función ovárica fueron las menores de 42 años, la diferencia estadísticamente significativa en los valores de FSH y recuento de folículos antrales, solo se mantuvo en el grupo 1 (16,36 vs. 8,33, $p=0,04$; y 3,73 vs. 6,2, $p=0,007$) (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados hormonales y conteo de folículos antrales

	Pre PRP	Post PRP	P
FSH (mUI/ml)	14,25 ± 8,70	10,28 ± 6,80	0,04
LH (mUI/ml)	6,86 ± 3,27	7 ± 7,28	0,90
Estradiol (pg/ml)	58,95 ± 66,99	65,10 ± 55	0,70
HAM (ng/ml)	0,43 ± 0,32	0,54 ± 0,45	0,11
Conteo folículos antrales	3,86 ± 2,28	5,57 ± 2,98	0,001

Tabla 2. Resultados hormonales y conteo de folículos antrales por edad

Grupo	Pre PRP	Post PRP	P
Grupo 1 (<40 años)			
FSH (mUI/ml)	16,36±10,26	8,33±3,92	0,04
LH (mUI/ml)	7,06±1,81	5,67±2,66	0,26
Estradiol (pg/ml)	44±18	49,73±25,68	0,69
HAM (ng/ml)	0,51±0,32	0,70±0,60	0,33
Conteo folículos antrales	3,73±2,78	6,2±3,27	0,007
Grupo 2 (40-42 años)			
FSH (mUI/ml)	14,66±8,16	9,57±5,49	0,17
LH (mUI/ml)	6,88±4,21	5,4±4,19	0,38
Estradiol (pg/ml)	47,87±20,57	69,34±63,17	0,31
HAM (ng/ml)	0,44±0,38	0,56±0,37	0,09
Conteo folículos antrales	4,22±1,09	5,77±3,34	0,13
Grupo 3 (>42 años)			
FSH (mUI/ml)	12,37±8,88	12,38±9,31	0,99
LH (mUI/ml)	6,72±3,17	9,72±11,04	0,34
Estradiol (pg/ml)	84,01±113,51	71,32±63,92	0,77
HAM (ng/ml)	0,28±0,23	0,29±0,24	0,84
Conteo folículos antrales	3,75±2,3	4,78±2,02	0,23

Al momento de escribir este trabajo, se realizaron 34 procedimientos de fertilización asistida, todos ellos se indicaron al tercer ciclo post inyección de PRP intraovárico. Se realizó un análisis de estos casos comparando los resultados de fertilización posteriores a la inyección de PRP con respecto al último tratamiento de alta complejidad previos a la misma en cada caso. La edad promedio de estas pacientes fue de 39,64 años (33-44). Se constataron 4 fallas de respuesta a la estimulación. Dentro de esta cohorte, hubo 6 pacientes que realizaron vitrificación de ovocitos para maternidad diferida; en el 86,95% (26 pacientes) de los casos se realizó ICSI y en el 13,04% (4 pacientes), FIV.

Se observó una mejoría significativa de la reserva ovárica con respecto a los valores previos (evaluada por FSH, HAM y conteo de folículos antrales); mientras que los resultados de fertilización previos y posteriores al procedimiento fueron similares.

De las pacientes que realizaron la punción aspiración folicular, el 93,33% (28 pacientes) tuvo al menos un ovocito en metafase II.

Como dato relevante, mientras que la cantidad de embriones producidos fue semejante, se obtuvo una mejoría significativa en el número de embriones evolutivos luego del tratamiento con PRP (Tabla 3).

No hubo complicaciones ni efectos adversos en los casos realizados durante el período de este estudio.

DISCUSIÓN

La inyección intraovárica de PRP fue introducida recientemente como una alternativa a la donación de óvulos en pacientes con pobre pronóstico reproductivo^[13].

En lo que respecta a su mecanismo de acción, se proponen dos hipótesis: la más controvertida introduce el concepto de neo-ovogénesis sugiriendo la presencia de células madre ováricas como fuente de ovocitos en ovarios adultos^[14]. Numerosos estudios han demostrado que es posible obtener células germinales mitóticamente activas de tejido ovárico adulto sano en ratones y humanos^[15,16]; sin embargo, no hay evidencia de que la reactivación espontánea de las células madre se produzca de forma natural in vivo en el ovario humano adulto.

Tabla 3. Resultados en pacientes sometidas a FIV

	Pre PRP	Post PRP	P
FSH (mUI/ml)	16,44 ± 9,63	8,89 ± 4,13	0,01
LH (mUI/ml)	6,58 ± 4,13	5,91 ± 3,75	0,64
Estradiol (pg/ml)	44,15 ± 20,17	43,6 ± 22,7	0,95
HAM (ng/ml)	0,43 ± 0,27	0,64 ± 0,40	0,05
Conteo de folículos antrales	4,52 ± 2,12	6,30 ± 2,81	0,01
Número de ciclos de FIV	2,09 ± 1,25	1 ± 0	0,001
Número de ovocitos recuperados	3,32 ± 2	3,04 ± 2,4	0,56
Número de MII	2,91 ± 1,86	2,62 ± 2,12	0,47
Número de ovocitos inseminados	3,2 ± 2	2,9 ± 1,99	0,60
Número de embriones fertilizados en 2 PN	2 ± 1,65	1,9 ± 1,41	0,83
Número de embriones fertilizados anormales	0,4 ± 0,59	0,2 ± 0,52	0,21
Número de embriones producidos	1,95 ± 1,60	1,7 ± 1,41	0,59
Número de embriones evolutivos	0,65 ± 0,81	1,4 ± 1	0,01

Otra de las hipótesis sugiere que el PRP permitiría activar el desarrollo y maduración de folículos primordiales “durmientes” o quiescentes, aumentando el pool de folículos ovulatorios [14].

Los factores de crecimiento derivados de PRP incluyen múltiples proteínas reguladoras que se unen a los receptores de la membrana celular y median importantes mensajes químicos. Mediante esta interacción se desencadenan mecanismos de señalización inter e intracelulares que dirigen el crecimiento, proliferación y diferenciación celular [13]. A diferencia de las hormonas, los factores de crecimiento del PRP actúan únicamente en la proximidad de su sitio de liberación, jugando un rol importante en la restauración del nicho ovárico, principalmente mediante la promoción de procesos fisiológicos de angiogénesis, proliferación y crecimiento, apoptosis, control de la inflamación y migración celular [17-20].

En la última década, se han reportado numerosos estudios que reportan que la inyección de plasma directamente en el ovario, permite aumentar la foliculogénesis y restaurar la función ovárica y el perfil hormonal, con la consecuente mejoría en la recuperación de ovocitos en pacientes sometidas a fertilización asistida [21]. Los primeros resultados con la utilización de esta técnica fueron reportados por Pantos et al, quienes demostraron la posibilidad de restaurar la función ovárica en una cohorte de 8 mujeres perimenopáusicas sometidas a FIV, con recuperación ovocitaria exitosa [22].

En este estudio investigamos si la inyección intraovárica de PRP permite mejorar la reserva ovárica y los resultados de FIV en pacientes bajas respondedoras. Demostramos una mejoría en la función ovárica de estas pacientes mediante una

disminución en los valores de FSH y aumento de la HAM, así como también un incremento en el número de folículos antrales visualizados por ecografía. Dichos hallazgos son similares a los reportados por un estudio reciente de 510 mujeres bajas respondedoras, en el que se compararon los valores hormonales y conteo de folículos antrales pre y post inyección de PRP, resultando en una disminución de FSH (20,6 UI/ml vs. 16,4 UI/ml; $p < 0,001$) aumento de HAM (0,35 ng/ml vs. 0,53 ng/ml; $p < 0,001$) y aumento en el conteo de folículos antrales (2,6 vs. 4,2; $p < 0,001$) [3]. Este mismo estudio evaluó el impacto de diferentes variables en los resultados obtenidos, y calculó la edad de 40 años como punto de corte para las pacientes que no se beneficiarían del PRP debido a la ausencia de respuesta ovárica (sensibilidad de 61,54 y especificidad de 73,77). En nuestro estudio, todas las pacientes presentaron un aumento en el recuento de folículos antrales luego del procedimiento; sin embargo tanto este parámetro como el valor de FSH sólo mejoraron de manera significativa en las pacientes de menos de 40 años de edad.

Creemos que podría ser de utilidad realizar un ajuste de resultados por otras variables, como por ejemplo la reserva ovárica basal, lo cual permitiría seleccionar dentro de la muestra las mejores candidatas para esta técnica. Para ello, necesitamos poder incluir un mayor número de pacientes.

Un ensayo prospectivo controlado no randomizado que comparó 46 pacientes con baja reserva ovárica que realizaron la inyección de PRP (grupo estudio) vs. 37 que no lo hicieron (grupo control), demostró a los 3 meses de seguimiento una mejora significativa en la FSH, HAM y conteo de folículos antrales en el grupo de estudio, mientras que no hubo cambios en el grupo de control [8]. Otros investigadores

experimentaron hallazgos similares^[21,23-26].

En lo que respecta a los resultados de fertilización asistida, si bien el número de pacientes incluidas es bajo, no pudimos demostrar una mejora en el número de ovocitos recuperados, número de ovocitos en metafase II, tasa de fertilización, número de embriones fertilizados en 2 pronúcleos y número de embriones producidos. Sin embargo, fue llamativamente mayor el número de embriones evolutivos en el grupo que realizó la intervención. Este factor podría explicarse por la hipótesis de la coexistencia de células madre en el ovario como fuente de ovocitos nuevos, susceptibles de ser activadas mediante los factores proangiogénicos, proliferativos y proinflamatorios proporcionados por las plaquetas, como el VEGF y la esfingosina 1 fosfato^[27]. Por lo tanto, podemos inferir que pese a que no detectamos un impacto a nivel cuantitativo en lo que respecta al número de ovocitos recuperados y tasa de fertilización post PRP, obtuvimos un mayor porcentaje de embriones de buena calidad aptos para transferir y/o congelar luego del procedimiento.

A diferencia de nuestros hallazgos, Cakiroglu et al., obtuvo un aumento significativo en el número de ovocitos recuperados (2,2 vs. 3,4; $p < 0.001$), número de ovocitos en metafase II (1,7 vs. 2,7; $p < 0,001$), tasa de fertilización (57,6 vs. 66,9; $p 0,008$) y número de embriones fertilizados en 2 pronúcleos (1,3 v. 2,1; $p < 0,001$)^[3]. Cabe destacar que en este último estudio sólo se compararon resultados de pacientes en las cuales se habían recuperado ovocitos en la punción, sin incluir ni reportar los casos de falla de recuperación ovocitaria, lo cual puede ser causa de sesgo. En nuestro trabajo, incluimos en el análisis de datos aquellos casos en los cuales no se habían recuperado ovocitos. Otros estudios

también reportaron mejoría en los parámetros de fertilización asistida, así como también disminución en las tasas de cancelación^[21,24,28].

Con respecto a la muestra de este estudio, dado que se trata de una técnica que está en etapa de investigación, decidimos incluir a pacientes con indicación de ovodonación pero que no acepten dicha alternativa; por lo cual seleccionamos específicamente a aquellas categorizadas como Poseidon 3 o 4, con la particularidad de haber realizado al menos un intento de alta complejidad con una respuesta subóptima (menos de 5 ovocitos recuperados). A la vez, incluimos aquellas que realizaron 2 o más tratamientos de alta complejidad con esta misma respuesta, independientemente de la reserva ovárica; esto es porque en nuestra institución luego de dos intentos fallidos con óvulos propios, la principal sugerencia es la ovodonación.

La decisión de esperar 3 ciclos post procedimiento se basó en el conocimiento de que el desarrollo folicular lleva un promedio de 90 a 120 días desde el reclutamiento del folículo primordial hasta el desarrollo del folículo antral, sosteniendo la hipótesis de que el PRP permitiría estimular el desarrollo de folículos pre antrales y retrasar la atresia.

Una de las fortalezas de este estudio es su naturaleza prospectiva así como también la utilización de un protocolo unificado, con preparación del PRP 2 horas antes del procedimiento, realizado por el mismo operador. A la vez, destacamos el diseño comparativo, que permitió incluir a la misma cohorte de pacientes como su grupo control, controlando de esta forma las diferencias en las variables demográficas.

Una de las principales limitaciones es el bajo tamaño muestral y el corto período de seguimiento, ya que sólo evaluamos el

resultado de la primera FIV, desconociendo hasta esta instancia las implicancias a largo plazo. Por otro lado, sería interesante conocer si el aumento en el número de embriones evolutivos impacta en las tasas de embarazo y nacidos vivos posteriores a las transferencias embrionarias, dato que no contamos al momento de escribir este trabajo pero que nos proponemos analizar en el futuro cercano.

Finalmente, es importante destacar que existe en la literatura una amplia heterogeneidad en los protocolos de esta técnica, en lo que respecta a múltiples factores como: volumen de sangre procesada, volumen de plasma inyectado, método de preparación/activación de plaquetas, vía de inyección de plasma, momento del ciclo, número de infusiones a realizar, seguimiento, tiempo hasta indicar tratamiento de fertilización asistida, definición de baja respondedora. Asimismo, la evidencia por el momento se

basa principalmente en series de casos, o bien en estudios piloto prospectivos controlados y no controlados, todos no randomizados. Por estos motivos consideramos que dicha técnica debería ser considerada por el momento experimental.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio, la inyección de PRP intraovárica mejoró los parámetros de reserva ovárica en pacientes bajas respondedoras en un lapso de 3 meses. No se obtuvo una mejoría en resultados de fertilización asistida en términos cuantitativos, aunque hubo un mayor porcentaje de embriones evolutivos posterior a la intervención. El reducido número de participantes nos impide establecer una relación de causalidad entre el tratamiento con PRP y la calidad de los embriones. Se requieren ensayos controlados aleatorios más amplios para validar nuestros hallazgos.

REFERENCIAS

1. Female age-related fertility decline. Fertility and Sterility. 2014. pp. 633–634. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.12.032
2. Kasapoğlu I, Seli E. Mitochondrial Dysfunction and Ovarian Aging. Endocrinology. 2020;161. doi:10.1210/endocr/bqaa001
3. Cakiroglu Y, Yuceturk A, Karaosmanoglu O, Kopuk SY, Korun ZEU, Herlihy N, et al. Ovarian reserve parameters and IVF outcomes in 510 women with poor ovarian response (POR) treated with intraovarian injection of autologous platelet rich plasma (PRP). Aging . 2022;14: 2513–2523. doi:10.18632/aging.203972
4. Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, Baroni E, Sapienza F, Cobellis L, et al. Management of poor ovarian responders in IVF. Reproductive BioMedicine Online. 2005. pp. 235–246. doi:10.1016/s1472-6483(10)60946-7
5. Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi N, Rienzi L, Ubaldi FM. What is new in the management of poor ovarian response in IVF? Current Opinion in Obstetrics & Gynecology. 2018. pp. 155–162. doi:10.1097/gco.0000000000000452
6. Devenuto L, Quintana R, Quintana T. activation of ovarian cortex and autologous transplantation: A novel approach to primary ovarian insufficiency and diminished ovarian reserve. Hum Reprod Open.

- 2020;2020. doi: 10.1093/hropen/hoaa046
7. Website. Available: Herraiz S, Romeu M, Buigues A, Martínez S, Díaz-García C, Gómez-Seguí I, Martínez J, Pellicer N, Pellicer A. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertil Steril*. 2018; 110:496–505.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.025> PMID:29960701
 8. Melo P, Navarro C, Jones C, Coward K, Coleman L. The use of autologous platelet-rich plasma (PRP) versus no intervention in women with low ovarian reserve undergoing fertility treatment: a non-randomized interventional study. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37: 855–863. doi: 10.1007/s10815-020-01710-z
 9. Dhurat R, Sukesh MS. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2014. p. 189. doi:10.4103/0974-2077.150734
 10. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi:10.3390/ijms21207794
 11. Hosseini L, Shirazi A, Naderi MM, Shams-Esfandabadi N, Borjian Boroujeni S, Sarvari A, et al. Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. *Reprod Biomed Online*. 2017;35: 343–350. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.04.007
 12. Park H-S, Ulin M, Cetin E. Ovarian Rejuvenation Using Platelet-Rich Plasma: a Promising Option for Women in Early Menopause to Have a Baby. *Reprod Sci*. 2020;27: 1983–1984. doi: 10.1007/s43032-020-00315-2
 13. Sills ES, Scott Sills E, Scott Sills E, Petersen JL, Rickers NS, Wood SH, et al. Regenerative Effect of Intraovarian Injection of Activated Autologous Platelet Rich Plasma: Serum Anti-Mullerian Hormone Levels Measured Among Poor-Prognosis In Vitro Fertilization Patients. *International Journal of Regenerative Medicine*. 2020. pp. 1–5. doi:10.31487/j.rgm.2020.01.02
 14. Seckin S, Ramadan H, Mouanness M, Kohansieh M, Merhi Z. Ovarian response to intraovarian platelet-rich plasma (PRP) administration: hypotheses and potential mechanisms of action. *J Assist Reprod Genet*. 2022;39: 37–61. doi: 10.1007/s10815-021-02385-w
 15. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol*. 2009;11: 631–636. doi: 10.1038/ncb1869
 16. White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med*. 2012;18: 413–421. doi: 10.1038/nm.2669
 17. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disorders*. 2018. pp. 18–24. doi:10.1159/000477353
 18. Krüger JP, Freymann U, Vetterlein S, Neumann K, Endres M, Kaps C. Bioactive Factors in Platelet-Rich Plasma Obtained by Apheresis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013. pp. 4–4. doi:10.1159/000356329
 19. Ozcan P, Takmaz T, Tok OE, Islek S, Yigit EN, Ficicioglu C. The protective effect of platelet-rich plasma administrated on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020. pp. 865–873. doi:10.1007/s10815-020-01689-7
 20. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-Rich Plasma. *The American Journal of Sports Medicine*. 2009. pp. 2259–2272. doi:10.1177/0363546509349921
 21. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Grigoriadis

- S, Pantou A, Tsioulou P, Maziotis E, et al. Reactivating Ovarian Function through Autologous Platelet-Rich Plasma Intraovarian Infusion: Pilot Data on Premature Ovarian Insufficiency, Perimenopausal, Menopausal, and Poor Responder Women. *J Clin Med Res.* 2020;9. doi:10.3390/jcm9061809
22. Pantos K. Ovarian rejuvenation and folliculogenesis reactivation in peri-menopausal women after autologous platelet-rich plasma treatment. doi:10.26226/morressier.573c1512d462b80296c98880
23. Sills ES, Rickers NS, Li X, Palermo GD. First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34: 756–760. doi: 10.1080/09513590.2018.1445219
24. Panda SR, Sachan S, Hota S. A Systematic Review Evaluating the Efficacy of Intra-Ovarian Infusion of Autologous Platelet-Rich Plasma in Patients With Poor Ovarian Reserve or Ovarian Insufficiency. *Cureus.* 2020. doi:10.7759/cureus.12037
25. Pacu I, Zygouropoulos N, Dimitriu M, Rosu G, Ionescu CA. Use of platelet-rich plasma in the treatment of infertility in poor responders in assisted human reproduction procedures. *Exp Ther Med.* 2021;22: 1412. doi: 10.3892/etm.2021.10848
26. Petryk N, Petryk M. Ovarian Rejuvenation Through Platelet-Rich Autologous Plasma (PRP)—a Chance to Have a Baby Without Donor Eggs, Improving the Life Quality of Women Suffering from Early Menopause Without Synthetic Hormonal Treatment. *Reproductive Sciences.* 2020. pp. 1975–1982. doi:10.1007/s43032-020-00266-8
27. Atkinson L, Martin F, Sturmey RG. Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: too much too soon? *Hum Reprod.* 2021;36: 1737–1750.
28. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nitsos N, Rapani A, Pantou A, Vaxevanoglou T, et al. A Case Series on Platelet-Rich Plasma Revolutionary Management of Poor Responder Patients. *Gynecol Obstet Invest.* 2019;84: 99–106. doi: 10.1159/000491697.

Genética y filiación. Un caso clínico de donación intrafamiliar

Genetics and filiation: a clinical case of intrafamilial donation

MV Stelluto

Licenciada en psicología

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Puede una pareja que tiene una dificultad reproductiva aceptar una gameta donada por un familiar (donación intrafamiliar)? ¿Cómo evalúa el psicólogo estas situaciones?

Respuesta resumida: Si, se puede recurrir a la donación intrafamiliar luego de una evaluación exhaustiva realizada por el equipo tratante.

Lo que ya se sabe: Recurrir a la donación de gametas implica atravesar un duelo genético. No obstante, muchas personas necesitan conocer algo de la genética de la gameta que van a recibir.

Diseño del estudio: Caso clínico

Materiales y Métodos: Entrevistas semi-dirigidas individuales con cada miembro de la pareja receptora y con la donante intrafamiliar, Entrevista semidirigida vincular (receptores-donante), Test de Bender, HTP (House, Tree, Person), Familia kinética actual y Familia kinética prospectiva, Inventario clínico de Síntomas SCL-90-R.

Descripción del caso clínico: Se trata de una pareja heterosexual (mujer de 42 y varón de 44 años) que requiere de donación

ABSTRACT

Study question: *Can a couple that has a reproductive difficulty accept a gamete donated by a family member? How does the psychologist evaluate these situations?*

Summary answer: *Yes, intra-family donation can be used after an exhaustive evaluation carried out by the treating team.*

What is already known: *Resorting to the donation of gametes implies going through a genetic duel. However, many people need to know something about the genetics of the gamete they are going to receive.*

Study design: *Clinical case*

Materials and Methods: *Individual semi-directed interviews with each member of the recipient couple and with the intra-family donor, bonding semi-directed interview (recipients-donor), Bender Test, HTP (House, Tree, Person), Current kinetic family and kinetic family prospective, Clinical Symptom Inventory SCL-90-R.*

Description of the clinical case: *Heterosexual couple (42-year-old woman and 44-year-old man) who require egg donation due to low ovarian reserve. The*

de óvulos debido a la baja reserva ovárica. La mujer ya tiene dos hijos de su anterior matrimonio, el varón no tiene hijos aún. La posible donante es la sobrina de la receptora (25 años), que ya tiene dos hijos.

Limitaciones del estudio: Al ser una descripción de un caso clínico, no puede generalizarse sobre el curso de los resultados de este estudio y no puede ser aplicable a todos los casos de donación intrafamiliar.

Implicancia de los hallazgos: Cuando se tiene que concebir un hijo teniendo que recurrir a la donación de gametos, lo más frecuente es recurrir a terceros fuera del ámbito familiar, pero en algunas ocasiones hay parejas que deciden optar por alguien de su entorno. Esta posibilidad abre un debate, porque si bien desde el campo de la medicina es posible, desde el punto de vista psicológico nos interroga respecto de los vínculos que se generarán entre los actores involucrados, especialmente pensando en el niño/a por nacer.

Palabras clave: donación de gametos – donación intrafamiliar – familia - genética

woman already has two children from her previous marriage, the man has no children yet. The possible donor is the recipient's niece (25 years old), who already has two children.

Limitations of the study: *Being a description of a clinical case, it cannot be generalized about the course of the results of this study and may be not applicable to all cases of intrafamilial donation.*

Implication of the findings: *When you have to conceive a child appealing to gamete donation, the most common thing is to participate of the ovodonation program, but on some occasion, there are couples who decide to opt for someone from their environment. This possibility opens a debate, because although it is possible from the medical field, from the psychological point of view it questions us regarding the links that will be generated between the actors involved, especially thinking about the unborn child.*

Keywords: *gamete donation - intrafamilial donation - family - genetics*

Introducción

“Cada niño construirá su versión mítica de su venida al mundo, cualquiera que sea la forma en que fue concebido”.

Lacan, 1957

Las nuevas formas de filiación y las nuevas redes de parentesco generadas por las técnicas de reproducción humana asistida (TRHA), dejan atrás el modelo heteronormativo y el paradigma biogenético del siglo pasado.

La forma de acceder a la maternidad/paternidad se ve transformada y se pluraliza. La ciencia deja atrás a la relación sexual como única opción, abriendo otros caminos.

Donación de óvulos, donación de esperma, gestación subrogada, son nuevas opciones a la hora de pensar una familia.

El objetivo de este trabajo es reflexionar sobre qué rol juega la genética en la construcción del parentesco en este caso clínico, apelando a un trabajo interdisciplinario que piensa que cada familia y cada sujeto es una construcción singular y sin esperar que estos resultados se apliquen a otros casos.

Materiales y métodos

Diseño del estudio: caso clínico

Descripción del caso clínico:

En 1978 nació el primer bebe in vitro y años más tarde en 1984 nació el primer bebé concebido con óvulos donados.

En Argentina uno de cada cuatro tratamientos de fertilidad es con óvulos donados⁽¹⁾. Prescindir de la genética propia y recurrir a los gametos de un tercero, implica realizar lo que llamamos “duelo genético”.

They explica: *“En cuanto a las TRA-D, la figura del/la donante introduce un tercero*

en la relación familiar que provoca inquietud y ambigüedad en la posición que ocupa la madre o padre que carece de vínculo genético con su hijo/a”⁽²⁾.

Por ese motivo, muchas personas se sienten más seguras con un donante dentro de su grupo familiar frente a la opción de tener que aceptar algo totalmente ajeno y desconocido.

El comité de ética de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASMR), dice: *“El uso de donantes de gametos intrafamiliares o en gestación subrogada generalmente es éticamente aceptable cuando todos los participantes están completamente informados y asesorados, pero deben prohibirse los arreglos que produzcan los resultados de uniones consanguíneas o incestuosas verdaderas. Las donaciones de hijo a padres generalmente son inaceptables y entre padres e hijos son aceptables en situaciones limitadas. Los programas que opten por participar en los arreglos intrafamiliares deben estar preparados para dedicar más tiempo al asesoramiento de los participantes y garantizar que hayan tomado decisiones libres e informadas”*⁽³⁾.

Por lo mencionado a diferencia de la donación anónima de gametos, en la donación intrafamiliar se debe evaluar que no haya trama incestuosa, tanto desde lo médico como desde lo psicológico.

Desde el punto de vista psicológico, la trama incestuosa está asociada con los motivos por los cuales se dona y se acepta la donación, por los vínculos entre los miembros de la familia que están involucrados en el proceso y por el lugar que ocupara el niño/a advenir.

El psicólogo debe evaluar que no haya coerción consciente ni inconsciente (protección de la autonomía del/la donante) e indagar cómo es el lazo afectivo previo

con la donante.

En estos casos si bien no hay anonimato, puede haber secreto, lo cual genera un especial cuidado en el niño nacido, ya que estará en contacto con su donante y será parte de su familia.

Por otro lado, si bien no hay compensación económica, puede haber deuda simbólica. Por todos los motivos desarrollados es fundamental el asesoramiento combinado y separado de donantes y receptores⁽⁴⁾.

Toda pareja que tiene que recurrir a la donación de gametos, realiza un duelo por no poder contar con sus gametos propios. Se ha mencionado que hay un grupo de personas que prefiere -como mejor alternativa para ellos- la donación intrafamiliar, frente a lo desconocido y lo ajeno que le representa la donación de un tercero anónimo. Apelando a la donación de óvulos de un miembro de la familia evitan perder la transmisión “genética” familiar que con sus óvulos no pueden aportar.

No obstante, se enfrentan a la transformación familiar, teniendo que repensar que lugares tiene cada uno y que lugares tendrán. Luego que el médico y la embrióloga evaluaron y consideraron que esta pareja podría optar por la donación intrafamiliar, son derivados a las entrevistas psicológicas.

Se procede a tener varias entrevistas con ellos en las cuales se utilizaron: Entrevistas semi-dirigidas individuales con cada miembro de la pareja receptora y con la donante intrafamiliar, Entrevista semidirigida vincular (receptores-donante), Test de Bender, HTP (House, Tree, Person), Familia kinética actual y Familia kinética prospectiva, Inventario clínico de Síntomas SCL-90-R.

En las entrevistas se le explica a cada uno que este no es un proceso evaluativo, sino una instancia para procesar juntos y

evaluar así si esta es la mejor opción para esta pareja.

Se trata de una pareja heterosexual (mujer de 42 y varón de 44 años) que requiere de donación de óvulos debido a la baja reserva ovárica. La mujer ya tiene dos hijos de su anterior matrimonio, el varón no tiene hijos aún. La posible donante es la sobrina de la receptora (25 años), que ya tiene dos hijos.

Se le pregunta a la receptora que es un óvulo para ella y responde “*Un óvulo es información genética, lo que yo valoro de la donación es la información genética*”. “*Este hijo/a va tener un vínculo genético con mis hijos. Si mañana necesita una donación de un órgano, o algo así...*”.

Ante la pregunta de ¿Por qué intrafamiliar y no anónima? y ¿A quién se le ocurrió pensar en la opción intrafamiliar?, responde: “*B. (donante) me lo ofreció. No me gustaría que sea anónimo y no tener esa información para mi hijo/a*”.

Se le hace la misma pregunta a la pareja de la receptora: ¿Por qué intrafamiliar y no anónima? y responde: “*¡Por los genes que tiene! Yo había pensado en B.*”.

Al interrogar a la donante sobre: ¿Qué significa la donación de gametos? dice: “*Yo no lo tenía pensado, me lo comento mi tía y la quise ayudar. La vi angustiada y se me ocurrió. Yo me ligué las trompas y no quiero más hijos. Donar óvulos es ayudar a alguien a ser madre*”.

Con respecto a ¿qué es un óvulo? para ella explica: “*Es una pequeña parte de mí, es una pequeña ayuda*” y aclara “*Mamá es la que da amor, la que cría*”.

De las técnicas administradas no se desprende ningún indicador disruptivo y se ve con claridad la proyección de la conformación familiar a futuro -tanto de los receptores y los donantes- sin confusión de roles.

En este caso clínico, vemos como para esta pareja es fundamental mantener la genética a la hora de tener un hijo.

Discusión

Ansermet escribe con claridad: *“Hay cambios en el mundo que se producen demasiado rápido como para poder reflexionar sobre ellos. Estos cambios en curso implican también cambios en las representaciones, instancias de vértigo, instancias de tropiezo, exigiendo un retorno al enfoque clínico para comprender caso por caso, la manera en que los sujetos se las arreglan con las realidades inéditas introducidas por las biotecnologías; y exigen también investigaciones antropológicas, históricas, sociológicas, jurídicas o éticas para comprender el impacto de estas nuevas manipulaciones del cuerpo sobre las representaciones, tanto subjetivas, como colectivas”*⁽⁵⁾.

También nos enseña que cuando se recurre a las TRHA, hay un riesgo de reducir todo al origen de cómo fue la misma, advirtiéndonos que no debemos caer en ese reduccionismo y trabajar sobre el deseo y la historia de ese hijo en esa familia⁽⁵⁾.

En sus propias palabras: *“Designar al donante de esperma como padre biológico introduce un malentendido sobre la transmisión. El origen es también el deseo de tener un hijo de quienes querían concebir un hijo. La transmisión entraña otras dimensiones además de la biológica. El padre no puede ser atribuido al esperma. Asimismo, la madre no puede ser reducida al óvulo. Hacer recaer el origen en los gametos, incluso en la barriga de quien hubiera llevado al niño en caso de gestación subrogada, es caer en un malentendido total; haciendo que el proyecto de quienes decidieron pasar por una donación pase*

a segundo plano, borrando su deseo, su historia y su intención. Por no hablar del hecho de que, sea cual sea el modo de origen, sigue correspondiendo al niño poder adoptar el suyo, lo que implica también ser el adoptado de un deseo”⁽⁶⁾.

Diana Pérez reflexiona sobre el rol del psicólogo en la clínica de (in)fertilidad y nos propone *“una clínica posible que por sus características deberá estar en permanente revisión”*⁽⁷⁾, considero que este tipo de casos convocan a lo que la autora plantea. Para finalizar y volviendo al caso clínico que nos interpela, escuchando la historia de los pacientes de la cual se desprende su deseo de hijo, podemos pensar que, si bien la genética no hace familia, esta es un factor importante para esta familia y debe ser escuchado cuando los consultantes lo plantean.

Por otro lado, este fue el trabajo interdisciplinario previo a la toma de decisión. Desde el punto de vista psicológico –siempre que la familia acompañe– se sugiere continuar con un acompañamiento durante el embarazo (si este se lograra) y luego del nacimiento, en las etapas que ellos requirieran.

Agradecimientos

Este trabajo surge a través del trabajo interdisciplinario con los Dres. Stella Lancuba, Guillermo Wolfenson y la Lic. María Constanza Branzini. Un especial agradecimiento hacia ellos.

A la Lic. Estela Chardon por su generosidad en el aporte de bibliografía sobre la temática. A la Lic. Natacha Salome Lima por la lectura de este trabajo.

A las Lic. Diana Pérez y Evangelina Tocaceli Blasi por los enriquecedores intercambios diarios de nuestra práctica clínica.

REFERENCIAS

1. Recuperado de https://www.clarin.com/sociedad/tratamientos-fertilidad-ovulos-donados-mujeres-hacen-duelo-genetico_0_62My7Wg32.html
2. Herrera, F, Salvo Agoglia, F, Navarro, J. Monografía “Reproducción con terceras partes en Chile: comunicando orígenes y construyendo parentesco”. Ediciones Complotense. 2019. Recuperado de <https://revistas.ucm.es/index.php/POSO/article/view/60536/4564456552398>; 696.
3. The Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. ASRM. Fertility and Sterility, “Using family members as gametes donors or surrogates”. Vol. 98, Number 4. October 2012; 797.
4. G. de Wert, W. Dondorp, G. Pennings, F. Shenfield, P. Devroey, B. Tarlatzis, P. Barri, K. Diedrich: Task Force on Ethics and Law including. Intrafamilial medically assisted reproduction, ESHRE Human Reproduction, Volume 26, Issue 3, 1 March 2011.
5. Ansermet, F: La fabricación de los hijos. Un vértigo tecnológico. Unsam Edita, 2018; 103.
6. Ansermet, F: Del deseo de tener un hijo a los malentendidos del origen. 2021. Recuperado de <https://www.pipol10.eu/es/2021/02/18/del-deseo-de-tener-un-hijo-a-los-malentendidos-del-origen-francois-ansermet/>
7. Perez, D: Ensayo sobre (in)fertilidad. ¿Hay una clínica específica? En Naves FA: Cuerpos gestantes. Nueva Editorial Universitaria. Universidad Nacional de San Luis, 2022; 190.

Efecto de la suplementación de progesterona en ciclos de transferencia embrionaria con preparación endometrial artificial y niveles bajos de progesterona

Effect of progesterone supplementation in embryo transfer cycles with artificial endometrial preparation and low progesterone levels

D Tonelli¹; M Parolín¹; R Sylvestre Begnis¹; L Domenech¹; V Paz²; V Ventura¹; P Perfumo¹; P Hovanyecz¹.

¹ Medica Staff del Servicio de Medicina Reproductiva, Grupo Gamma, Rosario, Argentina.

² Jefa de Laboratorio de Embriología, Grupo Gamma, Rosario, Argentina.

RESUMEN

Pregunta de estudio: En mujeres que realizan preparación artificial de endometrio para tratamientos de transferencia de embriones congelados, ¿Influyen los niveles séricos de progesterona del día de la transferencia en la tasa de embarazo clínico?

Respuesta resumida: Este estudio muestra que la medición de progesterona sérica antes de la transferencia de embriones es una herramienta útil para la optimización de los valores séricos de progesterona en ciclos de preparación endometrial artificial. Dado que los resultados en tasas de embarazo entre las pacientes con niveles séricos adecuados fueron similares a aquellas en la que se realizó corrección luego de presentar niveles bajos de progesterona antes de la transferencia.

Lo que ya se sabe: Estudios previos han demostrado que existe una concentración sérica mínima de progesterona en los ciclos de preparación endometrial por debajo del cual la tasa de éxito disminuye. Esto surge de los datos que vinculan un nivel más alto de progesterona circulante con mayores tasas de

ABSTRACT

Study question: In women undergoing artificial endometrial preparation for frozen embryo transfer treatments, do serum progesterone levels on the day of transfer influence the clinical pregnancy rate?

Summary Answer: This study shows that serum progesterone measurement prior to embryo transfer is a useful tool for optimizing serum progesterone values in artificial endometrial preparation cycles. Given that the results in pregnancy rates among patients with adequate serum levels were similar to those in which correction was made after presenting low levels of progesterone before the transfer

What is already known: Previous studies have shown that there is a minimum serum concentration of progesterone in endometrial preparation cycles below which the success rate decreases. This arises from data linking a higher level of circulating progesterone with higher

nacidos vivos y un menor riesgo de aborto espontáneo en los ciclos de transferencia de embriones criopreservados. Sin embargo, los resultados en cuanto a punto de corte y esquema óptimo son contradictorios.

Diseño del estudio: Estudio de cohorte retrospectivo.

Material y métodos: Se incluyeron 205 pacientes que realizaron preparación artificial del endometrio para transferencia de embriones criopreservados con óvulos propios o de ovodonación entre marzo del 2022 a junio del 2022 en el Instituto Gamma, en Rosario, Santa Fe. Se obtuvo información de las historias clínicas electrónicas de cada paciente.

Resultados: La progesterona media en el día de la transferencia de embriones en suero fue de 16,9 ng/ml. Se alcanzaron valores plasmáticos mayores con la vía de administración vaginal. En 24 pacientes la progesterona se encontraba en valores menores a 9,2 ng/ml el día de la transferencia, en todos los casos se suplementó y los valores 72 horas posteriores mostraron en el 100% de los casos un valor superior a dicha cifra. Los resultados reproductivos con la suplementación fueron comparables a aquellos en los que la progesterona inicial fue mayor a 9,2 ng/ml inicialmente.

Limitaciones del estudio: La principal limitación del estudio es el bajo número de pacientes incluidos y su diseño retrospectivo.

Palabras clave: Progesterona plasmática, transferencia de embriones criopreservados, tasa de embarazo clínico.

live birth rates and a lower risk of miscarriage in cryopreserved embryo transfer cycles. However, the results in terms of cut-off point and optimal scheme are contradictory.

Study design: Retrospective cohort study

Material and methods: 205 patients who underwent artificial preparation of the endometrium for transfer of cryopreserved embryos with their own or oocyte donation between March 2022 and June 2022 at the Gamma Institute, in Rosario, Santa Fe, were included. Information was obtained from the electronic medical record of each patient.

Results: The mean progesterone on the day of embryo transfer in serum was 16.9 ng/ml. Higher plasma values were achieved with the vaginal route of administration. In 24 patients, progesterone was at values less than 9.2 ng/ml on the day of transfer, in all cases it was supplemented and the values 72 hours later showed a value higher than that figure in 100% of cases. Reproductive results with supplementation were comparable to those where initial progesterone was greater than 9.2 ng/ml initially.

Study limitations: The main limitation of the study is the low number of patients included and its retrospective design.

Keywords: Plasma progesterone, cryopreserved embryo transfer, clinical pregnancy rate.

INTRODUCCIÓN

Las transferencias de embriones criopreservados se han incrementado notoriamente en la última década por varias razones: la gran mejora en las tasas de supervivencia embrionaria relacionada con el desarrollo de la criopreservación, el mayor uso de políticas electivas de transferencia de un solo embrión y el desarrollo de estrategias para prevenir el síndrome de hiperestimulación ovárica en mujeres en riesgo, o más comúnmente, para evitar el efecto negativo de los niveles suprafisiológicos de esteroides inducidos por la estimulación ovárica controlada en la implantación del embrión. Sin embargo, no hay consenso sobre el método más efectivo de preparación endometrial.

En estos tratamientos comúnmente se utiliza la preparación artificial endometrial⁽¹⁾. En la mayoría de los casos se realiza con estrógenos y progesterona, garantizando la proliferación endometrial y la apertura de la ventana implantatoria. La administración de estrógenos se adapta a la necesidad de cada paciente, pero las dosis de progesterona y las formas de administración de la misma varían de acuerdo a las preferencias del médico y paciente⁽²⁾.

La progesterona es la principal hormona esteroide “progestacional” secretada por el cuerpo lúteo para inducir la transformación secretora del endometrio, lograr y mantener un embarazo. Juega un papel fundamental en la transición del endometrio de la fase proliferativa a la secretora y en la decidualización del mismo⁽³⁾. Este proceso está controlado por complejas interacciones de transcripción, factores de activación, citoquinas y vías de señalización, reguladores esenciales y un requisito previo para el éxito de la implantación embrionaria⁽⁴⁾. También actúa sobre el sistema inmunitario, principalmente al afectar

la síntesis de citoquinas y la función de las células NK⁽⁵⁾. Debido a los efectos mencionados la progesterona tiene un rol fundamental en el proceso reproductivo y existe un interés creciente en los valores plasmáticos de la misma durante los ciclos de terapia de reproducción asistida, para definir el nivel que pueda garantizar un entorno endocrino óptimo durante la implantación del embrión y el embarazo temprano.

Es probable que exista una concentración sérica mínima de progesterona en los ciclos de preparación endometrial por debajo del cual la tasa de éxito disminuya. Esto surge de los datos que vinculan un nivel más alto de progesterona circulante con mayores tasas de nacidos vivos y un menor riesgo de aborto espontáneo en los ciclos de transferencia de embriones criopreservados^(6,7). Gao et. al. (2021) en su estudio asegura que el nivel de progesterona sérica en el día de la transferencia embrionaria es uno de los factores de riesgo que predicen las posibilidades de embarazo en ciclos de preparación de endometrio artificial⁽⁸⁾. Constituiría un factor pronóstico para el éxito de los tratamientos de reproducción asistida, asimismo, los valores por debajo de 9 ng/ml. se asocian con mayor tasa de aborto⁽⁹⁾. Estos datos demuestran que podría ser útil individualizar los esquemas de preparación endometrial aumentando la dosis de progesterona en aquellas pacientes que no logran los valores séricos apropiados el día de la transferencia y podrían beneficiarse con la suplementación adicional para lograr un soporte óptimo de la fase lútea^(9, 10, 11). No obstante, estudios recientes sugieren que la progesterona excesiva puede ser tan perjudicial para los resultados del tratamiento como cuando se encuentra baja⁽¹²⁾. Algunos autores sugieren que el valor de la progesterona sérica

el día de la transferencia superior a 20 ng./ml, se asocia con disminución de la tasa de embarazo y nacido vivo⁽¹³⁾. El monitoreo de estos valores podría ayudar a individualizar la administración de progesterona para mejorar las tasas de embarazo clínico y nacido vivo, especialmente en ciclos sin cuerpo lúteo⁽¹⁴⁾.

Diferentes autores han estudiado puntos de corte que podrían ser un predictor confiable en los resultados de tratamientos con preparación artificial del endometrio. Labarta et. al. (2017) demostró que concentraciones plasmáticas de progesterona por debajo de 9,2 ng/ml el día de la transferencia en ciclos de ovodonación se asociaron a tasas de embarazo evolutivo significativamente más bajas⁽⁵⁾. Por lo tanto, la utilidad de esta medición de progesterona plasmática radica en la posibilidad de la suplementación en los casos que la misma se encuentre disminuida. La potencia de los diferentes progestágenos para suplementar se ha estimado de forma relativa. Existen varias formulaciones de progesterona disponibles, incluyendo oral, vaginal y parenteral incluyendo esta última la vía subcutánea e intramuscular.

La vía de administración parenteral genera altas concentraciones plasmáticas y bajas concentraciones en órganos diana (útero y ovarios) y la utilización de la progesterona vía vaginal, por el contrario, se refleja en bajas concentraciones plasmáticas y altas concentraciones en los órganos reproductivos^(15,16). La administración de progesterona micronizada vía vaginal permite una excelente entrega al órgano diana con dosis mínimas. La captación preferencial por el útero, cuando se administra de este modo, se ha demostrado en una serie de estudios. La concentración en el tejido uterino superaba más de diez veces los niveles alcanzados por la administración

intramuscular, a pesar de que los niveles plasmáticos en el último caso eran siete veces más altos. Las pacientes la aceptan más fácilmente debido a su conveniencia, ausencia de dolor en el lugar de la inyección y de mareos u otros efectos secundarios^(17,18).

Otra forma de administración es la vía vaginal en formulación de gel, con uso aceptable clínicamente por las características bioadhesivas, que le otorga la propiedad de liberación sostenida con la necesidad de administración menos frecuente⁽¹⁹⁾.

La progesterona administrada por vía oral está sujeta a un metabolismo hepático de primer paso. Esta actividad metabólica da como resultado la degradación de la progesterona en sus metabolitos. Aunque la conveniencia de la progesterona administrada por esta vía es indiscutible, su uso se ha asociado con efectos adversos sistémicos, por ejemplo, somnolencia, sofocos y náuseas. También se han atribuido efectos sedantes e hipnóticos⁽²⁰⁾. Las propiedades farmacocinéticas de la progesterona administrada por vía oral también están influenciadas por la ingesta de alimentos⁽²¹⁾. Posteriormente, con la aparición de la progesterona micronizada se logró una mejor absorción y biodisponibilidad. Después de la ingestión de 200 mg de progesterona micronizada, las concentraciones séricas medias de progesterona (dentro del rango de la fase lútea) se alcanzan en 2 a 4 horas y permanecen significativamente elevadas durante las siguientes 6 a 7 horas⁽²²⁾.

Algunos autores sostienen que la interferencia de altas concentraciones de metabolitos de progesterona producidos durante el primer paso hepático podría proporcionar concentraciones séricas de progesterona erróneamente altas⁽²³⁾. Estos valores son causados por una reacción cruzada de los metabolitos con los

anticuerpos policlonales antiprogestero-
na en los inmunoensayos directos que se
usan en los laboratorios de rutina. Algu-
nos autores mencionan que la causa de la
insuficiencia de la progesterona adminis-
trada por vía oral estaría explicada por la
incapacidad de inducir una transformación
secretora endometrial adecuada, a pesar de
las concentraciones séricas elevadas⁽²⁴⁾.

A su vez, existen diferencias en la ca-
pacidad de absorción de los individuos.
Estas variaciones interpersonales podrían
deberse a niveles de absorción, distribu-
ción y metabolismo en el tejido graso. Un
estudio realizado por González-Foruria et.
Al (2020) demostró que después del aná-
lisis de diferentes factores, el aumento de
la edad presentó una correlación positiva
con las concentraciones de progesterona.
Por el contrario, se mostraron correlacio-
nes negativas significativas en cuanto a las
concentraciones de progesterona en un ci-
clo previo <10 ng/ml y mayor peso⁽²⁰⁾. Se
han estudiado en pacientes con tratamien-
tos en fresco donde existe la presencia de
cuerpos lúteos y en transferencia de em-
briones criopreservados donde la necesi-
dad es variable de acuerdo a cada paciente
⁽²⁵⁻²⁶⁾ En cuanto a la progesterona microni-
zada vía vaginal en formula de capsulas la
dosis recomendada es de 600 a 1200 mg /
día o en la fórmula de progesterona en gel
180-270 mg /día⁽¹⁶⁾.

Teniendo en cuenta lo anteriormente
descrito el objetivo primario de este es-
tudio es evaluar el impacto de la proges-
terona sérica en pacientes que realizaron
transferencia de embriones criopreser-
vados con preparación artificial endome-
trial. Dentro de los objetivos secundarios:
Cotejar los valores de progesterona plas-
mática según la forma de administración
de progesterona en el grupo suplementa-
do. Comparar la tasa de embarazo clínico

definida como: número de pacientes con
ecografías transvaginales que evidencian
embriones con actividad cardíaca positi-
va / número de transferencias realizadas x
100, tasa de embarazo bioquímico y tasa
de aborto entre el grupo de pacientes con
valores de progesterona el día de la trans-
ferencia embrionaria de un ciclo de prepa-
ración endometrial artificial $\geq 9,2$ ng/ml y
el grupo de pacientes con valores $< 9,2$ ng/
y suplementadas con progesterona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de investigación

Se realizó un estudio de cohorte retros-
pectivo. Se incluyeron 205 pacientes que
realizaron preparación artificial del endo-
metrio para transferencia de embriones
criopreservados con óvulos propios o de
ovodonación, entre marzo del 2022 y ju-
nio del 2022 en el Instituto Gamma, en
Rosario. Santa Fe.

Los criterios de inclusión fueron pacien-
tes que realizaron preparación artificial del
endometrio, transferencia de al menos un
blastocisto de buena calidad y endometrio
de al menos 7 mm trilaminar en el último
control ecográfico.

Se excluyeron pacientes con patología
uterina como pólipos, miomas submuco-
sos o malformaciones uterinas.

Procedimiento de recolección de datos

Se obtuvo información de las historias
clínicas electrónicas de cada paciente. El
valor del dosaje sérico de progesterona se
extrajo a partir de los datos del laboratorio
del Instituto Gamma. Los valores de pro-
gesterona se expresaron en ng/ml. Se ana-
lizaron en todos los casos por el método
de inmunoensayo de electro quimiolumi-
niscencia analizador COBAS 6000.

La extracción de sangre para evaluación
de progesterona plasmática se realizó el

día de la transferencia o el día previo a la misma, por la mañana, con ayuno mínimo de 8 horas y con la colocación de la medicación indicada la noche previa a la extracción.

Todos los ciclos de preparación endometrial fueron artificiales, se comenzó con estradiol desde el día 2 o 3 del ciclo vía oral, 6 mg diarios repartidos en 3 tomas, tras la determinación de ausencia de actividad folicular en la primera ecografía. Luego de 10-12 días de estrógenos, se realizó el segundo control ecográfico para evaluar el crecimiento endometrial. Con endometrio de al menos 7 mm y patrón trilaminar, se realizó la transferencia embrionaria. Las pacientes recibieron progesterona durante 5 o 5.5 días, en forma intravaginal, vía oral o mixta en dosis de 800 mg diarios repartidos en dos veces, en el caso de gel intravaginal de progesterona al 8 % una aplicación. La transferencia embrionaria de todas las pacientes se llevó a cabo en quirófano central bajo guía ecográfica transabdominal, siguiendo los protocolos habituales del procedimiento. La elección del catéter utilizado quedó bajo criterio del médico. En todos los casos se

realizó transferencia de embriones en estadio de blastocisto y al menos uno de buena calidad categorizados por los biólogos de acuerdo a la clasificación de Gardner y Schoolcraft.

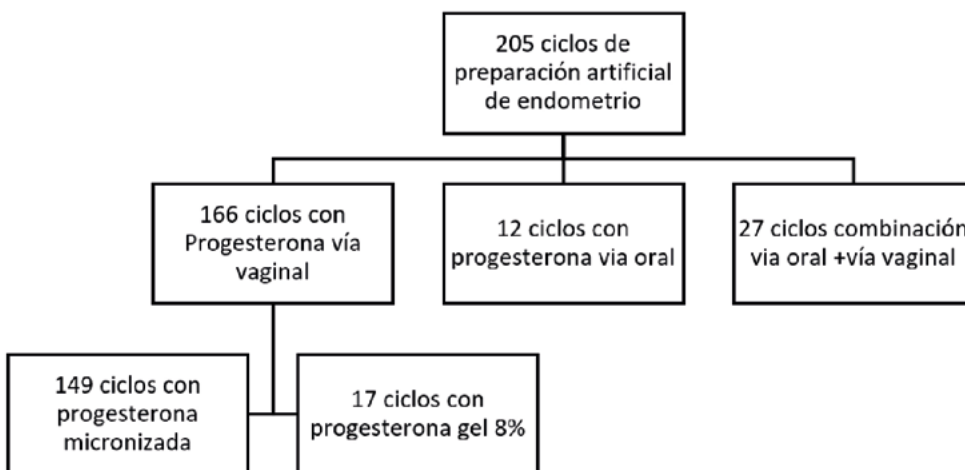
Las pacientes fueron divididas en dos grupos: aquellas con valores séricos de progesterona el día de la transferencia igual o mayores de 9,2 ng/ml y aquellas con valores menores a 9,2 ng/ml. En estas últimas se subdividió en las que realizaron corrección vaginal (con progesterona micronizada o gel vaginal al 8%) o vía oral según criterio médico o tolerancia de la paciente, el dosaje de progesterona para control pos suplementación se realizó 72 hs. posteriores a la transferencia.

Las variables analizadas fueron la tasa de embarazo clínico, tasa de embarazo bioquímico y de abortos.

Análisis estadístico

Se compararon las diferencias en las variables cuantitativas entre los grupos y las diferencias entre proporciones con test de Chi cuadrado. Se describieron las variables cuantitativas mediante media y desvío estándar y las variables categóricas

Gráfico 1. Diagrama de vía de administración de progesterona inicial.



mediante porcentaje. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para evaluar la relación entre valor de progesterona sérica y tasa de embarazo clínico.

RESULTADOS

Durante el periodo estudiado se realizaron 205 ciclos de transferencia de embriones criopreservados con preparación endometrial artificial con valerato de estradiol y progesterona micronizada o progesterona gel 8%.

La edad promedio al momento de la transferencia fue de 38 años con un rango de 28 a 50 años.

Del total de los ciclos de transferencia de embriones criopreservados el 86% (N:176) fueron con ovocitos propios y 14% (N: 29) fueron con ovocitos donados. Todas las transferencias realizadas fueron con embriones de calidad A/B según la clasificación de Gardner y Schoolcraft.

La preparación endometrial artificial se realizó en todos los casos con valerato de estradiol en dosis de 6 mg. La administración de progesterona inicial se realizó en 166 pacientes por vía vaginal, dentro de las cuales 149 fueron con progesterona micronizada (dosis de 800 mg) y 17 con progesterona en gel al 8%. Además, 12 pacientes recibieron administración oral y

las 27 pacientes restantes realizaron combinación de progesterona micronizada vía oral y vaginal (400 mg vía vaginal y 400 mg vía oral).

Se dividieron las pacientes de acuerdo a la vía de administración.

En la tabla 1 se describen los valores medios de progesterona, según la vía de administración inicial.

Después de la administración de progesterona inicial, incluyendo todos los grupos, el nivel medio de progesterona fue 16,9 ng/ml, con un amplio rango, valor mínimo de 5 ng/ml y máximo de 60 ng/ml.

Se dividieron las pacientes en aquellas que tenían un valor de progesterona plasmática menor a 9,2, o mayor o igual a 9,2. Todas las pacientes del primer grupo fueron suplementadas con progesterona. (Gráfico 2).

En 24 pacientes la progesterona se encontraba en valores menores a 9,2, en todos los casos se suplementó.

La forma de suplementación en 22 casos fue por vía oral, de las cuales 7 pacientes recibieron dosis de 200 mg con un valor de progesterona plasmática promedio dosado 72 horas posteriores de 13 ng/ml; 15 a dosis de 400 mg con un promedio de progesterona sérica posterior de 25,8 ng/ml.

En las 2 pacientes restantes se

Tabla 1. Valores promedio de progesterona inicial (día de la transferencia o día previo a la misma) según vía de administración.

TIPO DE PREPARACION ENDOMETRIAL		Nº PACIENTES	VALOR PROMEDIO DE PROGESTERONA PLAMATICA (NG/ML)
PROGESTERONA VÍA VAGINAL	PROGESTERONA MICRONIZADA (800 MG)	149	14,7
	PROGESTERONA GEL (90 MG)	17	10,1
PROGESTERONA VIA ORAL (800 MG)		12	63,2
PROGESTERONA VIA ORAL + VIA VAGINAL (400 MG/400MG)		27	26,7

suplemento progesterona micronizada vía vaginal en dosis de 200 mg con un valor promedio de progesterona plasmática de 9,4 ng/ml.

La tasa de embarazo clínico en pacientes con progesterona inicial mayor a 9,2 ng/ml (N:181) fue de 43,6 % (N:79), mientras que la tasa de embarazo en pacientes con progesterona inicial menor a 9,2 ng/ml y suplementadas (N: 24) fue de 37,5% (N:9).

No se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre los valores de progesterona en los dos grupos y la tasa de embarazo clínico (p: 0,394).

DISCUSIÓN

Es indudable el papel crucial que tiene la progesterona para el embarazo y mantenimiento del mismo en los ciclos de preparación artificial endometrial para realizar transferencia de embriones criopreservados. El valor de progesterona plasmática el día de la transferencia embrionaria es

Gráfico 2. Diagrama de ciclos según valor plasmático de progesterona, y suplementación en pacientes con valor menor a 9,2 ng/ml.

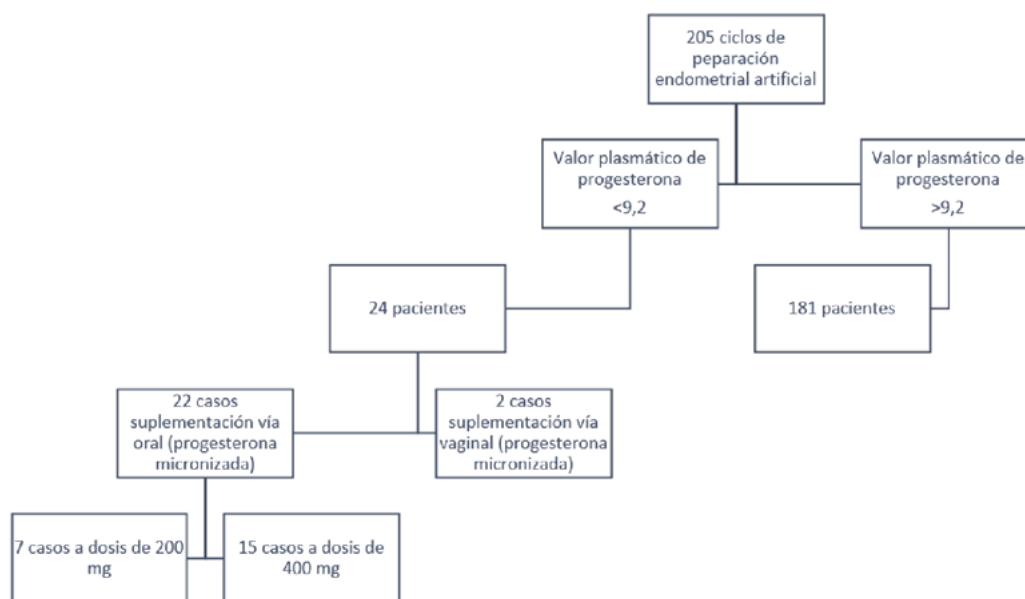


Tabla 2. Valores de progesterona sérica el día de la transferencia embrionaria o día previo: menor a 9,2 ng/ml (suplementado) y mayor o igual a 9,2 en relación a tasa de embarazo clínico, embarazo bioquímico y aborto.

Nivel de progesterona plasmática (Día de la transferencia o día previo)	< 9,2 ng/ml (Suplementado con progesterona)	≥ 9,2 ng/ml	P
Número de pacientes	24	181	
Tasa de embarazo clínico (%)	37,5% (N:9) *	43,6 % (N:79)	0,394
Tasa de embarazo bioquímico (%)	20,8% (N:5)**	6 % (N:11)	0,53
Tasa de aborto (%)	0% (N:0)	3,8% (N:7)	2,5

* 9 embarazos clínicos: 8 fueron pacientes suplementadas vía oral. 1 paciente suplementada vía vaginal.

** 5 embarazos bioquímicos: 4 fueron suplementadas con progesterona vía oral y 1 vía vaginal.

un factor pronóstico independiente para la tasa de embarazo clínico⁽²⁸⁻²⁹⁾. Esto no pudo ser demostrado en esta serie de pacientes, debido a que en todos los casos en los que el valor de progesterona era menor a 9,2 ng/ml se suplementó y los valores 72 hs posteriores mostraron en el 100% de los casos un valor superior a dicha cifra.

Dentro de las estrategias utilizadas para suplementar la progesterona en los casos de valores séricos disminuidos, surge el interrogante de cuál es la dosis y vía de administración óptima para cada paciente. Cédric-Durnerin et al. (2019) en un estudio en el que utilizaron 600 mg de progesterona vaginal y los valores séricos el día de la transferencia se encontraban disminuidos, aumentaron la dosis a 1200 mg sin encontrar mejoría en los valores de progesterona plasmática⁽³⁰⁾.

En un estudio de Labarta et al. (2022) las pacientes que contaban con valores plasmáticos menores a 9,2 ng/ml, fueron suplementadas con progesterona subcutánea y se observó que los resultados reproductivos con la suplementación eran comparables a aquellos en los que la progesterona inicial era mayor a 9,2 ng/ml, de manera similar a los valores encontrados en el presente estudio⁽³¹⁾.

En cuanto a la vía de administración de la progesterona se han explorado varias y no se ha identificado ninguna formulación o régimen único como superior en cuanto a eficacia⁽³²⁾.

La evidencia en la literatura sugiere que la progesterona vaginal podría ser superior a otras vías, principalmente debido al efecto postulado del primer paso uterino, que resulta en una mejor biodisponibilidad local de la progesterona en el útero independientemente de los niveles séricos. Sin embargo, son necesarios grandes estudios prospectivos aleatorizados para confirmar

esta superioridad y detectar la dosis y la formulación óptimas. En el presente trabajo se observó que con la vía de administración oral los niveles séricos de progesterona fueron superiores en relación a la vía vaginal (ya sea micronizada o con gel).

Diferentes artículos describen que la progesterona micronizada oral está asociada con eventos adversos sistémicos como somnolencia, mareos y dolores de cabeza. Además, describen su ineficacia debido a la incapacidad de inducir una transformación secretora endometrial adecuada, a pesar de las concentraciones séricas elevadas^(24,33). En este estudio no se realizó biopsia endometrial en las pacientes para evaluar esta transformación, pero todas contaban con un grosor endometrial de 7 mm o más y un endometrio trilaminar. Asimismo, las tasas de embarazo en estas pacientes no difirieron significativamente con respecto a las otras vías de suplementación.

Como se mencionó anteriormente la progesterona administrada vía oral produce altas concentraciones plasmáticas de progesterona; bajas en útero y ovarios y la utilización de la progesterona vía vaginal, por el contrario, se refleja en bajas concentraciones plasmáticas y altas concentraciones en los órganos reproductivos. Entonces ¿Sería de utilidad establecer un punto de corte plasmático? Si los valores plasmáticos de progesterona no reflejan el impacto de la misma sobre el útero ¿Sería necesario la medición en todas las pacientes de los niveles plasmáticos de progesterona? ¿Cuál sería entonces una forma válida de medir los niveles de progesterona cuando la administración es vía vaginal?

CONCLUSIONES

En pacientes que realizaran transferencia de embriones criopreservados con preparación artificial endometrial, el dosaje

de progesterona debería realizarse antes de la transferencia y lo suficientemente pronto para permitir el ajuste de las dosis.

Este estudio muestra que la medición de progesterona sérica antes de la transferencia de embriones es una herramienta útil para la optimización de los valores séricos de progesterona en ciclos de preparación endometrial artificial. Dado que los resultados en tasas de embarazo entre las pacientes con niveles séricos adecuados fueron similares a aquellas en la que se realizó corrección luego de presentar niveles bajos de progesterona plasmática antes de la transferencia.

Sin embargo, queda por determinar la mejor manera de proceder en presencia de niveles bajos de progesterona sérica.

La mejor estrategia terapéutica sería individualizar la suplementación de progesterona e implementar protocolos de rescate.

La principal limitación de este estudio es que se trata de un estudio de cohorte retrospectivo con un número de pacientes acotado. En las pacientes incluidas no se descartó el factor genético en primera instancia debido a que no se diferenció entre pacientes que utilizaron ovocitos propios versus ovocitos donados. En segundo lugar, debido a que las que utilizaron ovocitos propios no se las discriminó por edad.

Son necesarios grandes estudios prospectivos aleatorizados para confirmar la superioridad de alguna vía de administración y detectar tanto la dosis como la formulación óptima.

REFERENCIAS

1. Groenewoud, E. R., Cohlen, B. J., & Macklon, N. S. "Programming the endometrium for deferred transfer of cryopreserved embryos: hormone replacement versus modified natural cycles". *Fertility and sterility*. 2018; 109(5): 768-774.
2. Taraborrelli, S. "Physiology, production and action of progesterone". *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015; 94: 8-16.
3. Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. "Decidualization of the human endometrium". *Reproductive Medicine and Biology*. 2018; 17(3): 220-227.
4. Szekeres-Bartho, J., & Balasch, J. "Progestagen therapy for recurrent miscarriage". *Human Reproduction Update*. 2008; 14(1): 27-35.
5. Labarta, E., et al. "Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study". *Human Reproduction*. 2017; 32(12): 2437-2442.
6. González-Foruria, I. et al. "Factors associated with serum progesterone concentrations the day before cryopreserved embryo transfer in artificial cycles". *Reproductive Bio-Medicine Online*. 2020; 40(6): 797-804.
7. Labarta, E. et al. "Impact of low serum progesterone levels on the day of embryo transfer on pregnancy outcome: a prospective cohort study in artificial cycles with vaginal progesterone". *Human Reproduction*. 2021; 36(3): 683-692.
8. Gao, Hongyuan, et al. "Strengthened luteal phase support for patients with low serum progesterone on the day of frozen embryo transfer in artificial endometrial preparation cycles: a large-sample retrospective trial". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021; 19 (1): 1-10.
9. Devenuto, Luciana María, et al. "Niveles de progesterona sérica y tasa de embarazo en receptoras de ovocitos." *Revista Reproducción* 2021; 36.1.
10. Alsbjerg, B., Labarta, E., & Humaidan, P. "Serum progesterone levels on day of embryo transfer in frozen embryo transfer cy-

- cles—the truth lies in the detail”. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020; 37(8): 2045-2046.
11. Álvarez, M. et al. “Individualised luteal phase support in artificially prepared frozen embryo transfer cycles based on serum progesterone levels: a prospective cohort study”. *Human Reproduction*. 2021; 36(6): 1552-1560.
 12. Yovich, J. L., et al. “Mid-luteal serum progesterone concentrations govern implantation rates for cryopreserved embryo transfers conducted under hormone replacement”. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015; 31(2): 180-191.
 13. Kofinas, J. D., et al. “Serum progesterone levels greater than 20 ng/dl on day of embryo transfer are associated with lower live birth and higher pregnancy loss rates”. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015; 32(9): 1395-1399.
 14. Ranisavljevic, Noemie, et al. “Low luteal serum progesterone levels are associated with lower ongoing pregnancy and live birth rates in ART: systematic review and meta-analyses.” *Frontiers in Endocrinology*. 2022; 13
 15. Akaeda, S. et al. “Relationship between serum progesterone concentrations and pregnancy rates in hormone replacement treatment-frozen embryo transfer using progesterone vaginal tablets”. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*. 2019; 46(5): 695-698.
 16. Shapiro, D., Boostanfar, R., Silverberg, K., & Yanushpolsky, E. H. “Examining the evidence: progesterone supplementation during fresh and frozen embryo transfer”. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014; 2: 1-14.
 17. Miles, R. A., Paulson, R. J., Lobo, R. A., Press, M. F., Dahmouh, L., & Sauer, M. V. “Pharmacokinetics and endometrial tissue levels of progesterone after administration by intramuscular and vaginal routes: a comparative study”. *Fertility and sterility*. 1994; 62(3): 485-490.
 18. Warren, M. P. “Vaginal progesterone and the vaginal first-pass effect”. *Climacteric*. 2018; 21(4): 355-357.
 19. De Ziegler, D., Ferriani, R., Moraes, L. A. M., & Bulletti, C. “Vaginal progesterone in menopause: Crinone® 4% in cyclical and constant combined regimens”. *Human Reproduction*. 2000; 15: 149-158.
 20. González-Foruria, I., Gaggiotti-Marre, S., Álvarez, M., Martínez, F., García, S., Rodríguez, I. & Polyzos, N. P. “Factors associated with serum progesterone concentrations the day before cryopreserved embryo transfer in artificial cycles”. *Reproductive BioMedicine Online*. 2020; 40(6): 797-804.
 21. Padwick, M. L., Pryse-Davies, J., & Whitehead, M. I. “A simple method for determining the optimal dosage of progestin in postmenopausal women receiving estrogens”. *The New England Journal of Medicine*. 1986; 315(15): 930-934.
 22. Moyer, D. L., de Lignieres, B., Driguez, P., & Pez, J. P. “Prevention of endometrial hyperplasia by progesterone during long-term estradiol replacement: influence of bleeding pattern and secretory changes”. *Fertility and sterility*. 1993; 59(5): 992-997.
 23. De Ziegler, D., Sator, M., Binelli, D., Leuratti, C., Cometti, B., Bourgain, C., ... & Garhörer, G. (2013). “A randomized trial comparing the endometrial effects of daily subcutaneous administration of 25 mg and 50 mg progesterone in aqueous preparation”. *Fertility and sterility*. 2013; 100(3): 860-866.
 24. Bourgain, C., Devroey, P., Waesberghe, L. V., Smits, J., & Steirteghem, A. V. “Effects of natural progesterone on the morphology of the endometrium in patients with primary ovarian failure”. *Human Reproduction*. 1990; 5(5): 537-543.
 25. Pouly, J. L., Bassil, S., Frydman, R., Hedon, B., Nicollet, B., Prada, Y., ... & Donnez, J. (1996). “Endocrinology: Luteal support after in-vitro fertilization: Crinone 8%, a sustained release vaginal progesterone gel,

- versus Utrogestan, an oral micronized progesterone”. *Human Reproduction*. 1996; 11(10): 2085-2089.
26. Miles, R. A., Paulson, R. J., Lobo, R. A., Press, M. F., Dahmouh, L., & Sauer, M. V. “Pharmacokinetics and endometrial tissue levels of progesterone after administration by intramuscular and vaginal routes: a comparative study”. *Fertility and sterility*. 1994; 62(3): 485-490.
 27. Benítez, R., Campodónico Garibaldi, I., Roos, A., Miller Aguilera, M. E., & Read, E. “Biodisponibilidad y absorción de progesterona micronizada por vía oral en mujeres fértiles con dosis única diaria”. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2001; 255-261.
 28. De Ziegler, D., Pirtea, P., & Ayoubi, J. M. “Implantation Failures and Miscarriages in Frozen Embryo Transfers Timed in Hormone Replacement Cycles (HRT): A Narrative Review”. *Life*. 2021; 11(12): 1357.
 29. Yovich, J. L., Conceicao, J. L., Stanger, J. D., Hinchliffe, P. M., & Keane, K. N. “Mid-luteal serum progesterone concentrations govern implantation rates for cryopreserved embryo transfers conducted under hormone replacement”. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015; 31(2): 180-191.
 30. Cédric-Durnerin, I., Isnard, T., Mahdjoub, S., Sonigo, C., Seroka, A., Comtet, M., & Grynberg, M. (2019). “Serum progesterone concentration and live birth rate in frozen-thawed embryo transfers with hormonally prepared endometrium”. *Reproductive BioMedicine Online*. 2019; 38(3):472-480.
 31. Labarta, Elena, et al. “Individualized luteal phase support normalizes live birth rate in women with low progesterone levels on the day of embryo transfer in artificial endometrial preparation cycles.” *Fertility and Sterility*. 2022; 117(1): 96-103.
 32. Van der Linden, M., Buckingham, K., Farquhar, C., Kremer, J. A., & Metwally, M. “Luteal phase support for assisted reproduction cycles”. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015; (7).
 33. Tavaniotou, A., Smits, J., Bourgain, C., & Devroey, P. “Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments”. *Human Reproduction Update*. 2000; 6(2): 139-148