



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Influencia de la exposición femenina a compuestos
ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados
del tratamiento de fecundación *in vitro***

Autor

Roberto González Martín

Supervisada por

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Valencia, octubre 2022



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Dr. Francisco Domínguez Hernández, Doctor en Biología, Investigador principal del área de Receptividad Endometrial y Competencia Embrionaria en Fundación IVI y coordinador del laboratorio de Fundación IVI.

CERTIFICO QUE:

El trabajo de investigación titulado: “**Influencia de la exposición femenina a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados del tratamiento de fecundación *in vitro***” ha sido realizado íntegramente por Roberto González Martín bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 26 de octubre de 2022.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández

*No debo tener miedo.
El miedo mata la mente.
El miedo es la pequeña muerte que
conduce a la destrucción total.
Afrontaré mi miedo.
Permitiré que pase sobre mí y
a través de mí.
Y cuando haya pasado, giraré mi
ojo interior para escrutar su camino.
Allá donde haya pasado el miedo
ya no habrá nada.
Sólo estaré yo.*

Letanía contra el miedo,
Hermandad Bene Gesserit
Del Universo Dune, creado por Frank Herbert

Agradecimientos

Desde la primera vez que soñé con dedicarme a la investigación, pensaba que la tesis doctoral sería la quintaesencia de mi potencial científico. Ahora, más de una década después, soy consciente de que ha sido mi particular *gom jabbar*, y de que estas casi doscientas páginas que tienes delante no pueden contener los últimos cinco años de mi vida; ni a nivel científico, ni mucho menos a nivel de las experiencias vividas. Echando la vista atrás, ha sido un (largo) camino de aprendizaje, y en algunos momentos de autodescubrimiento, que comenzó con un Rober recién graduado como técnico de laboratorio que soñaba con llegar a ser doctor.

Más allá de las alegrías y los múltiples sinsabores de la ciencia y la experimentación, nada de esto habría tenido sentido sin estar rodeado de gente con la que establecer relaciones de apoyo y cuidado mutuo, compañeros capaces de sacarte una sonrisa y darte una palabra de aliento (o chocolate) cuando más lo necesitas. Han sido momentos de alegrías (y lágrimas), momentos de confesiones en cultivos, de *afterworks* (¡gracias, Mari Feng!), de aventuras internacionales, anécdotas en congresos, producciones cinematográficas y artísticas, tardes de juegos de mesa, almuerzos, meriendas, escape rooms y eventos varios; que nos han convertido en una familia. Por suerte en mi vida (y desgracia a la hora de ser escueto en este apartado), tengo que agradecer todo lo que soy a muchísimas personas. Intentaré ser conciso.

En primer lugar, quiero agradecer a Paco, mi director y el DM de esta aventura, el haber confiado en mí cuando ni yo mismo creía en mi valía, y haberme dado la oportunidad de dar un paso al frente y demostrarme a mí mismo que podía con esta *quest*. Además, quiero agradecer al resto de jefes y compañeros de los otros laboratorios y centros en los que he tenido la suerte de formarme, y que han ayudado a forjar al investigador que soy hoy día. Desde los laboratorios de Inmunología de las Mucosas y el laboratorio de Eicosanoides en el IBGM de Valladolid, la clínica de IVI RMA Alicante, el laboratorio de Ingeniería Celular del IdiPAZ, el departamento de Biología Celular de la UAB o el estabulario del IBV.

También quiero agradecer al resto de mi grupo de investigación (he tenido la suerte de haber coincidido con grandes compañeras de grupo). Silvi, *My Queen*, que decirte que no sepas! Contigo aprendí el significado del término complementarse, somos tan distintos y a la vez tan iguales que el uno compensa los defectos del otro para formar un tándem exitoso. Andre, has sido tan cercana como una hermana, eres con quien más he trabajado codo con codo, compartido bromas, confidencias, secretos y soluciones para el mundo. Tú encarnas la madera que es necesaria para tallar un científico, y estoy deseoso por ser espectador de todos tus éxitos. Stefi, tuve la oportunidad de reencontrarme contigo y ha sido tan fácil trabajar juntos que había momentos en los que avanzábamos como una única mente. Yass, he disfrutado un montón viendo tu evolución durante estos años, ver cómo has ido tomando tu propia voz, y como siempre aplicas la bondad y la compasión en todo lo que haces. Encarnas la luz del sol y la alegría de las margaritas. Pedro, aunque has sido el último en llegar has sabido hacerte un hueco entre nosotros y llenarlo todo con tu humor de *Showman*. Indra, aunque no tuviéramos la oportunidad de compartir mucho tiempo, siempre me impresionó tu diligencia y brújula

interna. Por último, Ali, has sido el Sancho de mis Quijotescas ideas, el corazón y las manos del grupo y la guardiana que ha velado para que lleguemos a buen puerto.

Además de a mi grupo, quiero agradecer al resto de los compañeros que han hecho de la fundación mi hogar en Valencia. Necesitaría otro anexo para poder agradeceros como os merecéis lo importantes que sois y los momentos que hemos compartido, pero espero que cuando leáis estas líneas os sintáis representados y os vengan a la cabeza algunas de las anécdotas y momentos que hemos compartido. Entrar en fundación me ha permitido reencontrarme y forjar lazos con compañeros del máster con los que en su momento no tuve casi contacto; pero a los que he podido conocer más en profundidad y con los que he compartido grandes momentos, como Ana, Nuria o a Stefi. Aparte de estos reencuentros, también he compartido grandes momentos con grandes compañeras que han ido llegando a mi (nuestra) vida en distintas oleadas.

Los que estaban (casi acabando) antes de que llegáramos. Me (nos) hicisteis sentir tan cómodo(s) que fue como si lleváramos toda la vida trabajando juntos. Más allá de los (grandiosos) reencuentros; tuve la oportunidad de conocer a Hannes, al que considero un “hermano mayor” (aunque es un año más joven), con quien he compartido grandes divagaciones, cervezas, resacas y un sentido del humor muy personal. Ana Corachán, origen de numerosos “equipos de investigación” de viernes por la tarde, ediciones en Power Point y lecciones de practicidad vital. Anna Buigues, de entre todas las cosas que puedo recordar siempre me quedará con lo impresionante que es tu faceta de actriz. Nuria, aunque coincidiéramos poco tiempo, fueron muy gratos los meses que compartimos (que son de los que más fotos tenemos). También estoy muy agradecido de haber coincidido con Almu, Pablo, Patri y Álex, miembros del *dry lab*, compañeros de confianzas y largos viajes en autobús.

Aquellos con los que comencé esta andadura. Luci, que comenzaste siendo una jovencita temerosa y, con tu buen hacer, estás llegando más allá de donde alguna vez te habías planteado. Eres de las personas con las que más experiencias he compartido estos años, ¡gracias por hacerlos tan divertidos! Majo, solo puedo decirte que eres una pedazo de cachorra! (Además de la mejor compañera de portés). ¡No sabes cuánto me alegro de haberte robado (sin querer) la cajonera el primer día! Sara, todo un terremoto. De entre todas las anécdotas relacionadas contigo, voy a permitirme recordar el sábado en el que, sin darte cuenta, nos montaste un escape room en el laboratorio. Menos mal que al final pudimos leer el MTS. Y Luismi, gran compañero y soporte, siempre has tenido un buen consejo y un comentario de apoyo, además de muy buenas recomendaciones de juegos de mesa. Tenemos pendiente una partida al Paleo.

Los que se fueron incorporando por el camino, y nos convirtieron en una gran familia. MC (entre otros múltiples apelativos), compañera de turbulencias, de creación de laberintos, de edición de videos y de muchas otras cosas (algunas veces, hasta de abrazos). Emilio, si Hannes era mi “hermano mayor”, tú eres mi “hermano pequeño”; hemos llegado a un nivel de entendimiento difícil de superar, y que espero no tener que echar de menos. Elena, parte de mi “núcleo duro” durante estos años, siempre dispuesta a ayudar en todo lo posible y de

encontrar el momento idóneo para brindar con un chupito de mistela (clarita). Pepi, eres un auténtico torbellino capaz de anteponerse a todo y cargarte de energía. Marina, gracias a ti descubrimos el arroz moreno, que nos ha salvado de tantos ataques de hambre. Noe, una mirada tuya bastará para que me atragante de la risa, solo decirte que espero que no maduremos nunca. También Irene, María Gil, Anita, María Marchante, Adolfo, Antonio, Ismael, Rosalba y Diana, sin quienes nuestras quedadas y confianzas de despacho no habrían sido lo mismo.

Los “recién llegados”, aunque no me hago a la idea de que no llevéis años con nosotros. Es bonito pensar que se “cierra el círculo”, y que la sensación de cercanía con los que se van incorporando se mantiene como cuando éramos pollitos recién llegados. Alba, me alegra sentirme tan comprendido como contigo que cuando compartimos referencias parezca que hablamos en un idioma alienígena. María Gómez (y resto del despacho 1.17), siempre es divertido ir a hacerme una infusión o a rellenar la botella de agua y tener un momento de desconexión junto a vosotras. Asunta, aunque no hayamos tenido la oportunidad de coincidir mucho, espero que podamos subsanarlo. Clara y Sara, aún con el poco tiempo que ha pasado desde que vinisteis (Sara, es necesario que hagas otra estancia), parece que nos conozcamos desde hace mucho tiempo. Espero poder compartir con todas vosotras los momentos que nos quedan por vivir.

También quiero agradecer a Amparo, siempre al día y con un comentario acertado en la punta de la lengua, y a Jessi, nuestra vedette particular, por vuestro buen hacer durante todos estos años. Nada habría sido lo mismo sin vosotras. Lo mismo se extiende a las IPs, situadas al otro lado del cristal de la pecera; Horten, Irene, Sonia y Patricia, gracias por todos vuestros cuidados, ayuda, consejo y comprensión durante estos años. Quiero hacer extensible este agradecimiento al resto de personas que han hecho posible nuestro trabajo en las instalaciones del Biopolo, como la UAGI al completo, Carmen, Inma, Leo, Silvia, Marcos y Nicolás.

Para finalizar, también quiero agradecer a la gente no vinculada directamente a Fundación IVI por haber hecho posible la ejecución de este proyecto de tesis doctoral.

A Christine, Caroline, el Dr. Scott y a todo el equipo de IVI RMA New Jersey, por haberse encargado del reclutamiento y la recogida de las muestras. También quiero agradecer a los ginecólogos y personal del resto de clínicas IVI RMA que también reclutaron pacientes para las otras ramificaciones del estudio. Además, quiero agradecer a todas las pacientes que han consentido en participar en este estudio por su desinteresada aportación.

A Marina López, de la unidad analítica del IIS LaFe, y al equipo de la unidad de espectrometría atómica del CIEMAT, por haberse encargado de las cuantificaciones.

A María Téllez y María Grau, por su paciencia y por haberme enseñado todo lo que sé sobre epidemiología.

A Josep y Juan Gilabert, por su confianza y con el convencimiento de que pronto podremos comenzar a recoger frutos de los esfuerzos que hemos compartido.

No podía faltar agradecerle esta tesis a los distintos compañeros de piso, amigos y familia que me han ~~aguantado~~ apoyado durante todos estos años y me han dado una vida más allá del laboratorio. Como decía al principio, he tenido la suerte de mantener y establecer numerosas amistades durante estos años. Amigos que siempre han estado dispuestos a compartir tiempo de calidad y me han permitido tener una tupida red de apoyo que va desde Valencia a Valladolid pasando por Madrid y se ramifica por muchos otros lugares. Como decía al principio, necesitaría un documento adjunto para hacerlos justicia, así que lo condensaré en un ¡GRACIAS A TODOS!

También, quiero agradecer a Guille, mi lobito, por todo su aliento y comprensión. Por ser mi compañero y atravesar juntos la tormenta, con el anhelo de dejar de ser asíntotas y alcanzar la convergencia. Y por último quiero extender mi más sentido agradecimiento a mi madre, María José, sin quien nada de esto habría sido posible, y quien es artífice de todos los posibles éxitos de mi vida (¡Mamá, lo logramos!).

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios de la Fundación IVI. El reclutamiento de las participantes y la recogida de las muestras ha sido realizado en la clínica de IVI-RMA New Jersey. Los análisis de compuestos orgánicos han sido realizados en la unidad analítica del IIS LaFe, mientras que los análisis de elementos traza ha sido realizada en los laboratorios del CIEMAT.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación por parte del ISCIII, a través del programa FIS (PI17/00931) cofinanciado por el Fondo de Desarrollo Regional Europeo; “Una forma de hacer Europa”; de la Generalitat Valenciana, gracias a contratos de técnico de apoyo a la investigación (APOTI/2018/010 y APOTI/2020/013); y de Fundación IVI.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1. La subfertilidad femenina	5
1.1. Generalidades de la fisiología reproductiva femenina	5
1.1.1. <i>Control hormonal de la reproducción femenina</i>	6
1.1.2. <i>Formación del gameto femenino, foliculogénesis</i>	9
1.1.3. <i>Fecundación y desarrollo embrionario</i>	12
1.1.4. <i>Implantación embrionaria</i>	13
1.2. Etiología de la subfertilidad femenina	14
1.3. Manejo de la subfertilidad. Técnicas de reproducción asistida	16
1.3.1. <i>Evaluación de la reserva ovárica</i>	17
1.3.2. <i>Estimulación ovárica controlada y punción ovárica transvaginal eco-guiada</i>	17
1.3.3. <i>Fecundación in vitro</i>	18
1.3.4. <i>Cultivo embrionario</i>	19
1.3.5. <i>Diagnóstico genético preimplantacional</i>	19
1.3.6. <i>Transferencia embrionaria</i>	21
2. Compuestos ambientales y procedentes de la dieta	24
2.1. Mecanismos generales de lesión por exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta	25
2.2. Evidencias del impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados reproductivos de las pacientes de FIV.....	26
2.2.1. <i>Impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la reserva ovárica</i>	27
2.2.2. <i>Impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la respuesta a la estimulación ovárica</i>	28
2.2.3. <i>Impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la fecundación y el desarrollo embrionario pre-implantacional</i>	31
2.2.4. <i>Impacto de la exposición a contaminantes ambientales sobre los resultados clínicos de FIV</i>	33
2.3. Familias de compuestos ambientales y procedentes de la dieta evaluados en esta tesis en relación con los resultados del tratamiento de FIV.....	37
2.3.1. <i>Fitoestrógenos</i>	37
2.3.2. <i>Parabenos</i>	40
2.3.3. <i>Ftalatos</i>	41
2.3.4. <i>Elementos traza</i>	43
II. HIPÓTESIS	53
III. OBJETIVOS	57

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. Diseño del estudio	61
2. Población de estudio	62
3. Obtención y procesamiento de las matrices biológicas	63
3.1. Muestras de orina	63
3.2. Muestras de plasma.....	63
3.3. Muestras de líquido folicular	63
4. Evaluación de compuestos orgánicos mediante UPLC-MS/MS	64
4.1. Soluciones patrón y calibración	64
4.2. Preparación de las muestras.....	65
4.3. Método UPLC-MS/MS.....	66
4.3.1. Método UPLC-MS/MS para la medición de fitoestrógenos	66
4.3.2. Método UPLC-MS/MS para la medición de parabenos y MEHP	67
4.4. Generación de la curva de calibración.....	67
4.5. Estimación de los límites de cuantificación y límites superiores de cuantificación ...	68
5. Evaluación de elementos traza mediante IPC-MS	68
5.1. Soluciones patrón y calibración	68
5.2. Preparación de las muestras.....	69
5.3. Método IPC-MS.....	69
6. Evaluación de mercurio total mediante Tricell DMA-80	70
6.1. Soluciones patrón y calibración	70
6.2. Preparación de las muestras.....	71
6.3. Método Tricell DMA-80	71
7. Cuantificación de creatinina urinaria.....	72
8. Gestión clínica y evaluación de los resultados de FIV.....	72
9. Análisis estadístico.	74
V. RESULTADOS	79
1. Características demográficas y reproductivas basales de las participantes	79
2. Impacto de las concentraciones de fitoestrógenos en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV	81
2.1. Distribución de los fitoestrógenos en las matrices biológicas.....	81
2.2. Asociación de las concentraciones de fitoestrógenos con variables de reserva ovárica	83
2.3. Asociación de las concentraciones de fitoestrógenos con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV	84

2.4. Asociación de las concentraciones de fitoestrógenos con los resultados clínicos del tratamiento de FIV	86
3. Impacto de las concentraciones de parabenos en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV	88
3.1. Distribución de los parabenos en las matrices biológicas	88
3.2. Asociación de las concentraciones de parabenos con variables de reserva ovárica .	90
3.3. Asociación de las concentraciones de parabenos con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV	90
3.4. Asociación de las concentraciones de parabenos con los resultados clínicos del tratamiento de FIV	92
4. Impacto de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV	93
4.1. Distribución del metabolito de ftalato MEHP en las matrices biológicas	93
4.2. Asociación de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP con variables de reserva ovárica.....	93
4.3. Asociación de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV	94
4.4. Asociación de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP con los resultados clínicos del tratamiento de FIV	95
5. Impacto de las concentraciones de elementos traza esenciales en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV	96
5.1. Distribución de los elementos traza esenciales en las matrices biológicas	96
5.2. Asociación de las concentraciones de elementos traza esenciales con variables de reserva ovárica.....	101
5.3. Asociación de las concentraciones de elementos traza esenciales con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV	103
5.4. Asociación de las concentraciones de elementos traza esenciales con las variables clínicas del tratamiento de FIV	108
6. Impacto de las concentraciones de elementos traza no esenciales en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV	110
6.1. Distribución de los elementos traza no esenciales en las matrices biológicas	110
6.2. Asociación de las concentraciones de elementos traza no esenciales con variables de reserva ovárica.....	115
6.3. Asociación de las concentraciones de elementos traza no esenciales con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV	116
6.4. Asociación de las concentraciones de elementos traza no esenciales con los resultados clínicos del tratamiento de FIV	120

VI. DISCUSIÓN	125
1. Diseño del estudio	125
2. Metodología del estudio.....	127
3. Resultados del estudio.....	129
3.1. Impacto de las concentraciones de fitoestrógenos sobre los resultados de FIV	129
3.2. Impacto de las concentraciones de parabenos sobre los resultados de FIV.....	131
3.3. Impacto de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP sobre los resultados de FIV	132
3.4. Impacto de las concentraciones de elementos traza esenciales sobre los resultados de FIV	133
3.5. Impacto de las concentraciones de elementos traza no esenciales sobre los resultados de FIV.....	140
4. Fortalezas y limitaciones del estudio.....	144
5. Próximos pasos	145
VII. CONCLUSIONES	151
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	155
IX. ANEXOS.....	177
Anexo 1. Material suplementario	177
Anexo 2. Producción científica del doctorando	179

ABREVIATURAS

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
AFC	<i>Antral Follicle Count</i> (Recuento de Folículos Antrales)
AMH	<i>Anti-Mullerian Hormone</i> (Hormona Antimülleriana)
APOTI	Personal de apoyo vinculado a un proyecto de transferencia tecnológica
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Trifosfato de Adenosina)
BPA	<i>Bisphenol A</i> (Bisfenol A)
B-parabeno	Butil-parabeno
CI	<i>Confidence Interval</i> (Intervalo de Confianza)
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
COS	<i>Controlled Ovarian Stimulation</i> (Estimulación Ovárica Controlada)
CR	Creatinina
DAP	<i>Dialkyl phosphate</i> (Dialquil fosfato)
DBP	<i>Dibutyl phthalate</i> (Dibutil ftalato)
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE	Disruptor Endocrino
DEHP	<i>Di(2-ethylhexyl) phthalate</i> (Di(2-etilhexil) ftalato)
DEP	<i>Diethyl phthalate</i> (Dietil ftalato)
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
DGP-A	Diagnóstico Genético Preimplantacional para Aneuploidías
DINCH	<i>Di-iso-nonyl cyclohexanedicarboxylate</i> (diisononil ciclohexan-1,2-dicarboxilato)
E2	Estradiol, 17 β -estradiol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido Etilendiaminotetraacético)

EEUU	Estados Unidos
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por Electrospray)
FET	<i>Frozen Embryo Transfer</i> (Transferencia de Embriones Congelados)
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i> (Hormona Foliculoestimulante)
FT-ICR-MS	<i>Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas de Resonancia Ion-Ciclotrón con Transformada de Fourier)
GM	<i>Geometric Mean</i> (Media Geométrica)
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (Hormona Liberadora de Gonadotropinas)
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (Gonadotropina Coriónica Humana)
ICP/MS	<i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente)
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides)
IISS-La Fe	Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
IMC	Índice de Masa Corporal
IQR	<i>Interquartile Range</i> (Rango Intercuartílico)
IVI	Instituto Valenciano de Infertilidad
KED	<i>Kinetic Energy Discrimination</i> (Discriminación de Energías Cinéticas)
LC/MS-MS	<i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometer</i> (Espectrometría de Masas Acoplada a la Cromatografía Líquida)
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormona Luteinizante)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Limite de Cuantificación)
MBP	<i>Monobutyl phthalate</i> (Ftalato de monobutilo)
MBzP	<i>Monobenzyl phthalate</i> (Ftalato de monobencilo)
MCNP	<i>Mono-(carboxynonyl) phthalate</i> (Ftalato de mono-(carboxinonilo))
MEHP	<i>Mono(2-ethylhexyl) phthalate</i> (Ftalato de mono(2-etilhexilo))
MEP	<i>Monoethyl phthalate</i> (Ftalato de monoetilo)
M-parabeno	Metil-parabeno

MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitorización de Múltiples Reacciones)
N/A	<i>Not Available</i> (No disponible)
OCP	<i>Organochlorine Pesticide</i> (Pesticidas Organoclorados)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	<i>Organophosphates</i> (Organofosfatados)
OR	Odds Ratio
P20 vs P80	Comparación del Percentil 80 respecto al Percentil 20
PBDE	<i>Polybrominated Diphenyl Ether</i> (Éteres de Polibromodifenilos)
PCB	<i>Polychlorinated Biphenyl</i> (Bifenilos Policlorados)
PFA	<i>Perfluoroalkoxy Alkane</i> (Perfluoroalcóxido)
PFCs	<i>Perfluorinated Compound</i> (Perfluorocarburos)
PFOS	<i>Perfluorooctanesulfonic Acid</i> (Ácido Perfluorooctanosulfónico)
PFRs	<i>Phosphorus flame retardants</i> (Retardantes de llama organofosforados)
PGC	<i>Primordial Germ Cell</i> (Célula Germinal Primordial)
POP	<i>Persistent Organic Pollutant</i> (Compuesto Orgánico Persistente)
P-parabeno	Propil-parabeno
Q-TOF-MS	<i>Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer</i> (Espectrometría de Masas de Doble Cuadrupolo con Tiempo de Vuelo)
RMA NJ	<i>Reproductive Medicine Associates of New Jersey</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación Estandar)
SET	<i>Single Embryo Transfer</i> (Transferencia de Embrión Único)
ULOQ	<i>Upper Limit of Quantification</i> (Limite Superior de Cuantificación)
UI	Unidades Internacionales
UPLC/MS-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometer</i> (Espectrometría de Masas en Tandem acoplada a la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Tasas globales de fecundidad, Unión Europea, Japón y Estados Unidos, 1960-2013	3
Figura 2	Fecundación, desarrollo pre-implantacional e implantación embrionaria	6
Figura 3	Fases del ciclo ovárico y endometrial y su regulación hormonal	8
Figura 4	Clasificación de las principales fases de la foliculogénesis humana	11
Figura 5	Esquema de la implantación embrionaria	14
Figura 6	Factores que afectan a la fertilidad	15
Figura 7	Resumen del procedimiento de FIV	16
Figura 8	Rasgos comunes de las lesiones por contaminación ambiental	25
Figura 9	Esquema de las fuentes de exposición y vías de entrada en los seres humanos	45
Figura 10	Esquema del diseño del estudio	61
Figura 11	Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones entre los fitoestrógenos y las matrices biológicas	82
Figura 12	Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de fitoestrógenos y los resultados clínicos de FIV	87
Figura 13	Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones entre los parabenos y las matrices biológicas	89
Figura 14	Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de parabenos y los resultados clínicos de FIV	92
Figura 15	Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP y los resultados clínicos de FIV	95
Figura 16	Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza esenciales entre las matrices biológicas	99
Figura 17	Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza esenciales para cada matriz biológica	100
Figura 18	Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de elementos traza esenciales y los resultados clínicos de FIV	109
Figura 19	Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza no esenciales entre las matrices biológicas	113
Figura 20	Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza esenciales para cada matriz biológica	114
Figura 21	Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de elementos traza no esenciales y los resultados clínicos de FIV	121

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Compuestos y patrones internos empleados en el análisis mediante UPLC/MS-MS	64
Tabla 2	Condiciones cromatográficas para la medición de compuestos en ionización ESI+	66
Tabla 3	Condiciones de espectrometría de masas para la medición de compuestos en ionización ESI+	66
Tabla 4	Condiciones cromatográficas para la medición de compuestos en ionización ESI-	67
Tabla 5	Condiciones de espectrometría de masas para la medición de compuestos en ionización ESI-	67
Tabla 6	Límites de cuantificación y límites superiores de cuantificación para fitoestrógenos, parabenos y el metabolito de ftalato MEHP	68
Tabla 7	Parámetros instrumentales y de adquisición para ICP-MS	70
Tabla 8	Parámetros instrumentales y de adquisición para el instrumento DMA-80	72
Tabla 9	Características demográficas y reproductivas basales de las sesenta participantes	80
Tabla 10	Distribución de las concentraciones de fitoestrógenos en las muestras de líquido folicular y orina recogidos el día de la punción ovárica	81
Tabla 11	Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de fitoestrógenos	83
Tabla 12	Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de fitoestrógenos	85
Tabla 13	Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de fitoestrógenos	86
Tabla 14	Distribución de las concentraciones de parabenos en las muestras de líquido folicular y orina recogidos el día de la punción ovárica	88
Tabla 15	Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de parabenos	90
Tabla 16	Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de parabenos	91
Tabla 17	Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de parabenos	93
Tabla 18	Distribución de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en las muestras de líquido folicular y orina recogidos el día de la punción ovárica	94
Tabla 19	Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP	94
Tabla 20	Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP	95

Tabla 21	Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP	82
Tabla 22	Distribución de las concentraciones de elementos traza esenciales en las muestras de líquido folicular, plasma y orina recogidos el día de la punción ovárica	96
Tabla 23	Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de elementos traza esenciales	102
Tabla 24	Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de elementos traza esenciales	104
Tabla 25	Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de los elementos traza esenciales	106
Tabla 26	Distribución de las concentraciones de elementos traza no esenciales en las muestras de líquido folicular, plasma y orina recogidos el día de la punción ovárica	110
Tabla 27	Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de elementos traza no esenciales	115
Tabla 28	Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de elementos traza no esenciales	117
Tabla 29	Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de los elementos traza no esenciales	119

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Desde la segunda mitad del siglo XX se ha observado un acusado descenso de las tasas de fertilidad, fundamentalmente en las regiones industrializadas (Aitken, 2022; Skakkebæk *et al.*, 2022). Como se muestra en la figura 1, la tasa global de fecundidad (definida como el número medio de nacidos vivos por mujer en edad reproductiva) ha disminuido considerablemente en la Unión Europea, Estados Unidos y Japón (Figura 1). En esta misma línea, Hong Kong y Singapur han tenido durante décadas una tasa de fecundidad total significativamente inferior al nivel de reemplazo (actualmente se encuentran entre 1,0 y 1,5, cuando la tasa necesaria para mantener el tamaño poblacional es de 2,1) (Skakkebæk *et al.*, 2022). Por este motivo, la fertilidad se ha convertido en un tema de importancia política (Frejka *et al.*, 2010).

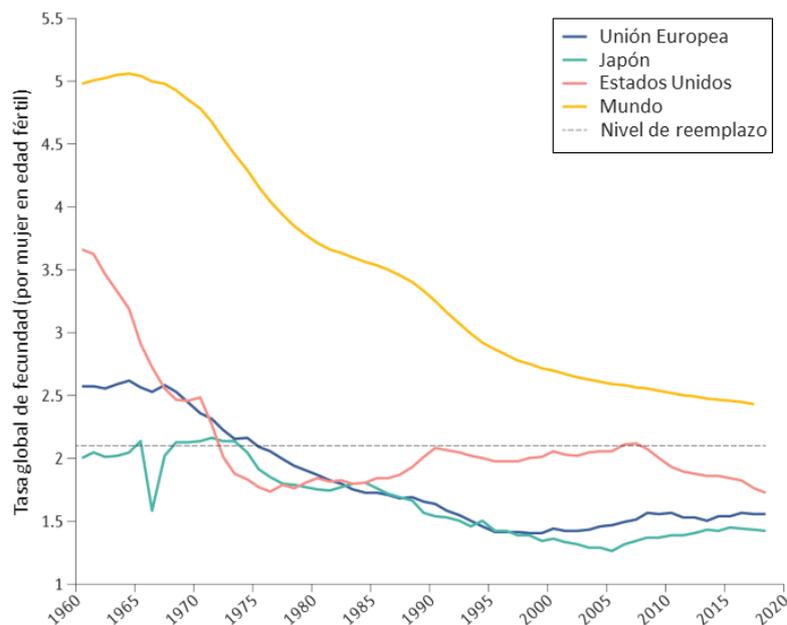


Figura 1. Tasas globales de fecundidad, Unión Europea, Japón y Estados Unidos, 1960-2013. La línea de puntos representa una tasa de fertilidad de 2,1, por debajo de la cual no se puede mantener la población. Fuente “the World Bank”, adaptada de Skakkebæk *et al.* 2022.

Entre los factores responsables de este descenso de la fertilidad humana se han incluido factores socioeconómicos, junto con la aparición de métodos anticonceptivos eficaces y un mayor acceso a los abortos inducidos. Sin embargo, este descenso de las tasas de fertilidad también se ha visto acompañado de un descenso paralelo de las tasas de abortos inducidos legales, lo que sostiene la idea del deterioro de las tasas totales de concepción (Skakkebæk *et al.*, 2022).

Aparte de estos factores, el foco sobre las causas que explican descensos en la fertilidad humana se ha dirigido hacia factores ambientales y de estilo de vida. Es paradigmático el caso de la fertilidad masculina, para el que se ha observado una marcada disminución de la calidad seminal y los niveles de testosterona acompañados con un incremento significativo de la incidencia de cáncer testicular (Skakkebaek *et al.*, 2015). Las alteraciones de la fertilidad masculina han ocurrido de forma tan universal y rápida, que no pueden explicarse mediante una base genética, y deben tener su origen en el medio ambiente (Skakkebaek *et al.*, 2015).

Entre los aspectos de la sociedad moderna considerados perjudiciales para la fertilidad humana se incluyen una serie de factores ambientales y de estilo de vida (p. ej. dieta, tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, exposición a contaminantes industriales, radiación electromagnética, estrés, comportamiento sedentario, etc.), muchos de los cuales se asocian a la inducción de estrés oxidativo en el tracto reproductivo (Aitken, 2020) y alteraciones en la señalización endocrina (Green *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2019).

Ante este incremento generalizado de los problemas de fertilidad humana, se ha incrementado la necesidad de recurrir a técnicas de reproducción asistida para compensar el empeoramiento de la calidad seminal y los problemas relacionados con la función ovárica y endometrial (Skakkebaek *et al.*, 2022). Aunque en los últimos años hemos experimentado un incremento exponencial en este tipo de técnicas, aun no tienen una efectividad del 100% y es necesario continuar con su refinamiento (Farquhar *et al.*, 2019). En este sentido, se hace necesaria la comprensión del impacto de los diversos compuestos ambientales y procedentes de la dieta que afectan a la reproducción humana y el éxito de las técnicas de reproducción asistida para identificar los factores deletéreos y poder desarrollar estrategias para controlar su exposición a través de la imposición de marcos normativos adecuados, la adopción de comportamientos de protección pertinentes y el desarrollo de estrategias para mitigar los efectos de estos compuestos sobre el sistema reproductivo.

1. La subfertilidad femenina

Según la OMS, la subfertilidad, comúnmente denominada esterilidad o infertilidad, se define como “un trastorno del aparato reproductor (masculino o femenino) consistente en la incapacidad para lograr el embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección o debido a una alteración de la capacidad de reproducción de una persona, ya sea como individuo o con su pareja” (WHO, 2018). La definición de infertilidad ha sido refinada a lo largo del tiempo mediante un proceso de consenso de la OMS, para posteriormente ser respaldadas por las sociedades regionales de fertilidad y las sociedades internacionales ocupadas de la atención a la salud reproductiva y la infertilidad (Chambers *et al.*, 2021; Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

La subfertilidad femenina primaria hace referencia a las mujeres que nunca han logrado un embarazo clínico, mientras que la subfertilidad femenina secundaria hace referencia a las mujeres que han logrado previamente un embarazo clínico y que no pueden establecer un embarazo clínico posterior (Chambers *et al.*, 2021; Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

1.1. Generalidades de la fisiología reproductiva femenina

Para lograr un embarazo sin asistencia existen distintos pasos clave relacionados con la fisiología reproductiva femenina. En primer lugar, es clave la liberación del gameto femenino, el oocito, para lo que es esencial un correcto desarrollo folicular orquestado por una compleja interacción de hormonas derivadas de la hipófisis, el hipotálamo, así como del propio folículo. Tras la liberación del oocito, en un proceso denominado ovulación, este entra en la trompa de Falopio, donde puede ser fecundado por los espermatozoides que hayan podido atravesar el tracto genital femenino. Una vez fecundado, el embrión se desarrolla hasta la fase de blastocisto a medida que avanza por la trompa de Falopio hacia la cavidad uterina, donde implanta en el endometrio (Figura 2).

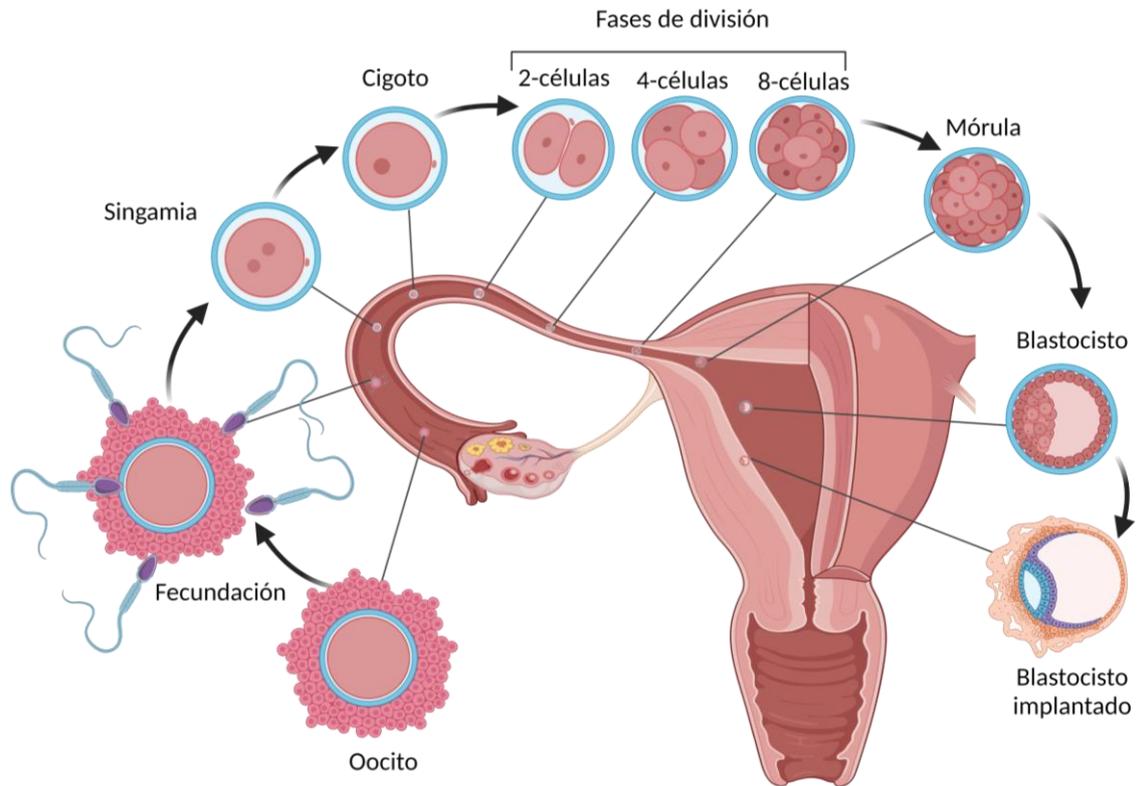


Figura 2. Fecundación, desarrollo pre-implantacional e implantación embrionaria. Para que tenga lugar la gestación son necesarios varios pasos, entre los que destacan un correcto desarrollo y liberación de un oocito maduro de los ovarios, su fecundación por un espermatozoide, un correcto desarrollo pre-implantacional a lo largo de su paso por las trompas de Falopio y la implantación en el endometrio uterino. *Figura generada con Biorender.com.*

1.1.1. Control hormonal de la reproducción femenina

La vida reproductiva femenina se caracteriza por la presencia de cambios rítmicos mensuales en las tasas de secreción de las hormonas sexuales, controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Este control comienza en el hipotálamo, donde se libera la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de forma pulsátil y viaja hasta la hipófisis. La liberación pulsátil de GnRH es fundamental para la función reproductiva. Esto significa que un aumento o una disminución de la GnRH inhibe todo el sistema. A nivel hipofisario, la GnRH estimula la biosíntesis y la liberación de dos gonadotropinas que controlan los ovarios: la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) (Mihm *et al.*, 2011; Richards, 2018). El ciclo menstrual incluye el ciclo ovárico y el ciclo endometrial, dos procesos que ocurren de forma simultánea y se encuentran altamente coordinados a través de una interacción mutua (Figura 3).

El ciclo ovárico presenta dos fases, la folicular y la lútea, separadas por la ovulación. La FSH es la gonadotropina predominante durante la fase folicular, y estimula el crecimiento del folículo ovárico a la vez que controla la producción de estrógenos en el ovario (Hawkins and Matzuk, 2008; Richards, 2018) (Figura 3). La LH desempeña el papel dominante durante la segunda mitad del ciclo ovárico, que comienza con una oleada inicial que conduce a la ovulación. Tras la liberación de los oocitos, se forma el cuerpo lúteo y la LH estimula y mantiene la producción de progesterona (Figura 3). Ambas hormonas esteroideas, el estrógeno y la progesterona, proporcionan una retroalimentación negativa al hipotálamo y a la hipófisis, lo que provoca una represión de las hormonas estimulantes. Además, estas hormonas también afectan a múltiples tejidos corporales, como las mamas, los huesos, los folículos pilosos, los músculos y, por supuesto, el útero (Hawkins and Matzuk, 2008; Richards, 2018).

El ciclo endometrial consta de dos partes: la fase proliferativa, que corresponde a la fase folicular en el ovario, y la fase secretora, que corresponde a la fase lútea. La fase proliferativa comprende los procesos que transcurren desde la menstruación hasta la ovulación. Durante esta fase, el revestimiento endometrial se engrosa, transformándose en un patrón proliferativo debido a la acción de los estrógenos (Figura 3). La fase secretora comprende los procesos que transcurren desde la ovulación hasta la menstruación. En esta fase, la progesterona producida tras la ovulación por el cuerpo lúteo hace que el endometrio segregue glucógeno y moco durante la fase secretora temprana. En la fase secretoria media, el endometrio sufre un proceso de diferenciación denominado decidualización y se vuelve receptivo a la implantación embrionaria. Por último, en la fase secretora tardía, si no se produce la implantación embrionaria, los niveles de estrógeno y progesterona descienden, lo que conduce a una reducción del flujo sanguíneo del endometrio que provoca su involución (Hawkins and Matzuk, 2008; Mihm *et al.*, 2011). Además de su efecto sobre el endometrio, la progesterona disminuye la frecuencia e intensidad de las contracciones uterinas, lo que ayuda a evitar la expulsión del embrión implantado (Hawkins and Matzuk, 2008; Mihm *et al.*, 2011).

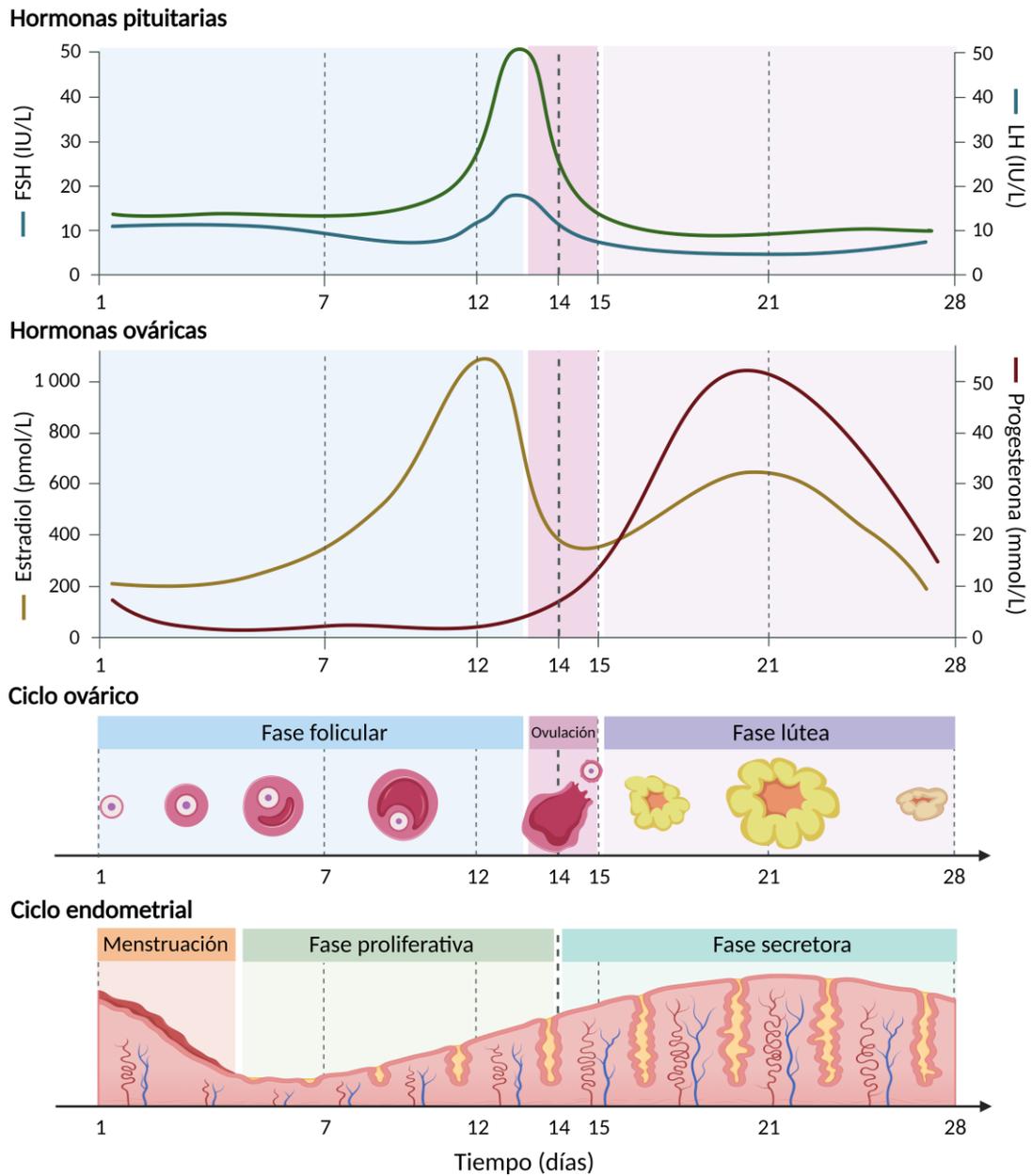


Figura 3. Fases del ciclo ovárico y endometrial y su regulación hormonal. La LH y la FSH controlan el ciclo ovárico, que consta de dos fases, folicular y lútea, separadas por la ovulación. Las hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) producidas por los ovarios controlan el ciclo uterino o endometrial, que consta de tres partes: la menstruación y las fases proliferativa y secretora, que se corresponden con las fases folicular y lútea, respectivamente. *Figura generada con Biorender.com.*

1.1.2. Formación del gameto femenino, foliculogénesis

El desarrollo folicular se inicia durante el desarrollo fetal en el segundo trimestre de gestación. Se considera que el primer acontecimiento de este proceso es la migración de las células germinales primordiales (PGC, del inglés *Primordial Germ Cells*) a la cresta genital embrionaria (Ginsburg *et al.*, 1990). Una vez las PGC alcanzan la cresta genital, se origina la gónada bipotencial que, dependiendo de señales hormonales, se transformará en un ovario o en un testículo. Simultáneamente, se produce el desarrollo de células somáticas, que servirán de soporte en la gónada y desempeñan un papel crucial en la diferenciación de las PGC (Jameson *et al.*, 2012) (Figura 4).

Tras la diferenciación de las PGC en oogonias, se inicia un periodo de mitosis acelerada hasta generarse un máximo de 6 millones de oogonias a las 20 semanas de gestación. En este periodo de proliferación la citocinesis es incompleta, por lo que las células forman sincitios (también denominados nidos de células germinales) conectados y sincronizados mediante puentes intracelulares. En esta fase de desarrollo toda la población de oogonias atraviesa el primer ciclo de meiosis y queda detenido en el diploteno de la profase del segundo ciclo de meiosis. Posteriormente, los nidos de células germinales comienzan a descomponerse para formar los folículos primordiales. Cada folículo primordial está formado por un oocito rodeado por una capa epitelial aplanada que posteriormente se diferenciará para formar las células de la granulosa (Figura 4). La formación de los folículos primordiales se ve acompañada por una pérdida masiva de células (Pepling and Spradling, 2001). La mayor parte de los folículos primordiales permanecerán quiescentes y degenerarán en estado latente. Los que sobrevivan, servirán como reserva de folículos ováricos y serán reclutados para desarrollar y establecer el conjunto de folículos en crecimiento. De los folículos en crecimiento, una gran parte está destinada a pasar por otra ola de muerte masiva, denominada degeneración oocitaria, y solo una pequeña parte se activará para transformarse en folículos primarios (Cox and Takov, 2022). En el momento del nacimiento sobrevivirán aproximadamente un millón de células germinales, que se agotarán continuamente a lo largo de la vida de la mujer. El ritmo de pérdida puede verse acelerado por factores genéticos (p. ej. el síndrome de Turner o ser portador de la mutación del cromosoma X frágil), factores biológicos (p. ej. la infección por el virus de las paperas), factores ambientales (p. ej. el tratamiento con quimioterapia o

radioterapia, factores negativos de estilo de vida como el tabaquismo o la exposición a contaminantes ambientales), la cirugía ovárica o la presencia de enfermedades autoinmunes.

El paso de folículos primordiales a folículos primarios se caracteriza por el engrosamiento de las células de la granulosa (Cox and Takov, 2022). Los folículos primarios se transforman en folículos secundarios, conformados por un oocito en crecimiento rodeado por dos o más capas de células de la granulosa en proliferación. Estos folículos continúan creciendo hasta alcanzar el estadio preantral (Figura 4). En este momento se forma una membrana basal fuera de las células de la granulosa y una nueva capa de células somáticas, denominada teca, encapsula los folículos. A su vez, la teca se subdivide en dos compartimentos, el interno y el externo. Las células de la teca sirven como fuente de andrógenos, que son sustratos para la producción de estrógenos por parte de las células de la granulosa (Richards *et al.*, 2018). Dado que los vasos sanguíneos no penetran más allá de la membrana basal, la vascularización del folículo secundario se limita a las células de la teca mientras que el folículo interno permanece avascularizado (Knight *et al.*, 2012).

Desde el estadio primordial hasta el preantral, el crecimiento folicular es independiente de la estimulación de las gonadotropinas. El desarrollo y reclutamiento de estos folículos primordiales está regulado por señales paracrinas y autocrinas, originadas tanto por el oocito como por las células somáticas (Figura 4). Las células somáticas de los folículos apoyan el crecimiento y el desarrollo del oocito, mientras que el oocito desempeña un papel fundamental en la regulación de la proliferación y la diferenciación tanto de las células de la granulosa como de las células de la teca (Edson *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Rimon-Dahari *et al.*, 2016).

Posteriormente, en los folículos preantrales comienzan a aparecer cavidades llenas de líquido que finalmente se unen para formar el antro en un proceso que tarda varios meses en completarse (Cox and Takov, 2022; Oktem and Urman, 2010; Rimon-Dahari *et al.*, 2016). Con el desarrollo del antro, el folículo se vuelve receptivo a las gonadotropinas (Cox and Takov, 2022; Oktem and Urman, 2010; Rimon-Dahari *et al.*, 2016) (Figura 4). En el folículo antral, las capas más internas de la granulosa se diferencian como células del cumulo. La mayor parte de los folículos antrales sufrirán una degeneración atrésica (Matsuda *et al.*, 2012), y sólo un pequeño porcentaje responderá a las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH (Cox and Takov,

2022; Rimon-Dahari *et al.*, 2016; Zeleznik, 2001). La primera gonadotropina que afecta al folículo antral, la FSH, es responsable de la supervivencia de las células de la granulosa y de su proliferación, de la producción de estradiol y de la expresión de los receptores de LH (Edson *et al.*, 2009; Richards, 2018).

Los folículos antrales que expresan una alta concentración de receptores de LH responderán a esta gonadotropina para transformarse en folículos preovulatorios/graafianos (Rimon-Dahari *et al.*, 2016). La oleada de LH preovulatoria activa los folículos de Graaf, generando una secuencia de eventos, incluyendo la maduración del oocito, la reanudación de la mitosis hasta el anafase de la mitosis II, la mucificación de las células del cúmulo, la ruptura del folículo y la posterior extrusión del oocito. Esta serie de acontecimientos se denomina colectivamente ovulación. Tras la ovulación, el resto de células de la granulosa y de la teca sufre su diferenciación terminal para formar el cuerpo lúteo (Figura 4).

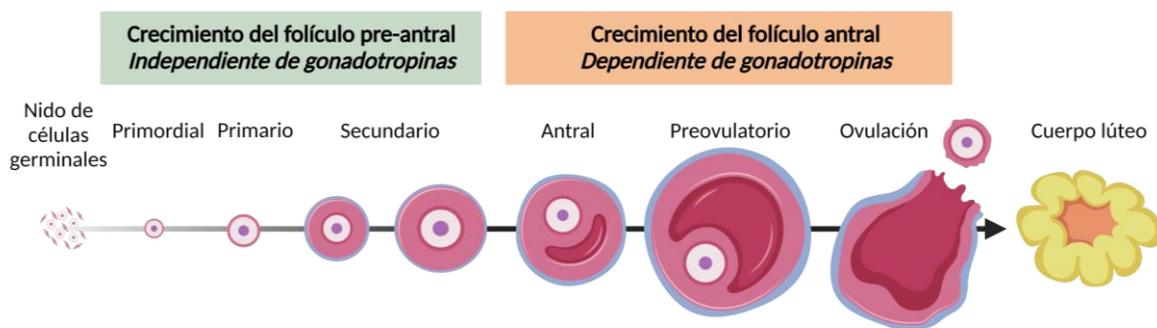


Figura 4. Clasificación de las principales fases de la foliculogénesis humana. Los folículos primordiales se forman durante el desarrollo fetal independientemente de las gonadotropinas de la pituitaria. En la fase secundaria, se forma una capa adicional de células somáticas, denominada teca, alrededor de la membrana basal del folículo. Durante la pubertad, la FSH secretada por la pituitaria promueve la proliferación de las células de la granulosa y su supervivencia. La ovulación del folículo dominante ocurre en respuesta a un pico de secreción de la otra gonadotropina secretada por la pituitaria, la LH. Tras la ovulación, el resto de las células de la granulosa y de la teca sufre su diferenciación terminal para formar el cuerpo lúteo. *Figura generada con Biorender.com.*

1.1.3. Fecundación y desarrollo embrionario

Tras el proceso de ovulación, en el que se produce la liberación del oocito maduro rodeado por las células del cúmulo desde el ovario a las fimbrias de la trompa de Falopio, el oocito es fecundado en la ampolla del extremo distal de la trompa de Falopio (Figura 2). El proceso de unión de la membrana de un espermatozoide, tras haber sufrido la reacción acrosómica, inicia las oscilaciones de calcio intracelular que completa el segundo ciclo de meiosis del oocito con la extrusión del segundo corpúsculo polar. Además, el acrosoma del espermatozoide contiene varias enzimas líticas y proteínas de unión a la zona pelúcida (Okabe, 2013; Siu *et al.*, 2021). El aumento de calcio dentro del oocito es un factor desencadenante del desarrollo del pronúcleo femenino y el ácido desoxirribonucleico (ADN) del espermatozoide, que se encuentra densamente empaquetado con protaminas, pasa a descondensarse y envolverse alrededor de los nucleosomas para formar el pronúcleo masculino (Clift and Schuh, 2013). Además, durante el desempaquetamiento se produce una demetilación global del ADN del pronúcleo masculino, de forma rápida y activa. Por el contrario, la demetilación del ADN del pronúcleo femenino es pasiva y más lenta. Se han descrito aproximadamente 150 genes con impronta, en los que su patrón de metilación se encuentra determinado por el progenitor de origen del gen y este patrón se conserva en el embrión (Plasschaert and Bartolomei, 2014; Zeng and Chen, 2019). Durante este periodo, las mitocondrias espermáticas son destruidas, para evitar la heteroplasmia mitocondrial (Cummins, 2000). El momento en el que se produce la fusión de los pronúcleos se denomina singamia, y es el evento que completa la fecundación. Posteriormente, los centriolos se duplican y migran alrededor del núcleo del cigoto para formar los polos opuestos del primer huso mitótico y comenzar la primera división celular (Schatten and Sun, 2009). Las primeras divisiones embrionarias se encuentran regulados por los transcritos de ARNm y las proteínas presentes dentro del ooplasma. Posteriormente se produce la denominada transición materno-cigótica, en la que el genoma embrionario se activa y el embrión comienza a ser transcripcionalmente activo, hasta alcanzar la fase de blastocisto y poder iniciar la implantación embrionaria (Lechniak *et al.*, 2008) (Figura 2).

1.1.4. Implantación embrionaria

La implantación embrionaria es un proceso finamente coordinado en el que un embrión competente en fase de blastocisto se adhiere e invade un endometrio receptivo para permitir la placentación y el inicio del embarazo. Este proceso solo puede ocurrir durante un periodo limitado de tiempo en el que el endometrio es receptivo, denominado ventana de implantación. Por tanto, es esencial que exista una sincronía entre que el blastocisto adquiera la competencia para la implantación y que el endometrio se encuentre en un estado receptivo. Ambos eventos se encuentran finamente orquestados por las hormonas maternas, particularmente las hormonas esteroideas estrógenos y progesterona (Hirota, 2019; Zhang *et al.*, 2013).

La implantación embrionaria ocurre en tres fases: aposición, adhesión e invasión del blastocisto (Figura 5). Durante la aposición, el blastocisto es guiado a una localización específica del endometrio para su implantación, y este orienta su polo embrionario con la masa celular interna dirigida hacia la superficie epitelial (Zhang *et al.*, 2013). Una vez posicionado, el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida y, durante la fase de adhesión, se posiciona en contacto estrecho con el epitelio luminal del endometrio. La adhesión ocurre a través del establecimiento de interacciones ligando-receptor entre el trofoectodermo y las células epiteliales endometriales. Finalmente, las células del trofoblasto endometrial se vuelven invasivas y atraviesan la capa epitelial hacia el estroma endometrial para alcanzar la vasculatura endometrial (Zhang *et al.*, 2013).

Simultáneamente, las células del estroma endometrial comienzan un proceso de diferenciación, denominado decidualización, en respuesta a la presencia continua de progesterona. La decidualización consiste en la reprogramación morfológica y bioquímica de las células del estroma endometrial para transformarse en células secretoras de morfología epitelioide, conocidas como células deciduales. Al mismo tiempo, las glándulas uterinas sufren una transformación secretora, se produce la regulación del sistema inmune, y la matriz extracelular y la vasculatura endometrial son remodeladas. La decidua completamente desarrollada proporciona dos funciones clave para el embrión. En primer lugar, la decidua aporta la sangre materna necesaria para la nutrición fetal. Adicionalmente, la decidua proporciona una envoltura que limita la capacidad invasiva del feto mientras que lo protege del rechazo inmunológico materno hasta la formación de una placenta funcional (Ashary *et*

al., 2018; Zhang *et al.*, 2013). Dada su relevancia en el establecimiento y mantenimiento del embarazo, cualquier error en la implantación contribuirá a un aborto temprano o a complicaciones en el embarazo (Zhang *et al.*, 2013).

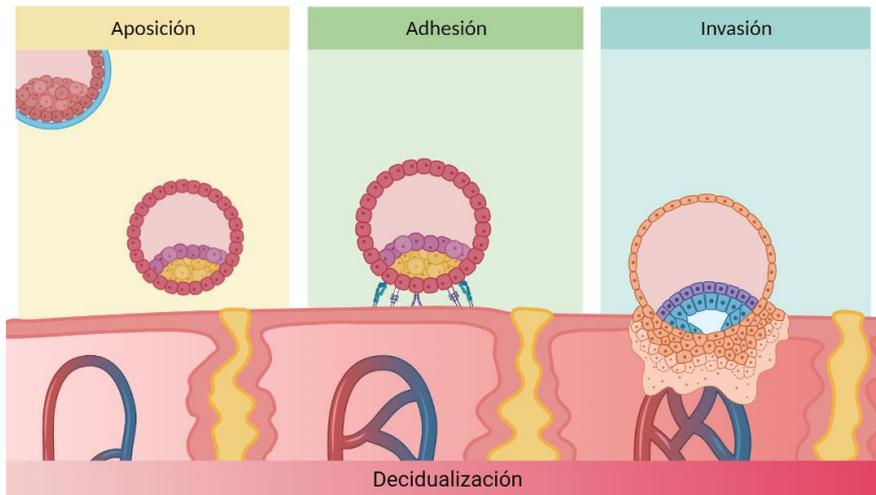


Figura 5. Esquema de la implantación embrionaria. La implantación del embrión es un proceso complejo en el que se distinguen tres fases: la aproximación inicial del blastocisto a un lugar concreto de la luz endometrial (aposisión), la adhesión estable entre el trofotodermo del blastocisto y el epitelio uterino (adhesión) y la invasión final del trofotodermo para asentarse en el estroma endometrial (invasión). Para que tenga lugar una correcta implantación, el estroma endometrial debe sufrir una transformación funcional denominada decidualización. *Figura generada con Biorender.com.*

1.2. Etiología de la subfertilidad femenina

En la mujer, la subfertilidad puede estar relacionada con cualquiera de los procesos previamente descritos. En el hombre, la subfertilidad se centra en la producción inadecuada o ausencia de producción de espermatozoides (Figura 6).

Las causas más comunes de subfertilidad femenina son la disfunción ovulatoria (p. ej. la insuficiencia ovárica o el síndrome de ovario poliquístico), el bloqueo o daño de las trompas de Falopio, la endometriosis o la presencia de fibromas uterinos (Figura 6).

La insuficiencia ovárica es una pérdida de función de los ovarios que reduce la posibilidad de embarazo en todas las mujeres a partir de los 35 años, pero que se produce de forma prematura en algunas mujeres. Las trompas de Falopio obstruidas o dañadas pueden causar subfertilidad o un mayor riesgo de embarazo ectópico (Shaw *et al.*, 2010; van der Steeg *et al.*, 2007). La endometriosis puede crear un entorno pélvico desfavorable, mientras que los fibromas uterinos pueden impedir el transporte tubárico, causar una obstrucción tubárica o

afectar a la implantación del embrión, y todo ello puede provocar subfertilidad en la mujer (Figura 6).

Hasta en un 30% de las parejas que acuden a tratamientos de reproducción asistida no se encuentra ninguna causa identificable como origen de la subfertilidad tras un protocolo de diagnóstico estándar y las pruebas de ovulación, permeabilidad tubárica y análisis de semen, entre otras, son normales (Ray *et al.*, 2012). Estos casos se denominan comúnmente subfertilidad inexplicada, aunque es necesario remarcar que el término inexplicada no significa que la subfertilidad no tenga una causa subyacente, sino que la causa no ha sido identificada.

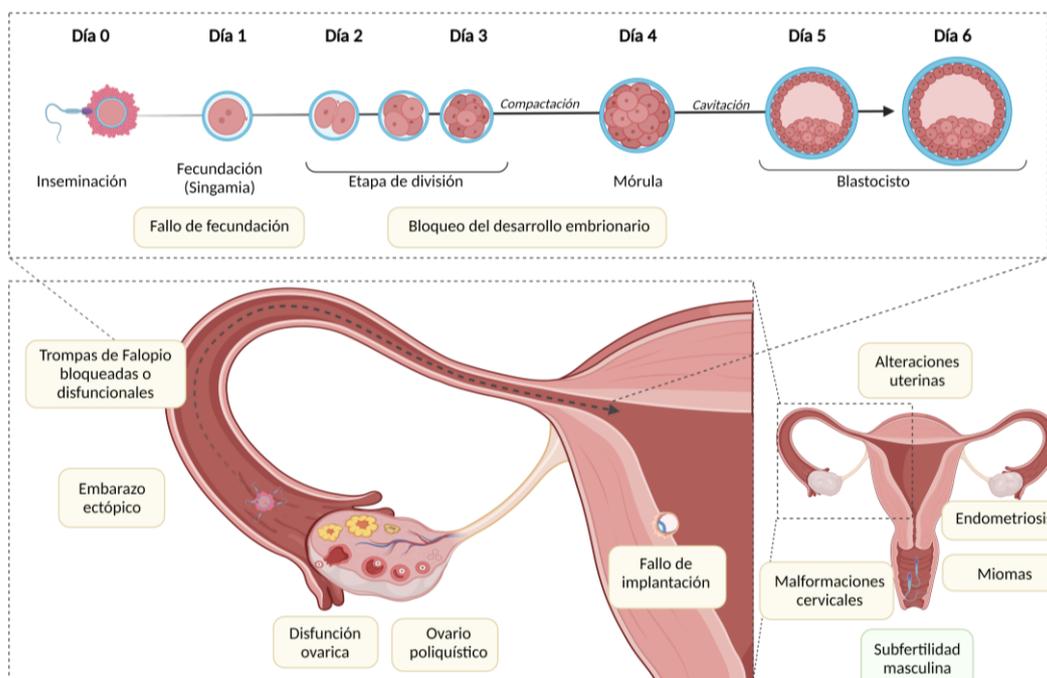


Figura 6. Factores que afectan a la fertilidad. Alteraciones en el desarrollo de los espermatozoides (incluido un bajo recuento de espermatozoides, una baja movilidad o un bajo número de espermatozoides con morfología normal) o de los ovocitos (p. ej. el causado por la anovulación) o el hecho de que los espermatozoides no alcancen y fecunden el ovocito (p. ej. debido a una obstrucción, malformación o infección de los tractos genitales femeninos o masculinos) impide la generación de un embrión. El embrión puede no desarrollarse durante las fases pre-implantacionales, implantar fuera del útero (embarazo ectópico) o no implantarse en el útero. Para que la implantación y el desarrollo del embrión sean correctos, se requiere un entorno uterino receptivo, que incluya unas condiciones biofísicas adecuadas (como la temperatura y el pH) y una sincronía de desarrollo entre un embrión sano y un endometrio funcionalmente competente, así como un diálogo molecular satisfactorio entre ambos. Por consiguiente, las anomalías uterinas, como las anomalías congénitas, los miomas u otras adherencias, pueden impedir que el embrión implantado siga desarrollándose. Además, el cuello uterino debe ser accesible, estar abierto y tener el entorno adecuado para permitir el paso, la activación y la capacitación de los espermatozoides. *Figura generada con Biorender.com, adaptada de Farquhar et al., 2019.*

1.3. Manejo de la subfertilidad. Técnicas de reproducción asistida

En estas cuatro décadas desde el nacimiento de los primeros bebés humanos gracias a las técnicas de reproducción asistida, ha tenido lugar un crecimiento exponencial en el desarrollo y uso de estos procedimientos, lo que ha dado lugar a mayores tasas de implantación y de recién nacidos vivos (Kamel, 2013; Wale and Gardner, 2016). Hasta el momento se han registrado más de 6 millones de nacimientos en todo el mundo relacionados con procedimientos de reproducción asistida, gracias a los que personas con problemas de fertilidad han podido cumplir sus deseos genésicos. El descenso de los costes y el aumento de la accesibilidad a este tipo de técnicas han servido para aliviar el estrés y los problemas sociales derivados de la subfertilidad (Sallam, 2011).

Existen múltiples tratamientos de reproducción asistida. A continuación, realizaremos una somera revisión sobre aquellos aspectos relacionados con estas técnicas necesarios para la correcta interpretación de la presente tesis, resumidos en la figura 7.

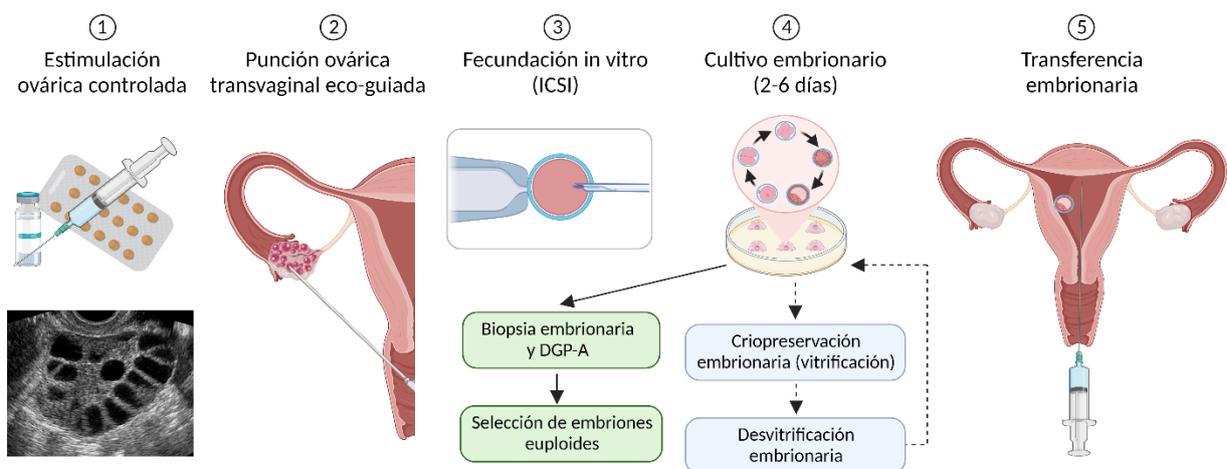


Figura 7. Resumen del procedimiento de FIV. Se administran gonadotropinas para estimular el crecimiento de los folículos ováricos y antagonistas de la GnRH para suprimir el ciclo menstrual natural y reducir la regulación de la hipófisis (paso 1). Durante la fase de estimulación de la ovulación, se lleva a cabo un seguimiento regular mediante ecografía (con o sin análisis de sangre) para evaluar el crecimiento de los folículos ováricos y evitar la hiperestimulación ovárica. Cuando los folículos han alcanzado un tamaño adecuado, se induce la maduración final de los ovocitos (desencadenamiento de la ovulación). Los ovocitos se recogen, normalmente con una sonda de ecografía transvaginal como guía, bajo anestesia general o local con sedación (paso 2). Los ovocitos y los espermatozoides se ponen en contacto, bien en una placa Petri (FIV tradicional) o directamente mediante el ICSI (paso 3). El ovocito fecundado, ahora denominado embrión de preimplantación, se cultiva durante 2-6 días *in vitro* (paso 4). Estos embriones pueden ser biopsiados, para seleccionar los embriones euploides mediante técnicas de DGP-A, y/o criopreservados mediante vitrificación, para posteriormente ser desvitrificados en el momento en que se desee realizar la transferencia embrionaria (paso 4). Del conjunto de embriones disponibles, se seleccionará uno (en ocasiones, dos) para su transferencia a la cavidad uterina (paso 5). *Figura generada con Biorender.com, adaptada de Farquhar et al., 2019.*

1.3.1. Evaluación de la reserva ovárica

Antes de realizar cualquier tratamiento de reproducción asistida, es necesario evaluar la reserva ovárica para poder pronosticar el éxito de la estimulación ovárica y poder aconsejar las técnicas más apropiadas (Fauser, 2010; McIlveen *et al.*, 2007). Entre las técnicas habitualmente empleadas para evaluar la reserva ovárica destacan el recuento de folículos antrales (AFC, del inglés *Antral Follicle Count*) y la evaluación de la concentración de hormona antimülleriana (AMH, del inglés *Anti-Mullerian Hormone*) (Fauser, 2010).

La AMH es sintetizada por las células de la granulosa presentes en los folículos ováricos preantrales y antrales tempranos y juega un papel esencial en la foliculogénesis humana (Bedenk *et al.*, 2020). Las concentraciones de AMH son más altas en la pubertad y disminuyen a lo largo de la vida reproductiva, hasta ser indetectables en el momento de la menopausia (Bedenk *et al.*, 2020). La concentración de AMH tiene poca variabilidad intra-ciclo, lo que permite su evaluación en cualquier momento del ciclo menstrual (Lambert-Messerlian *et al.*, 2016). Factores como el tabaquismo, la ingesta de alcohol o la obesidad pueden disminuir sus valores (Iliodromiti *et al.*, 2015; Lambert-Messerlian *et al.*, 2016).

1.3.2. Estimulación ovárica controlada y punción ovárica transvaginal ecoguiada

La estimulación ovárica controlada (COS, del inglés *Controlled Ovarian Stimulation*) con gonadotropinas es un procedimiento esencial de los tratamientos de FIV. Su objetivo es generar el mayor número de oocitos maduros para maximizar las posibilidades de éxito del tratamiento de la manera más segura posible (Bosch *et al.*, 2020; Howie and Kay, 2018).

De forma fisiológica lo habitual es que dentro del grupo de folículos ováricos reclutados cada ciclo ovárico solo el folículo dominante es el destinado a desarrollarse completamente y ovular. Este proceso de selección será debido a una interacción entre señales inhibitorias producidas por el folículo dominante, que disminuyen la secreción de FSH, y la capacidad del folículo dominante de ser el que mejor responde a la FSH. Este proceso de retro-inhibición conduce a la dominancia del folículo seleccionado, ya que al disminuir la secreción de FSH y ser el que mejor responde a esta hormona impide el desarrollo de los folículos restantes, que necesitarían mayores concentraciones de FSH para desarrollarse. La COS consiste en la administración secuencial de distintos fármacos (fundamentalmente FSH), a dosis

suprafisiológicas durante un periodo de tiempo conveniente para rescatar la cohorte de folículos reclutados en ese ciclo ovárico (Bosch *et al.*, 2020; Howie and Kay, 2018).

Después de 36-37 horas tras el desencadenamiento de la ovulación, se realiza la punción ovárica transvaginal guiada por ultrasonidos (D'Angelo *et al.*, 2019; Gardner *et al.*, 2017). Esta técnica quirúrgica es empleada por profesionales médicos para extraer los oocitos maduros directamente de los ovarios, guiados con imagen por ultrasonidos (D'Angelo *et al.*, 2019). Mediante el empleo de ultrasonidos como guía, el profesional inserta una aguja fina, a través de la pared vaginal, en el ovario para acceder a los folículos maduros. Una vez dentro del ovario, la aguja, adherida a un sistema de succión, es guiada por el profesional dentro de los folículos, de los que cuidadosamente succiona el líquido folicular en el que teóricamente se encuentran los oocitos maduros. Los tubos con la mezcla de líquido folicular y oocitos son mantenidos a 37°C y rápidamente transferidos al laboratorio de FIV para que los embriólogos puedan proceder al aislamiento de los complejos corona-oocito (D'Angelo *et al.*, 2019; Gardner *et al.*, 2017).

1.3.3. Fecundación *in vitro*

Gracias a la estimulación ovárica y la posterior punción ovárica, se obtendrán múltiples oocitos maduros que podrán ser fecundados y los embriones obtenidos cultivados *in vitro* por los embriólogos en el laboratorio de FIV.

Tras la punción ovárica, los tubos con la mezcla de líquido folicular y complejos cumulo oocito son transferidos al laboratorio de FIV, donde los embriólogos proceden a aislar estos complejos. El líquido folicular, que constituye el microambiente en el que se encuentran los oocitos, es habitualmente descartado, aunque puede ser de gran utilidad para la identificación de biomarcadores de calidad oocitaria o respuesta del tratamiento de FIV (Adamczak *et al.*, 2021; Bracewell-Milnes *et al.*, 2017; Dumesic *et al.*, 2015). Posteriormente, en el caso de que vaya a realizarse inseminación mediante ICSI, los oocitos serán decumulados de las células de la granulosa empleando una solución de hialuronidasa. Una vez decumulados, los embriólogos proceden a evaluar la calidad del oocito por la morfología del citoplasma, los orgánulos y en el aspecto de las estructuras extracitoplasmáticas como la zona pelúcida, el espacio perivitelino, y la presencia del primer corpúsculo polar para la evaluación de la maduración oocitaria, entre otros factores (Anagnostopoulou *et al.*, 2022; Gardner *et al.*, 2017).

A continuación, se procede a la fecundación de los oocitos maduros mediante métodos diseñados para facilitar el encuentro entre el espermatozoide y el oocito fuera del sistema reproductivo femenino, como la fecundación *in vitro* (FIV) tradicional o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, del inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*). La FIV tradicional permite este encuentro en microgotas de medio de cultivo en una placa, mientras que en el ICSI se procede a la inyección de un espermatozoide directamente en el citoplasma del oocito (Esteves *et al.*, 2018; Gardner *et al.*, 2017).

1.3.4. Cultivo embrionario

En la actualidad, los embriones se cultivan en pequeñas gotas de medio de cultivo colocadas en placas de cultivo que luego se recubren con aceite. Estas placas de cultivo se almacenan en incubadores que mantienen una temperatura y un entorno gaseoso constantes.

Este método de cultivo se ha mantenido en los laboratorios de FIV durante mucho tiempo, gracias a las distintas ventajas que aporta. Por ejemplo, el hecho de que puedan colocarse muchas gotas pequeñas en placas de cultivo estándar facilita el cultivo simultáneo de múltiples embriones en una sola placa, lo que facilita la evaluación y accesibilidad a los embriones y la trazabilidad de los mismos. Los volúmenes relativamente grandes de medio de cultivo utilizados proporcionan tanto un vasto suministro de nutrientes a concentraciones relativamente estables, así como como una gran reserva para diluir los productos de desecho. La capa de aceite que recubre a las gotas protege contra las pérdidas por evaporación y también sirve de sumidero térmico y gaseoso, lo que permite resguardar temporalmente a los embriones de este tipo de fluctuaciones (Johnson and Gardner, 2011).

1.3.5. Diagnóstico genético preimplantacional

El diagnóstico genético pre-implantacional (DGP) comenzó a principios de los años noventa como una alternativa al diagnóstico prenatal, con el objetivo de evitar una posible interrupción del embarazo en parejas con alto riesgo de descendencia afectada por enfermedades genéticas. La idea inicial consistía en establecer un diagnóstico genético de enfermedades monogénicas de embriones obtenidos mediante FIV y exclusivamente transferir aquellos libres de la mutación relacionada con la enfermedad, con la esperanza de conseguir un embarazo sano. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas de DGP, se observó que los embriones de las parejas sometidas a tratamientos de fertilidad presentaban

una gran cantidad de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales adquiridas que también estaban relacionadas con una baja tasa de éxito tras las técnicas de FIV.

Gracias a la generación de múltiples embriones durante la FIV, el diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías (DGP-A) posee una clara ventaja numérica respecto a las pruebas durante el embarazo, ya que se incrementan las probabilidades de identificar y transferir embriones genéticamente euploides (Carvalho *et al.*, 2020; Stern, 2014), además del ahorro de tiempo y desgaste psicológico de la pareja sometida a una transferencia embrionaria que en ningún caso daría lugar a un recién nacido vivo.

El DGP puede mejorar las tasas de éxito de la FIV mediante el incremento de las tasas de implantación y la reducción de las pérdidas de embarazos. Para distintos grupos de pacientes el DGP es esencial: pacientes con historial de aborto o interrupciones del embarazo por causa genética, pacientes con objeciones morales o religiosas a la interrupción del embarazo, pacientes portadores de una translocación u otra anomalía cromosómica y han experimentado repetidos abortos espontáneos o infertilidad, y los que están en riesgo de transmitir una enfermedad genética y también son infértiles. Además, los pacientes que pueden presentar una enfermedad de aparición tardía, como la predisposición al cáncer hereditario o el síndrome de Huntington, y desean un hijo sano también pueden acudir a las técnicas de DGP, o para la selección de embriones con un HLA determinado para que el recién nacido pueda ayudar en el tratamiento de un niño ya enfermo (Harper, 2018; Stern, 2014). Sin embargo, el DGP también está siendo muy utilizado en la práctica de la FIV sin razones clínicas porque se ha descrito de que la realización de DGP-A puede aumentar la implantación mediante la selección de los embriones con mejor morfología y con un perfil cromosómico euploide (Bhatt *et al.*, 2021; Pirtea *et al.*, 2021).

El DGP-A se emplea específicamente para seleccionar embriones euploides en pacientes con “mal pronóstico”, lo que permite incrementar la eficacia del procedimiento de FIV tras el cribado de aneuploidías embrionarias. La biopsia puede realizarse en tres etapas diferentes: corpúsculo polar, en fases previas a la compactación embrionaria o en estadio de blastocito.

En los últimos años la biopsia embrionaria en estadio de blastocisto está destacando respecto al resto, ya que la biopsia se realiza sobre el trofoectodermo, sin afectar a la masa celular interna, por lo que parece producir menos daño a la competencia embrionaria.

Además, al poderse biopsiar un mayor número de células (entre cinco y diez células, respecto a la única blastómera de la biopsia en estadios pre-compactación) disminuye el riesgo de mosaicismo cromosómico y, dado que aproximadamente el 50% de los embriones fecundados progresan hasta la base de blastocisto, solo se biopsian aquellos con mayor capacidad de desarrollo, lo que abarata la técnica para los pacientes (Chen *et al.*, 2020; Harper, 2018; Sermon, 2017; Stern, 2014).

1.3.6. Transferencia embrionaria

Uno de los pasos más críticos del tratamiento de FIV es la transferencia embrionaria. Esta transferencia suele realizarse cuando los embriones se encuentran en fase de división, en los días 2-3 tras la fecundación, o en la fase de blastocisto, en los días 5-6 tras la fecundación. Como hemos visto anteriormente, el aplazamiento de la transferencia embrionaria teóricamente presenta algunas ventajas biológicas (Martins *et al.*, 2017). En un embarazo natural, se cree que el embrión atraviesa la unión útero-tubárica al final del día 3 o al principio del día 4, por lo que transferir un embrión más tarde puede dar lugar a la exposición del embrión a un entorno uterino más análogo al de un ciclo natural (Brown *et al.*, 2016). En segundo lugar, la prolongación de la duración del cultivo durante 2-3 días más, teóricamente se producirá una autoselección de los embriones tras la activación del genoma embrionario el día 3. Esto, a su vez, permite la identificación de aquellos embriones capaces de formar blastocistos *in vitro* y, por tanto, teóricamente debería permitir la selección de aquellos embriones con mayor potencial de implantación (Machtinger and Racowsky, 2013; De Placido *et al.*, 2002; Racowsky *et al.*, 2003). De esta forma, la transferencia de blastocistos puede incrementar la tasa de recién nacido vivo por embrión transferido. Esto es especialmente relevante en el contexto de políticas de transferencia de un solo embrión (SET, del inglés *Single Embryo Transfer*), destinadas a reducir las gestaciones múltiples (Glujovsky *et al.*, 2022; Wang and Sun, 2014).

Además, aunque el primer tratamiento de FIV realizado con éxito se logró en una transferencia de embriones en fresco, con la implementación de la vitrificación como técnica de crio-preservación en el laboratorio de FIV, la supervivencia de los oocitos y de los embriones en fase de división y blastocisto (Rienzi *et al.*, 2017) ha mejorado significativamente, lo que ha facilitado el avance hacia un aumento de la criopreservación de embriones en todo el mundo (Rienzi *et al.*, 2017; Veleva *et al.*, 2009) y del incremento en el

número de transferencias de embriones congelados (FET del inglés *Frozen Embryo Transfer*), con resultados clínicos exitosos (Doody, 2014; Pereira and Rosenwaks, 2016), hasta representar aproximadamente el 30% de los tratamientos de FIV en todo el mundo (Lawrenz *et al.*, 2020).

Aunque la criopreservación electiva de embriones se desarrolló principalmente para las pacientes con un mayor riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica (Devroey *et al.*, 2011), su uso se ha extendido ahora también a los ciclos con DGP-A, elevación folicular tardía de la progesterona (Bosch *et al.*, 2010; Healy *et al.*, 2016; Roque *et al.*, 2015), asincronía embrio-endometrial (Shapiro *et al.*, 2008) y almacenamiento y posterior utilización de embriones supernumerarios que no fueron elegidos para una transferencia en fresco o en diferido.

Actualmente existe un debate sobre si los embriones congelados, transferidos en un endometrio no estimulado "más fisiológico", pueden no solo dar lugar a mayores tasas de embarazo (Roque *et al.*, 2013; Shapiro *et al.*, 2011), sino también disminuir potencialmente la morbilidad materna y neonatal (Evans *et al.*, 2014; Ishihara *et al.*, 2014). El razonamiento fisiológico detrás de esta estrategia se basa en que de esta forma se proporciona un mejor entorno de implantación para el embrión. En concreto, se cree que el entorno hormonal resultante de la estimulación ovárica durante la FIV en fresco genera asincronía endometrial, lo que daría lugar a una mala implantación del embrión y, posteriormente, podría afectar al desarrollo fetal.

Otros estudios también han sugerido que los efectos perjudiciales del aumento de los niveles de estradiol en la FIV pueden influir en la placentación y en el posterior crecimiento fetal (Ertzeid and Storeng, 2001; Pereira and Rosenwaks, 2016; Weirnerman and Mainigi, 2014). Por lo tanto, es evidente que el entorno hiperestrogénico generado durante la FIV en fresco puede perjudicar la implantación temprana, la placentación y el posterior crecimiento fetal y que las estrategias de transferencia de embriones congelados pueden ayudar a mejorar la sincronía entre el embrión y el endometrio.

Además, no todos los embriones transferidos terminan implantando correctamente en el endometrio para dar lugar a un recién nacido vivo. Como hemos visto anteriormente, el proceso de implantación embrionaria requiere que un embrión competente implante en un

endometrio receptivo. Numerosas mujeres son recalcitrantes a conseguir un embarazo, condición que bajo determinadas circunstancias se denomina aborto recurrente, que puede tener un origen tanto embrionario como endometrial o mixto (Bellver and Simón, 2018; Franasiak *et al.*, 2021). Dado que más de la mitad de las pérdidas de embarazo temprana son resultado de aneuploidías, se ha sugerido que el uso de FIV con DGP-A puede reducir los fallos de implantación y las pérdidas de embarazo temprana por causa embrionaria (Bhatt *et al.*, 2021; Pirtea *et al.*, 2021), y a nivel metodológico permitir evaluar de forma más fiable la función endometrial.

2. Compuestos ambientales y procedentes de la dieta

El incremento de las actividades antropogénicas derivadas de la industrialización ha conducido al incremento de la contaminación atmosférica, la contaminación acuática y la contaminación del suelo. Los mayores incrementos se han producido en países con ingresos bajos y medios, que se encuentran en un rápido desarrollo de la industrialización (Landrigan *et al.*, 2018). De hecho, desde 1950 han sido sintetizados más de 140 000 nuevos productos químicos y plaguicidas de los que, generalmente, su impacto sobre la salud es en gran medida desconocido (Landrigan *et al.*, 2018). Por este motivo, se ha sugerido que las exposiciones a compuestos ambientales pertenecen a los factores de riesgo de infertilidad modificables, junto a los factores relacionados con el estilo de vida (p. ej. la dieta poco saludable, el sedentarismo, el tabaquismo o el consumo de alcohol) (Hart, 2016; Sharma *et al.*, 2013).

Las exposiciones ambientales afectan al cuerpo humano durante toda su vida, desde la concepción hasta la vejez. Estas exposiciones influyen en la expresión de los genes, entrenan y modulan el sistema inmunitario, desencadenan múltiples respuestas fisiológicas y, en definitiva, determinan la aparición de enfermedades crónicas (Peters *et al.*, 2021).

Los órganos barrera, como el pulmón, la piel o el intestino, sufren el impacto directo de las exposiciones ambientales y han evolucionado a lo largo del tiempo para hacer frente a posibles agresiones. La función inmunitaria en estos órganos de barrera es, en muchos casos, la primera línea de defensa. El microbioma de los órganos de barrera se considera una parte integral de la función de barrera, pero también puede verse afectado por influencias exógenas.

Sin embargo, los impactos ambientales no se limitan a las respuestas inmediatas y locales. Las sustancias químicas y las nanopartículas pueden penetrar en el organismo y tener un impacto potencial en órganos sin función de barrera directa. La mayoría de estas respuestas están orientadas a mantener la homeostasis de las funciones celulares y orgánicas. La mayoría de las exposiciones ambientales son tóxicas a niveles bajos y altos. Sin embargo, algunas sustancias químicas ambientales (por ejemplo, los elementos traza esenciales) sólo son tóxicas en dosis altas (Peters *et al.*, 2021).

Además, las reacciones locales pueden inducir respuestas secundarias y sistémicas, activar el sistema inmunitario más allá del lugar inmediato de la agresión, activar las funciones metabólicas y alterar la señalización de órgano a órgano y el control del sistema nervioso autónomo. Múltiples estudios han sugerido que el sistema reproductivo es una de las dianas más importantes de los compuestos ambientales y procedentes de la dieta, ya que la reproducción es un proceso muy sensible a distintos estresores (Green *et al.*, 2021; Hart, 2016; Sharma *et al.*, 2013).

2.1. Mecanismos generales de lesión por exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta

Un comité de experto ha propuesto los siguientes procesos celulares y moleculares como rasgos como distintivamente afectados por la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta: (1) disrupción endocrina, (2) estrés oxidativo e inducción de inflamación, (3) disfunción mitocondrial, (4) alteraciones genómicas e inducción de mutaciones, (5) alteraciones epigenéticas, (6) alteraciones en la comunicación intercelular, (7) alteraciones del microbioma y (8) deterioro de la función del sistema nervioso (Peters *et al.*, 2021) (Figura 8).

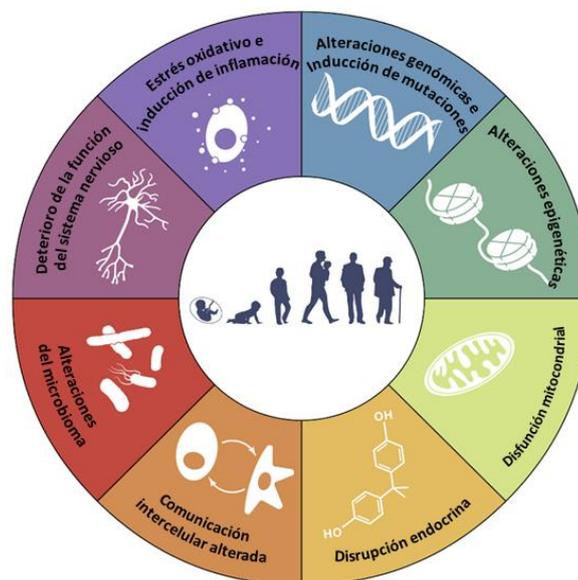


Figura 8. Rasgos comunes de las lesiones por contaminación ambiental. Resumen de los ocho procesos celulares y moleculares descritos como fundamentalmente afectados por la exposición a contaminantes ambientales. *Adaptado de Peters et al. 2021.*

En la actualidad, los rasgos más comúnmente relacionados con la afectación de la fertilidad son la disrupción endocrina y la inducción de estrés oxidativo.

2.2. Evidencias del impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados reproductivos de las pacientes de FIV

Existe un gran cuerpo científico que relaciona las exposiciones ambientales humanas a distintos contaminantes ambientales con los resultados clínicos de los parámetros de FIV en Norteamérica, Europa y Asia. A continuación, nos centraremos en aquellos estudios relacionados con la exposición femenina, con una descripción de sus principales hallazgos. Las características y los hallazgos específicos de las familias de compuestos evaluados en la presente tesis (fitoestrógenos, parabenos, ftalatos y elementos traza tanto esenciales como no esenciales) serán revisados con más detenimiento en sus secciones específicas.

De forma general han sido evaluados tanto contaminantes orgánicos persistentes (POPs, del inglés *Persistent Organic Pollutant*), como contaminantes orgánicos no persistentes y elementos traza, tanto esenciales como no esenciales, en diversas matrices biológicas como líquido folicular, sangre y derivados (plasma y suero), orina y pelo en el caso de los elementos traza, obtenidos en distintos momentos del tratamiento de reproducción asistida.

Entre los POPs se han estudiado las exposiciones a distintas familias de pesticidas, como los pesticidas organoclorados (OCPs, del inglés *Organochlorine Pesticides*), los pesticidas órgano fosfatados (OPs, del inglés *Organophosphates*) y piretroides, entre otros; los retardantes de llama, como los retardantes de llama órganofosforados (PFRs, del inglés *Phosphorus Flame Retardants*) y los éteres de polibromodifenilos (PBDEs, del inglés *Polybrominated Diphenyl Ethers*); los bifenilos policlorados (PCBs, del inglés *Polychlorinated Biphenyls*), los perfluoroalcóxidos (PFASs, del inglés *Perfluoroalkoxy Alkanes*), los ácidos perfluorooctanosulfónicos (PFOs, del inglés *Perfluorooctanesulfonic Acids*) y los perfluorocarburos (PFCs, del inglés *Perfluorinated Compounds*).

Como contaminantes no persistentes se han evaluado los efectos de la exposición a triclosan, bisfenol A (BPA, del inglés *Bisphenol A*), y otros plastificantes.

También se ha estudiado la relación entre estos xenobióticos y la presencia de patologías ginecológicas relacionadas con la subfertilidad, como el síndrome de ovario poliquístico, la endometriosis o los miomas uterinos (Rumph *et al.*, 2022).

2.2.1. Impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la reserva ovárica

El ovario es un órgano extremadamente sensible a los efectos de compuestos ambientales. Por ejemplo, en una revisión reciente se ha establecido que la exposición a este tipo de compuestos es una causa probable de insuficiencia ovárica prematura (Vabre *et al.*, 2017). Esta es una condición médica prevalente en aproximadamente el 1% de las mujeres, caracterizada por oligo/amenorrea durante al menos 4 meses y niveles elevados de FSH (> 25 UI/L en dos ocasiones con al menos 4 semanas de separación) (Webber *et al.*, 2016), en la que la capacidad de generar oocitos competentes se ve profundamente comprometida.

Como hemos visto anteriormente, la reserva ovárica es un factor limitante a la hora de realizar un tratamiento de reproducción asistida con gametos propios, ya que a medida que disminuye la reserva ovárica disminuye el número de oocitos recuperados y la calidad de los mismos (Fauser, 2010). Pese a que el principal causante del descenso de la reserva ovárica es la edad, también se ha especulado que otros factores médicos y de estilo de vida como patologías (p. ej. endometriosis o infecciones pélvicas), tratamientos médicos (p. ej. cirugía, radioterapia, quimioterapia), el estrés, la obesidad, una nutrición inadecuada o la exposición a contaminantes ambientales pueden contribuir a su disminución (Hart, 2016).

En este sentido, recientemente el grupo de Björvang *et al.* ha sugerido que la exposición a distintos POPs puede reducir el tamaño de la reserva ovárica en mujeres pertenecientes a la población general (Björvang *et al.*, 2021). Centrándonos en trabajos realizados sobre la población sometida a tratamientos de FIV, como hemos visto anteriormente, los parámetros más comúnmente empleados en la práctica clínica para su evaluación son el AFC y la medición de la concentración de AMH (Fauser, 2010).

Diversos autores han relacionado la exposición a pesticidas piretroides (Jurewicz, Radwan, Wielgomas, Radwan, *et al.*, 2020), triclosan (Jurewicz *et al.*, 2019), y BPA (Czubacka *et al.*, 2021; Souter *et al.*, 2013) con menor AFC. Por lo que respecta al impacto de los PCBs, no existe consenso sobre su impacto sobre los AFC (Björvang *et al.*, 2022; Bloom *et al.*, 2017). Por el contrario, Björvang *et al.* han observado una asociación positiva entre la exposición a PFOs y PFASs y el AFC (Tabla S1).

Por lo que respecta a la concentración de AMH, se han observado disminuciones de este parámetro en asociados con una mayor exposición a BPA (Czubacka *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2021). También se ha observado disminución de la concentración de AMH en mujeres más expuestas a pesticidas piretroides (Jurewicz, Radwan, Wielgomas, Radwan, *et al.*, 2020) y hexaclorobenceno, pero no otros OCPs (Björvang *et al.*, 2022). No se observaron asociaciones entre la exposición a PCBs, PBDEs, PFASs (Björvang *et al.*, 2022), triclosan (Jurewicz *et al.*, 2019) y las concentraciones de AMH (Tabla S1).

Estos datos sugieren el impacto de distintos contaminantes ambientales sobre el potencial del ovario de generar oocitos en la cantidad y calidad óptima para permitir la realización de técnicas de fecundación *in vitro* con oocitos propios, aunque las discrepancias entre los dos parámetros evaluados subrayan la necesidad de evaluar los mecanismos subyacentes tras estas disparidades.

2.2.2. Impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la respuesta a la estimulación ovárica

Como hemos visto anteriormente, la estimulación ovárica controlada es un paso vital para el éxito de los tratamientos de FIV, ya que han permitido incrementar el número de oocitos recuperados y finalmente incrementar sustancialmente las tasas de embarazo (Bosch *et al.*, 2020; Howie and Kay, 2018). Sin embargo, los dos principales retos con la COS en FIV son los extremos en la respuesta ovárica, una respuesta pobre o excesiva, con sus propias razones para poder comprometer las tasas de éxito (Fauser, 2010).

La respuesta ovárica puede definirse como la reacción endocrina y folicular de los ovarios ante un estímulo. Como marcadores de la respuesta ovárica a la estimulación hormonal en los ciclos de FIV puede evaluarse tanto la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante de la maduración oocitaria (Malathi *et al.*, 2021), como el número total de oocitos recuperados y el número de oocitos maduros recuperados (oocitos en metafase II u oocitos MII), que son los que finalmente podrán ser fecundados (Fauser, 2010).

Respecto a la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante, se ha observado una asociación positiva con la exposición a DDT, un pesticida organoclorado (Bloom *et al.*, 2017). Por el contrario, se ha observado una asociación negativa entre la exposición a PCBs (Bloom *et al.*, 2017) y el plastificante DINCH (Mínguez-Alarcón, Souter, *et*

al., 2016) con este parámetro. En el caso del BPA se ha descrito una asociación negativa con la concentración de estradiol (Bloom *et al.*, 2011; Ehrlich, Williams, Missmer, Flaws, Ye, *et al.*, 2012; Mok-Lin *et al.*, 2010), sin embargo, en trabajos más recientes no se observa esta asociación (Kim *et al.*, 2021; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2020). Atendiendo a las concentraciones informadas en los artículos, podemos especular que la disminución de la concentración media de BPA en las poblaciones en las que no se observa el efecto puede ser la responsable de estas disparidades. Por último, no se han observado asociaciones entre la exposición a OPs (Carignan *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020) y a mercurio (Wright *et al.*, 2015) con la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante (Tabla S2).

En lo relativo al número de oocitos recuperados en la punción ovárica, se observó una disminución en mujeres expuestas a pesticidas piretroides, cloroacetanitrilos y OPs (diazinon) (Al-Hussaini *et al.*, 2018), pero no OCPs u otros OPs (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Björvang *et al.*, 2022; Bloom *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020; Jirsová *et al.*, 2010; Lefebvre *et al.*, 2022). Por lo que respecta a los PCBs, en tres estudios se observa que mayores niveles de algunos PCBs (no los mismos congéneres entre estudios) se asocian con menor número de oocitos recuperados (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Bloom *et al.*, 2017; Jirsová *et al.*, 2010). Sin embargo, Björvang *et al.* han observado una asociación positiva entre los niveles de PCBs y el índice de sensibilidad ovárica, medido como el número de oocitos recuperados por cada unidad de FSH administrada (Björvang *et al.*, 2022). Lefebvre *et al.* no ha observado ninguna asociación entre las concentraciones de PCBs en suero y el número de oocitos recuperados (Lefebvre *et al.*, 2022). En el caso de los PFASs, solo Ma *et al.* ha observado asociación negativa con el número de oocitos recuperados (Ma *et al.*, 2021), no observándose ninguna asociación en los otros dos trabajos en los que son evaluados (Björvang *et al.*, 2022; Lefebvre *et al.*, 2022). Por lo que respecta a los compuestos no persistentes, se ha observado una asociación negativa entre la exposición a plastificantes DINCH y el número de oocitos recuperados (Mínguez-Alarcón, Souter, *et al.*, 2016). Por el contrario, existen discrepancias en las observaciones de BPA con respecto al número de oocitos recuperados ya que, de los trabajos en los que se evalúa esta relación en tres se observa una asociación negativa (Ehrlich, Williams, Missmer, Flaws, Ye, *et al.*, 2012; Mok-Lin *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2020) y en los restantes se informa de una ausencia de asociación (Bloom *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2021; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Poormoosavi *et al.*, 2019; Radwan *et al.*, 2020). Recientemente, Mínguez-Alarcón *et al.* realizaron un análisis

multivariable explorando como mezcla las concentraciones de BPA, ftalatos y parabenos en su población de estudio, tras lo que observaron una ausencia de relación entre estos compuestos y el número de oocitos totales recuperados (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S2).

Finalmente, solamente los oocitos que han logrado madurar hasta la segunda meiosis son aptos para ser fecundados. Por lo tanto, este es el factor más relevante a la hora de evaluar el potencial éxito de la COS en los tratamientos de FIV. Comenzando por los POPs, en un artículo se han relacionado mayores concentraciones del pesticida DDE con menor número de oocitos maduros recuperados (Bloom *et al.*, 2017), pero generalmente no con OCPs (Lefebvre *et al.*, 2022). Sí que se ha informado de una asociación negativa entre las concentraciones de piretroides y el número de oocitos maduros recuperados (Radwan *et al.*, 2022). En lo relativo a los PFASs, solo Ma *et al.* ha observado una disminución en los oocitos maduros recuperados con mayor concentración de estos compuestos (Ma *et al.*, 2021), no observándose esta asociación en los otros dos trabajos en los que se ha evaluado (Hong *et al.*, 2022; Lefebvre *et al.*, 2022). No se ha observado asociación entre las concentraciones de PCBs (Lefebvre *et al.*, 2022) y PFCs (Governini *et al.*, 2011) con la cantidad de oocitos maduros recuperados. En lo relativo a los compuestos no persistentes, también existen resultados dispares para la exposición BPA, ya que entre todos los trabajos en los que ha sido evaluado se han observado asociaciones en cuatro (Bloom *et al.*, 2011; Ehrlich, Williams, Missmer, Flaws, Ye, *et al.*, 2012; Fujimoto *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2021; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Poormoosavi *et al.*, 2019; Radwan *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020), con independencia de la matriz biológica analizada. No se ha observado ninguna asociación entre la exposición a triclosan (Radwan *et al.*, 2021), y plastificantes tipo DINCH (Mínguez-Alarcón, Souter, *et al.*, 2016) y el número de oocitos maduros recuperados. En el análisis que exploraba la mezcla de BPA, ftalatos y parabenos, también se observó una ausencia de relación ente estos compuestos y la cantidad de oocitos maduros recuperados (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S2).

A la luz de esta información, queda patente el potencial impacto de las exposiciones ambientales sobre el éxito de los ciclos de estimulación ovárica. Sin embargo, la existencia de resultados inconsistentes entre estudios hace necesario ahondar en posibles efectos de mezcla e identificar sustancias que se asocien con un mayor rendimiento y la obtención de oocitos de calidad para maximizar las oportunidades de cada ciclo de FIV.

2.2.3. Impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la fecundación y el desarrollo embrionario pre-implantacional

La generación de embriones competentes es uno de los pasos clave para el éxito de los tratamientos de FIV. Para ello, en primer lugar, es necesario que la unión de ambos gametos de lugar a un embrión que sea capaz de desarrollarse *in vitro*, tenga buena calidad y sea competente a la hora de implantar en el endometrio una vez sea transferido y finalmente dar lugar a un recién nacido vivo.

Comenzando con la influencia de algunos contaminantes ambientales sobre la fecundación embrionaria, dentro de los POPs se han observado asociaciones negativas entre la exposición a PFRs (Carignan *et al.*, 2017) y PFCs (Governini *et al.*, 2011) con el número de embriones fecundados. Por lo que respecta a los PCBs, los hallazgos son controvertidos, ya que se han descrito tanto asociaciones negativas (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Bloom *et al.*, 2017) como ausencia de asociación (Jirsová *et al.*, 2010; Lefebvre *et al.*, 2022; Younglai *et al.*, 2002) entre la exposición a estos compuestos y el número de embriones fecundados. De forma similar, en el caso de los PFASs, para los que generalmente se ha informado de ausencia de asociación con el número de embriones fecundados (Hong *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2020; Lefebvre *et al.*, 2022), aunque en una investigación se observó una asociación negativa (Ma *et al.*, 2021). Generalmente no se han observado asociaciones entre la exposición a distintos pesticidas y este parámetro (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Al-Saleh *et al.*, 2009; Bloom *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020; Jirsová *et al.*, 2010; Lefebvre *et al.*, 2022; Radwan *et al.*, 2022; Younglai *et al.*, 2002). En algunos trabajos se han sugerido asociaciones negativas de algunos pesticidas como el pesticida organoclorado DDE (Younglai *et al.*, 2002), el piretroide b-cyfluthrin (Al-Hussaini *et al.*, 2018) o el Pretilachlor (Al-Hussaini *et al.*, 2018), pero estos hallazgos son limitados. Al evaluar distintos PCBs, PBDEs y OPs como mezcla, Petro *et al.* observaron un descenso en el número de embriones fecundados en las mujeres más expuestas (Petro *et al.*, 2012). Sin embargo, este efecto de mezcla no ha sido observado por Lefebvre *et al.* al evaluar distintos PCBs, OCPs y PFASs (Lefebvre *et al.*, 2022) (Tabla S3).

Respecto a los compuestos no persistentes, la mayor parte de los trabajos en los que se investigó el BPA, solo en los primeros trabajos se observó una asociación negativa entre las concentraciones de BPA y el número de embriones fecundados (Ehrlich, Williams, Missmer,

Flaws, Ye, *et al.*, 2012; Fujimoto *et al.*, 2011), no observándose ninguna asociación entre ambas variables en los trabajos más recientes (Kim *et al.*, 2021; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Radwan *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020). No se ha observado ninguna asociación entre las concentraciones de triclosan (Hua *et al.*, 2017; Radwan *et al.*, 2021) y el número de embriones fecundados. Al evaluar el efecto de la mezcla de ftalatos, BPA y parabenos, tampoco se observó una asociación con el número de embriones fecundados (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S3).

En los estudios que evalúan las primeras divisiones del desarrollo embrionario pre-implantacional, se ha observado que pesticidas como el piretroide b-cyfluthrin (Al-Hussaini *et al.*, 2018) o el pretilachlor (Al-Hussaini *et al.*, 2018) afectan negativamente el desarrollo embrionario. En las mujeres más expuestas a PFC se observa una disminución en el número de embriones transferidos (Governini *et al.*, 2011). Respecto a la calidad de los embriones, en gran parte de los estudios que la evalúan generalmente se han observado asociaciones negativas para PCBs y PFASs (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Björvang *et al.*, 2022; Bloom *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2021; Petro *et al.*, 2012) con parámetros de calidad embrionaria, aunque no en todos los casos (Hong *et al.*, 2022; Jirsová *et al.*, 2010). Esta relación no ha sido descrita para distintos tipos de pesticidas (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Björvang *et al.*, 2022; Bloom *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020; Jirsová *et al.*, 2010; Radwan *et al.*, 2022). En lo relativo a compuestos no persistentes, de forma general no se han observado asociaciones para la exposición a triclosan (Radwan *et al.*, 2021), o BPA (Kim *et al.*, 2021; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Radwan *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020) con parámetros de calidad embrionaria, aunque en algunos trabajos sí que se han descrito asociaciones negativas entre la exposición a triclosan (Hua *et al.*, 2017), o BPA (Ehrlich, Williams, Missmer, Flaws, Ye, *et al.*, 2012) y la presencia de embriones de buena calidad (Tabla S3).

Pocos estudios han evaluado la llegada a blastocisto, probablemente porque la transferencia se hiciera en estado de células. De forma general, no se ha descrito ninguna asociación para POPs como OCPs, PCBs y PFASs con la tasa de llegada a blastocisto (Lefebvre *et al.*, 2022). En lo relativo a compuestos no persistentes, para el BPA se han descrito tanto asociaciones negativas como ausencia de asociaciones con el número de blastocistos obtenidos (Ehrlich, Williams, Missmer, Flaws, Ye, *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2020) (Tabla S3).

Hasta nuestro conocimiento, en ninguna investigación se ha evaluado el impacto de la exposición ambiental a contaminantes ambientales sobre la ploidía de los embriones generados en tratamientos de FIV. Dado que en modelos animales se ha descrito que distintos contaminantes ambientales pueden afectar negativamente la carga cromosómica de gametos y embriones y que, excepto para algunas aneuploidías, las alteraciones cromosómicas son incompatibles con el desarrollo embrionario, nos parece esencial la evaluación de este parámetro a la hora de evaluar el rendimiento de los ciclos de FIV.

2.2.4. Impacto de la exposición a contaminantes ambientales sobre los resultados clínicos de FIV

El verdadero éxito de un tratamiento de FIV no es solamente conseguir que el embrión implante o un embarazo clínico, sino que el resultado realmente relevante es lograr el nacimiento de un bebé sano en casa.

A la hora de interpretar los resultados clínicos del tratamiento de FIV, hay que tener en cuenta que existen factores biológicos derivados de los tratamientos de reproducción asistida que pueden estar interfiriendo la evaluación del impacto de compuestos ambientales sobre la implantación embrionaria y el desarrollo del embarazo. Entre ellos, destacamos la transferencia en fresco respecto a la transferencia en diferido, ya que se ha descrito que los protocolos de estimulación ovárica controlada pueden estar interfiriendo con una correcta adquisición de la receptividad endometrial. Por ejemplo, se ha observado que la administración exógena de fitoestrógenos podría contrarrestar los efectos hiper-estrogénicos del citrato de clomifeno en el endometrio (Shahin *et al.*, 2009; Unfer *et al.*, 2004). Además, al no evaluar la ploidía de los embriones pueden estar dándose casos de transferencias de embriones aneuploides que, en el caso de lograr implantar, excepto para algunas aneuploidías, conducirían a abortos, generalmente tempranos. Por último, la transferencia de un número variable de embriones y en distintos estadios de desarrollo, puede estar alterando artificialmente las probabilidades de embarazo y dificultando la comparación entre estudios.

En algunos trabajos se ha evaluado el desarrollo endometrial atendiendo al grosor endometrial y se han observado disminuciones de este parámetro generalmente ante la exposición a PCBs (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Bloom *et al.*, 2017) y distintos tipos de pesticidas (Al-Hussaini *et al.*, 2018), aunque no en todos los trabajos (Bloom *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020).

Por el contrario, el grosor endometrial no parece verse afectado por la exposición a retardantes de llama fosfatados (Carignan *et al.*, 2017), plastificantes (Mínguez-Alarcón, Souter, *et al.*, 2016), BPA (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2020) o la mezcla de parabenos, ftalatos y BPA (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S4).

Centrándonos en aquellos trabajos en los que se ha estudiado el impacto de distintos componentes ambientales sobre la implantación tras tratamientos de FIV, en algunos trabajos se ha descrito una menor probabilidad de implantación en aquellas mujeres con mayores concentraciones de algunos OCPs y OPs (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2020; Mahalingaiah *et al.*, 2012). Sin embargo, en otros trabajos no se ha informado de estas asociaciones para estos tipos de pesticidas u otros como los piretroides (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Bloom *et al.*, 2017; Lefebvre *et al.*, 2022; Mahalingaiah *et al.*, 2012; Radwan *et al.*, 2022), ni existe un consenso entre trabajos con el tipo de pesticida que está afectando más a la implantación. Posiblemente diferencias en el empleo y la regulación de estos compuestos pueden estar detrás de estas discrepancias. En el caso de los retardantes de llama, se ha descrito que la exposición tanto a PRFs como PBDEs se asocia con menores probabilidades de implantación (Carignan *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2012), excepto el reciente trabajo de Ingle *et al.*, que informa de un incremento en la probabilidad de implantación en mujeres más expuestas a distintos PBDEs (Ingle *et al.*, 2020). Los autores observaron estas asociaciones solo en mujeres caucásicas, informándose de efectos negativos en mujeres de otras etnias expuestas a estos compuestos (Ingle *et al.*, 2020), por lo que pueden existir otras variables de confusión subyacentes a estas disparidades raciales. También se ha descrito una disminución en las probabilidades de implantación para aquellas mujeres más expuestas a distintos PCBs (Al-Hussaini *et al.*, 2018; Bloom *et al.*, 2017; Meeker *et al.*, 2011), aunque en un trabajo reciente Lefebvre *et al.* no observaron asociaciones entre PCBs y esta variable (Lefebvre *et al.*, 2022). No se han observado asociaciones entre la exposición a PFASs y la probabilidad de implantación (Lefebvre *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2021). Respecto a los compuestos no persistentes, la exposición materna a triclosan se asoció con una menor probabilidad de implantación (Hua *et al.*, 2017; Radwan *et al.*, 2021). En este mismo sentido, la exposición materna a BPA también se asoció con una menor probabilidad de implantación en la mayoría de los estudios en los que fue evaluada (Ehrlich, Williams, Missmer, Flaws, Berry, *et al.*, 2012; Radwan *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020). Al ser evaluados como mezcla, la exposición a BPA,

ftalatos y parabenos, Mínguez-Alarcón *et al.* observaron que el factor de exposición al ftalato DEHP disminuía la probabilidad de implantación (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S4).

Por lo que respecta a la evaluación de la probabilidad de alcanzar un embarazo clínico, de forma general no se ha observado un impacto negativo por exposición a pesticidas (Al-Saleh *et al.*, 2009; Björvang *et al.*, 2022; Jirsová *et al.*, 2010; Lefebvre *et al.*, 2022; Mahalingaiah *et al.*, 2012), excepto para el organofosfato DAP (Hu *et al.*, 2020) y recientemente para el OCP hexaclorobenceno (Björvang *et al.*, 2022). En el caso de los retardantes de llama, se observó una disminución del 41% en la probabilidad de embarazo clínico en mujeres más expuestas a PRFs. En el caso de la exposición a los retardantes de llama PBDEs, como en el caso de la implantación embrionaria, se ha observado un incremento en la probabilidad de embarazo clínico en mujeres caucásicas más expuestas a distintos PBDEs, informándose de efectos negativos en mujeres de otras etnias expuestas a estos compuestos (Ingle *et al.*, 2020), mientras que en otro estudio no se observó ningún tipo de asociación (Björvang *et al.*, 2022). No se han descrito asociaciones entre la exposición femenina a PCBs (Björvang *et al.*, 2022; Jirsová *et al.*, 2010; Lefebvre *et al.*, 2022; Meeker *et al.*, 2011), PFASs (Björvang *et al.*, 2022; Hong *et al.*, 2022; Lefebvre *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2021), PFCs (Governini *et al.*, 2011), parabenos (Mínguez-Alarcón, Chiu, *et al.*, 2016) o triclosan (Radwan *et al.*, 2021) con la probabilidad de tener un embarazo clínico. Tampoco se observaron asociaciones entre las concentraciones de BPA en diversos biofluidos femeninos y la probabilidad de embarazo clínico (Kim *et al.*, 2021; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015; Radwan *et al.*, 2020), excepto en un estudio en el que se asoció con una disminución de esta probabilidad (Shen *et al.*, 2020). Al evaluarse como mezcla la exposición a ftalatos, BPA y parabenos, como en el caso de la implantación embrionaria, también se asoció el factor de exposición a metabolitos del ftalato DEHP con menor probabilidad de embarazo clínico (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S4).

También se han evaluado las posibles asociaciones entre la presencia de estos compuestos en distintas matrices biológicas femenina y la probabilidad de que el embarazo llegue a término con un recién nacido vivo. Entre los POPs, se ha observado una disminución de la probabilidad de tener un recién nacido vivo en las mujeres más expuestas a distintos OCPs, como DDE (Bloom *et al.*, 2017) y hexaclorobenceno (Björvang *et al.*, 2022); y OPs, como el DAP (Hu *et al.*, 2020). Sin embargo, no se han observado asociaciones con otros pesticidas (Björvang *et al.*, 2022; Lefebvre *et al.*, 2022). También se han observado asociaciones

negativas entre la exposición a retardantes de llama organofosfatados y la probabilidad de recién nacido (Carignan *et al.*, 2017). En el caso de los retardantes de llama PBDEs, también se ha observado un incremento de la probabilidad de recién nacido vivo, restringido como en los casos anteriores a las mujeres de etnia caucásica, con un descenso de esta probabilidad en las mujeres con otras etnicidades (Ingle *et al.*, 2020), y la ausencia de asociación entre ambas variables (Björvang *et al.*, 2022). No se han descrito asociaciones entre la presencia de PFASs y PCBs en matrices biológicas femeninas y la probabilidad de embarazo clínico (Björvang *et al.*, 2022; Hong *et al.*, 2022; Lefebvre *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2021), excepto el descenso en esta probabilidad descrito por Bloom *et al.* para los PCBs estrogénicos (Bloom *et al.*, 2017). Al centrarnos en los compuestos no persistentes, se ha sugerido que la presencia en matrices biológicas femeninas de distintos metabolitos BPA se asocian con menor probabilidad de recién nacido vivo (Shen *et al.*, 2020), aunque en otro trabajo no se observa esta asociación (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2015). Al evaluarse como mezcla la exposición a parabenos, ftalatos y BPA, se observó que el factor de los metabolitos de DEHP se asocia con un descenso en la probabilidad de recién nacido vivo (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S4).

Por último, también ha sido descrita una asociación entre la exposición al OCP hexaclorobenceno (Mahalingaiah *et al.*, 2012) con un incremento del riesgo de aborto espontáneo.

Por tanto, la exposición a distintos compuestos ambientales también parece afectar la comunicación embrión-endometrio y la capacidad de iniciar y mantener el embarazo a término, aunque en menor medida que la calidad de los gametos y el potencial de desarrollo pre-implantacional de los embriones. Sin embargo, entre otros factores, las diferentes metodologías de transferencia embrionaria y las posibles aneuploidías del embrión transferido pueden estar enmascarando estos impactos. Por tanto, es necesario continuar evaluando estas relaciones acotando el diseño a un modelo que permita evaluar el efecto de estos factores sobre el potencial receptivo del endometrio, eliminando otros factores conocidos que puedan interferir con el procedimiento. Por este motivo, en la presente tesis solo se han seleccionado mujeres a las que se les transfiera un único embrión euploide en diferido, para asegurar al máximo la evaluación del potencial del factor endometrial.

Además, generalmente estas tasas se calculan teniendo en cuenta las mujeres que tienen al menos una transferencia embrionaria. Sin embargo, Messerlian y Gaskins argumentan que la exclusión de los ciclos en los que no se ha llegado a una transferencia embrionaria, que representan entre el 10 y 20% de los mismos, puede conducir a un sesgo si la exposición de interés se asocia con un fracaso temprano de las técnicas de reproducción asistida (por ejemplo, no obtener oocitos maduros, fallos de fecundación o ausencia de embriones euploides) (Messerlian and Gaskins, 2017). Por este motivo, también es esencial incorporar en estos estudios variables clínicas en las que se tenga en cuenta el total de participantes que iniciaron un tratamiento de FIV.

2.3. Familias de compuestos ambientales y procedentes de la dieta evaluados en esta tesis en relación con los resultados del tratamiento de FIV

Como hemos observado anteriormente, hasta el momento han sido evaluados un gran número de compuestos ambientales y procedentes de la dieta en relación con los resultados del tratamiento de FIV, con resultados en muchos casos inconsistentes entre estudios. En la presente tesis doctoral hemos evaluado tres tipos de compuestos orgánicos (fitoestrógenos, parabenos y ftalatos) y un amplio panel de elementos traza, tanto esenciales como no esenciales, cuyas concentraciones en matrices biológicas femeninas generalmente han sido poco estudiadas en relación con los resultados del tratamiento de FIV. Somos conscientes que el número y tipo de compuestos que hemos seleccionado para su evaluación suponen una pequeña parte del total de compuestos a los que la humanidad se encuentra potencialmente expuesta y que pueden interferir con los resultados de reproducción asistida, pero suponen una punta de lanza para continuar aportando información sobre esta problemática mundial.

2.3.1. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos pertenecen a la familia de los polifenoles no esteroideos de los metabolitos vegetales secundarios y son componentes regulares de las dietas humanas (Kim, 2022). Estas sustancias reciben su nombre por su similitud estructural con los estrógenos endógenos, ya que presentan un anillo fenólico con un único radical hidroxilo unido a una base de carbono. Esta similitud estructural permite a los fitoestrógenos ser agonistas periféricos parciales de los receptores de estradiol, y tienen una afinidad variable por cada tipo de receptor (Carbonel *et al.*, 2018; Křížová *et al.*, 2019; Rizzo *et al.*, 2022). Dado que en

cada órgano pueden encontrarse diferentes tipos de receptores de estrógeno, los fitoestrógenos pueden provocar efectos antiestrogénicos y/o estrogénicos, generalmente débiles, en función de su concentración, de la presencia de esteroides sexuales endógenos u otros agonistas y del órgano diana (Carbonel *et al.*, 2018; Křížová *et al.*, 2019; Rizzo *et al.*, 2022). Además de su papel en la señalización endocrina, los fitoestrógenos también están implicados en los efectos antioxidantes, la regulación del ciclo celular, la inhibición de la señalización de la tirosina quinasa y los efectos antiangiogénicos (Rizzo *et al.*, 2022).

Hasta ahora se han descrito hasta veinte tipos diferentes de fitoestrógenos, entre los que se encuentran las isoflavonas (las más abundantes), los lignanos, los cumestanos y los prenilflavonoides (Kim, 2022; Křížová *et al.*, 2019). Los fitoestrógenos se consumen principalmente a través de las legumbres y, en menor medida, de las verduras, las frutas y los cereales. En concreto, las isoflavonas se encuentran principalmente en la soja y sus subproductos, las lentejas, la cebada, las semillas de girasol, la coliflor y el brócoli (Křížová *et al.*, 2019). Las isoflavonas más abundantes, tanto en las fuentes dietéticas como en el plasma y la orina humanos, son la genisteína y la daidzeína (Křížová *et al.*, 2019), lo que las convierte en potenciales biomarcadores de exposición a fitoestrógenos.

El impacto y la seguridad de los fitoestrógenos sobre la salud reproductiva femenina y los resultados de la FIV es controvertido. Algunos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de fitoestrógenos proporciona beneficios para la salud al proteger contra ciertos cánceres hormono-dependientes (fundamentalmente el cáncer de mama y de próstata), miomas, síntomas de la menopausia, enfermedades cardiovasculares, inflamación, síndromes metabólicos y obesidad (Kim, 2022; Křížová *et al.*, 2019). En cambio, en los estudios *in vitro* e *in vivo* han sido demostradas las propiedades como disruptores endocrinos de los fitoestrógenos en los tejidos reproductivos masculinos y femeninos. Por ejemplo, las dietas ricas en fitoestrógenos (p. ej., a base de trébol rojo o soja) redujeron la fertilidad en ovejas (Pool *et al.*, 2022) y guepardos en cautividad (Setchell *et al.*, 1987), y aumentaron las alteraciones meióticas en ratones (Muhlhauser *et al.*, 2009). Además, la exposición de modelos animales a fitoestrógenos generó una alteración del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Awoniyi *et al.*, 1998; Md Zin *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2005), que consecuentemente afectó el desarrollo del sistema reproductor femenino (Md Zin *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2005). Además, se han observado efectos anti-implantacionales tras la exposición a fitoestrógenos

en modelos animales e *in vitro* (Salsano *et al.*, 2019; Toktay *et al.*, 2020). Por último, en unos pocos ensayos clínicos se ha asociado la suplementación con fitoestrógenos con una mejora de los resultados reproductivos, entre los que se incluyen mayores tasas de ovulación en mujeres con amenorrea secundaria (Kohama *et al.*, 2005), o mayores tasas de implantación y embarazo en mujeres sometidas a distintos tratamientos de fertilidad (Shahin *et al.*, 2009; Unfer *et al.*, 2004). Sin embargo, en estos casos, las dosis supra fisiológicas administradas superaban las dosis alcanzables a través de la dieta.

En otros estudios en los que se evaluó la exposición dietética a los fitoestrógenos no se observaron asociaciones significativas entre las concentraciones urinarias de isoflavonas y la fertilidad entre tres cohortes de parejas sin antecedentes de infertilidad (Mumford *et al.*, 2014; Wesselink *et al.*, 2020), pero estos resultados pueden estar sesgados debido a las diferencias en el potencial de fertilidad entre las parejas participantes. En cambio, Vanegas *et al.* han descrito que el consumo dietético de soja se asocia positivamente con la fecundación embrionaria, el embarazo clínico y los nacimientos vivos en pacientes infértiles sometidas a tratamientos de FIV (Vanegas *et al.*, 2015). Sin embargo, en este estudio, el consumo de soja se evaluó cualitativamente mediante un cuestionario de exposición, en lugar de detectar cuantitativamente los fitoestrógenos en los biofluidos de las participantes, lo que permite identificar posibles fuentes ocultas de consumo de fitoestrógenos a través de la dieta. Por último, se ha descrito que los fitoestrógenos pueden proteger la función reproductora femenina. Un estudio observacional en humanos y experimentos preclínicos en roedores han demostrado que las dietas ricas en soja son capaces de contrarrestar los efectos de compuestos que alteran el sistema endocrino, como el BPA (Chavarro *et al.*, 2016; Muhlhauser *et al.*, 2009). Además, se ha informado de que los fitoestrógenos protegen contra la infertilidad iatrogénica causada por la irradiación pélvica (Haddad *et al.*, 2020).

2.3.2. Parabenos

Los parabenos son un grupo de compuestos fenólicos estructuralmente similares a los bisfenoles, que comprenden muchas subclases entre las que se incluyen el metil-parabeno (M-parabeno), propil-parabeno (P-parabeno) y butil-parabeno (B-parabeno) (Mínguez-Alarcón, Chiu, *et al.*, 2016; Nowak *et al.*, 2018).

Estos compuestos a menudo se emplean como conservantes y agentes antimicrobianos, por lo que comúnmente se encuentran en alimentos, fármacos, cosméticos y productos de cuidado personal (Guo and Kannan, 2013; Lim, 2020). La exposición humana a parabenos puede ocurrir por ingestión, inhalación o absorción dérmica. Su presencia se ha detectado en más del 90% de las muestras de orina (Calafat *et al.*, 2010) y se ha registrado que es más de 5 veces mayor en mujeres que en hombres (Smith *et al.*, 2012). Tras su absorción los parabenos no se acumulan en el organismo, sino que son metabolizados por las esterasas, conjugados y excretados a través de la orina, la bilis y las heces (Nowak *et al.*, 2018).

Se sospecha que los parabenos poseen una débil actividad estrogénica, que aumenta según se incrementa la longitud y derivación de la cadena alquílica (Nowak *et al.*, 2018). A pesar de su uso generalizado, existen sorprendentemente pocos estudios epidemiológicos o en animales que evalúen las concentraciones de parabenos y sus efectos sobre la fertilidad y la fecundidad, tanto masculina como femenina.

Se ha sugerido que los parabenos pueden tener un efecto deletéreo sobre la reserva ovárica. Hasta la fecha, en dos trabajos se ha relacionado la exposición a P-parabeno con menor AFC (Jurewicz, Radwan, Wielgomas, Karwacka, *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2013), aunque no se observaron asociaciones entre la exposición a parabenos con la concentración de AMH (Jurewicz, Radwan, Wielgomas, Karwacka, *et al.*, 2020) (Tabla S1). Por lo que respecta a los resultados del tratamiento de FIV, Mínguez-Alarcón *et al.* no identificaron ninguna asociación entre las concentraciones de parabenos en la orina y el recuento de oocitos maduros, el número de embriones de alta calidad, las tasas de fertilización, la implantación o las tasas de embarazo (Mínguez-Alarcón, Chiu, *et al.*, 2016) (Tablas S2 y S3). Tampoco se observaron asociaciones entre las concentraciones urinarias de parabenos y los resultados del tratamiento de FIV al ser evaluados como mezcla junto con las concentraciones de BPA y de distintos metabolitos de ftalato (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2019) (Tabla S4).

2.3.3. Ftalatos

Los ftalatos son una familia de sustancias químicas sintéticas entre las que se encuentran los diésteres di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), dibutilftalato (DBP) y dietilftalato (DEP). Estos compuestos son añadidos a los plásticos para aumentar su flexibilidad y durabilidad o para proporcionar una matriz a los cosméticos (Wittassek *et al.*, 2011). Entre los productos que contienen ftalatos se encuentran compuestos de uso diario, desde azulejos de vinilo hasta adhesivos, detergentes, lubricantes, dispositivos médicos, productos farmacéuticos (como el recubrimiento de ciertos medicamentos orales), ropa, envases de alimentos, juguetes, perfumes y productos de cuidado personal (Guo and Kannan, 2013; Lim, 2020). Los ftalatos se encuentran unidos de forma no covalente al plástico, lo que permite su liberación al ambiente. Este hecho, junto con lo extensivo de su uso, convierte a los ftalatos en contaminantes ubicuos (Wittassek *et al.*, 2011). En diversos estudios se han detectado ftalatos en la sangre y en la orina en más del 95% de las personas examinadas, además de ser detectables en matrices biológicas relacionadas con la reproducción (Silva *et al.*, 2004; Wittassek *et al.*, 2007).

Las principales fuentes de exposición humana son los alimentos y los productos de consumo, como los cosméticos. Una vez ingeridos, inhalados o absorbidos, los ftalatos tienen una vida media baja en el organismo. Son rápidamente hidrolizados en sus mono-ésteres bioactivos, algunos de los cuales puede subsiguientemente ser metabolizados por oxidación o conjugación de fase II. Los metabolitos son excretados como glucorónidos, principalmente a través de la orina y las heces (Wittassek *et al.*, 2011). Es interesante que las mujeres jóvenes se encuentran más expuestas que los hombres de la misma edad, posiblemente por su mayor uso de cosméticos (Wittassek *et al.*, 2011), lo que destaca la necesidad de identificar posibles efectos adversos de estos compuestos sobre la salud reproductiva femenina.

Se ha descrito que los ftalatos tienen efectos tanto antiandrogénicos como estrogénicos, que son ejercidos fundamentalmente por sus metabolitos monoésteres (Martino-Andrade and Chahoud, 2010). Los monoésteres comunes incluyen el ftalato de mono(2-etilhexilo) (MEHP), el ftalato de monobutilo (MBP), los ftalatos de monoetilo (MEP) y el ftalato de monobencil (MBzP) (Silva *et al.*, 2004).

Aunque sus efectos sobre la fertilidad masculina han sido extensamente descritos (Hliseníková *et al.*, 2020; Krzastek *et al.*, 2020), su impacto sobre la fertilidad femenina es más

controvertido. Al centrarnos en los estudios realizados en mujeres sometidas a tratamientos de fertilidad, se ha descrito que mayores concentraciones de monoésteres de ftalato, especialmente metabolitos del DEHP, se han asociado con una disminución de los parámetros de reserva ovárica (Du *et al.*, 2019; Messerlian *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2021; Sacha *et al.*, 2021) (Tabla S1). También se ha descrito que mayores concentraciones de monoésteres de ftalato se asocian con peores resultados de respuesta ovárica, como menor concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante de ovulación y menor número de oocitos totales y maduros recuperados (Hauser *et al.*, 2016; Machtinger *et al.*, 2018). Sin embargo, en otros estudios no se replicaron estas observaciones (Deng *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2016) (Tabla S2).

Respecto a los resultados embriológicos del tratamiento de FIV, también han sido descritas asociaciones negativas entre la presencia de distintos metabolitos de ftalato en matrices biológicas femeninas con el número de embriones fecundados (Deng *et al.*, 2020; Hauser *et al.*, 2016; Machtinger *et al.*, 2018), la calidad de los embriones obtenidos (Machtinger *et al.*, 2018) y el número de embriones que llegan a fase de blastocisto (Deng *et al.*, 2020). Sin embargo, en otros estudios no se han observado estas asociaciones (Al-Saleh, Coskun, Al-Doush, Al-Rajudi, *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2016; Hauser *et al.*, 2016) (Tabla S3).

En algunos estudios se han relacionado niveles elevados de monoésteres de ftalatos, especialmente metabolitos específicos de DEHP como el MEHP, con menores tasas de implantación, embarazo clínico y recién nacido vivo en mujeres sometidas a tratamientos de FIV (Al-Saleh, Coskun, Al-Doush, Abduljabbar, *et al.*, 2019; Begum *et al.*, 2021; Hauser *et al.*, 2016). Aunque en otros estudios no se han descrito estas asociaciones (Deng *et al.*, 2020; Machtinger *et al.*, 2018) (Tabla S4).

2.3.4. Elementos traza

Los metales son elementos químicos caracterizados por ser buenos conductores del calor y la electricidad, tienen la capacidad de formar cationes y de combinarse con compuestos no metálicos a través de enlaces iónicos. Por otro lado, los metaloides son elementos químicos con propiedades intermedias entre los metales y los no metales. Aunque no existe una definición precisa, los metaloides tienden a caracterizarse por ser semiconductores de la electricidad y formar óxidos anfóteros. Partiendo de la base de que la pesadez y la toxicidad están interconectadas, el término metal pesado o metal tóxico han sido tradicionalmente empleados en toxicología clínica para designar a algunos metales (fundamentalmente cadmio, plomo y mercurio) y metaloides (fundamentalmente arsénico) para los que se ha demostrado la capacidad de inducir efectos adversos para el ecosistema y los organismos vivos (Azeh Engwa *et al.*, 2019; Duffus, 2002). Esta definición ha sido extensamente criticada, por lo que basándonos en su presencia a concentraciones traza (desde partes por billón hasta menos de 10 partes por millón) en distintas matrices ambientales (Tchounwou *et al.*, 2012), en la presente tesis nos referiremos a ellos como elementos traza.

Algunos de estos elementos traza son considerados esenciales, ya que son componentes de diversas enzimas y empuñan papeles importantes en diversas reacciones de oxidación-reducción, lo que los convierte en elementos necesarios para múltiples funciones bioquímicas y fisiológicas (Carvalho *et al.*, 2015). Dentro de este grupo de elementos hemos incluido el cobalto (Co), el cobre (Cu), el zinc (Zn), el manganeso (Mn), el hierro (Fe), el molibdeno (Mo), el selenio (Se), el cromo (Cr) y el litio (Li). Estos elementos, conocidos como elementos traza esenciales u oligoelementos, pueden provocar enfermedades o síndromes carenciales si no se encuentran en cantidades adecuadas (Carvalho *et al.*, 2015), pero si se encuentran en concentraciones elevadas pueden tener un efecto tóxico (Azeh Engwa *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2015; Goutam Mukherjee *et al.*, 2022; Rehman *et al.*, 2018).

Otros elementos como el antimonio (Sb), el arsénico (As), el bario (Ba), el cadmio (Cd), el plomo (Pb), el mercurio (Hg), el níquel (Ni), el estroncio (Sr) y el estaño (Sn) no tienen funciones biológicas conocidas, por lo que se consideran elementos traza no esenciales (Tchounwou *et al.*, 2012). Muchos de estos elementos son, de hecho, perjudiciales para la función normal del organismo al acumularse en el organismo (Rehman *et al.*, 2018).

Los elementos considerados elementos traza en los sistemas biológicos se encuentran de forma natural en todo el medio ambiente, fundamentalmente la corteza terrestre (litosfera), pero también las masas de agua (hidrosfera) y la atmósfera, y también pueden acumularse en los organismos biológicos, incluidas bacterias, plantas, hongos y animales (biosfera) (Azeh Engwa *et al.*, 2019). En la corteza terrestre, estos metales pesados están presentes en las menas que se recuperan durante las actividades mineras como minerales. Estos elementos se distribuyen en el medio ambiente mediante distintos procesos ambientales como la erosión, las aguas de manantial, las erupciones volcánicas y la actividad bacteriana (Azeh Engwa *et al.*, 2019) (Figura 9).

En los últimos siglos distintas actividades antropogénicas, como la combustión de combustibles fósiles, los procesos industriales, las actividades agrícolas, efluentes domésticos y fuentes atmosféricas, han provocado cambios drásticos en sus ciclos geoquímicos que han incrementado la contaminación ambiental a estos elementos (Azeh Engwa *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2018). La contaminación ambiental también puede producirse a través de la corrosión de los metales, la deposición atmosférica, la erosión del suelo de los iones metálicos y la lixiviación de los metales pesados, la resuspensión de los sedimentos y la evaporación de los metales de los recursos hídricos al suelo y a las aguas subterráneas (Tchounwou *et al.*, 2012). La contaminación ambiental es muy destacada en las áreas de fuentes puntuales, como la minería, las fundiciones y los hornos, y otras operaciones industriales basadas en metales (Tchounwou *et al.*, 2012) (Figura 9).

Los organismos pueden entrar en contacto con los elementos traza por inhalación o ingestión de alimentos y agua contaminados. Algunos también pueden ser absorbidos cutáneamente. La exposición puede ser por contacto con el elemento puro o con algún compuesto, bien orgánico o inorgánico, que lo contenga (Rehman *et al.*, 2018). La exposición continuada a elementos traza no esenciales conduce a su interacción con las biomoléculas del organismo, lo que en última instancia desencadena su acumulación y que comiencen a ser empleados por el organismo como sustitutos de los elementos esenciales. Por ejemplo, se ha descrito que el calcio es sustituido por el plomo, el zinc es sustituido por el cadmio y la mayoría de los oligoelementos son sustituidos por el aluminio (Rehman *et al.*, 2018) (Figura 9).

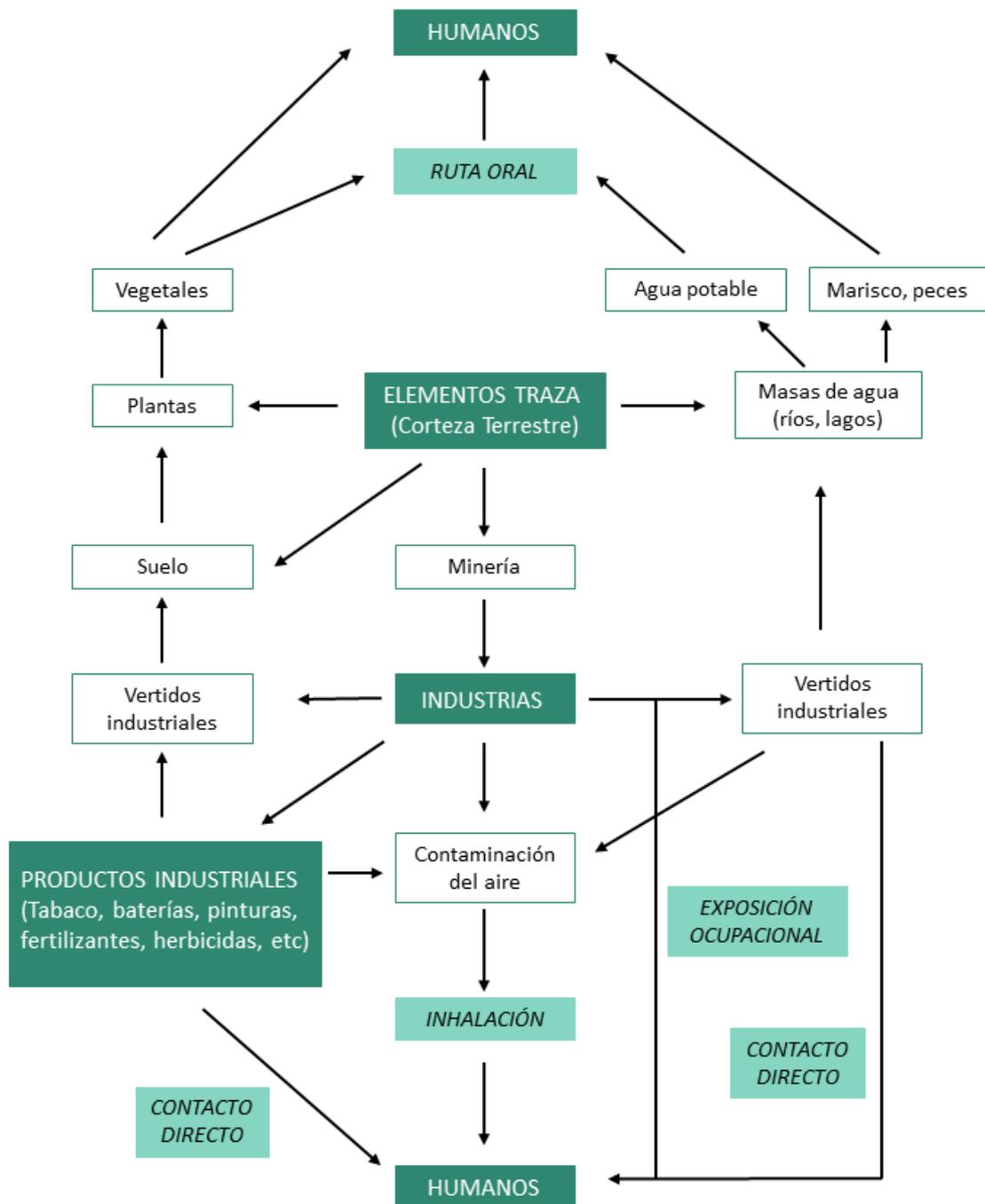


Figura 9. Esquema de las fuentes de exposición y vías de entrada en los seres humanos. En color oscuro, las principales fuentes y dianas de los elementos traza. En blanco, los vectores de exposición a elementos traza y, en color claro, los mecanismos de exposición a elementos traza. *Adaptado de Engwa et al. 2019.*

Este proceso se produce porque, cuando los elementos traza son ingeridos, a través de alimentos o agua, el medio ácido del estómago induce su oxidación a sus diversos estados de oxidación. Esta oxidación permite que puedan unirse mediante enlaces estables y fuertes a biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y enzimas. Los elementos traza no esenciales

comúnmente tienden a unirse a los grupos tio (p. ej. el grupo SH de la cisteína y el grupo SCH₃ de la metionina) (Azeh Engwa *et al.*, 2019).

Las proteínas unidas a elementos traza no esenciales pueden ser sustrato para ciertas enzimas. En este caso, la afinidad entre la proteína unida a elementos traza no esenciales se ajusta con alta especificidad al sitio activo de la enzima, lo que bloquea la reacción enzimática y provoca tanto la acumulación del elemento como la inactivación de la enzima (Azeh Engwa *et al.*, 2019). Además, la toxicidad por elementos traza puede ser inducida por la sustitución en una metaloenzima por otro ion metálico de tamaño similar. Por ejemplo, el cadmio desplaza a los iones de zinc y calcio en las proteínas de dedos de zinc, las metaloproteínas y ciertas enzimas deshidrogenadoras (Faller *et al.*, 2005; Hartwig, 2001). Los elementos traza también pueden inhibir el correcto plegamiento de las proteínas e inducir su agregación (Azeh Engwa *et al.*, 2019).

Los iones de elementos traza no esenciales también generan radicales libres, lo que conduce a daño oxidativo sobre las proteínas y el ADN. Además de sus efectos dañinos sobre las biomoléculas, también se ha descrito que alteran distintas cascadas de señalización, lo que en última instancia afecta tanto la expresión de genes como la modulación epigenética (Azeh Engwa *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2018). Por el contrario, los elementos traza esenciales suelen ser componentes esenciales de los sistemas antioxidantes (Carvalho *et al.*, 2015).

También se han descrito relaciones antagónicas entre elementos traza esenciales, como el cobre con el zinc y el molibdeno, que conducen a que cualquier variación en alguno de estos elementos pueda alterar el balance o la función del otro. Por esta razón, se está comenzando a considerar sus ratios como las variables con un impacto clínico más relevante que las concentraciones individualizadas de cada elemento (Osredkar, 2011; Vyskočil and Viau, 1999).

Diversos estudios han explorado el impacto de elementos traza, tanto esenciales como no esenciales, presentes en distintas matrices biológicas de mujeres sometidas a tratamientos de FIV sobre los resultados de los mismos.

Si comenzamos con los elementos traza esenciales, se ha sugerido que las mujeres subfértiles sometidas a tratamientos de reproducción asistida se caracterizan por tener menores concentraciones de este tipo de elementos (Grieger *et al.*, 2019; Özkaya *et al.*, 2011;

Skalny *et al.*, 2018), mientras que su suplementación puede incrementar la fertilidad femenina (Özkaya *et al.*, 2011; Skalnaya *et al.*, 2019). En los trabajos en los que ha sido evaluada su relación con los resultados de los tratamientos de FIV, generalmente se han descrito mejores resultados en las mujeres con mayor concentración en sus matrices biológicas.

En concreto, se ha descrito que las mujeres con mayores concentraciones de zinc y selenio tienen un mayor AFC (Dickerson *et al.*, 2011) (Tabla S1). Además, se han descrito asociaciones positivas entre la exposición a distintos elementos traza esenciales (selenio, zinc, cobalto, cromo, cobre y molibdeno) con mayor número de oocitos recuperados (Dickerson *et al.*, 2011; Ingle *et al.*, 2017), lo que subraya la importancia de estos oligoelementos en el proceso de foliculogénesis. Además, se han observado asociaciones positivas entre elementos traza esenciales, como cobre, cobalto y selenio, con el número de oocitos maduros recuperados (Li *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2017), aunque de forma inconsistente entre investigaciones (Ingle *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021). Por el contrario, se han descrito asociaciones negativas entre el número de oocitos maduros recuperados y la concentración de elementos traza esenciales como el cromo y el manganeso (Zhou *et al.*, 2021), aunque en el caso del cromo estas asociaciones no han sido descritas en otros estudios (Ingle *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020). No se han observado asociaciones entre las concentraciones de zinc ni molibdeno con el número de oocitos maduros recuperados tras un ciclo de estimulación ovárica (Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Ingle *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2017; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021) (Tabla S2).

Respecto a los parámetros embriológicos, se ha observado una asociación positiva entre la exposición a cobre y cobalto y el número de embriones fecundados (Li *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2017), aunque no en todos los estudios en los que ha sido evaluado (Ingle *et al.*, 2017). En el caso del zinc, existen resultados controvertidos, ya que se ha asociado tanto positivamente (Sun *et al.*, 2017), como negativamente (Ingle *et al.*, 2017) con el número de embriones fecundados. Por lo tanto, es necesario confirmar estas observaciones ahondar en el papel de los elementos traza sobre la fecundación embrionaria. Además, la presencia de mayores concentraciones de selenio se ha asociado negativamente con el número de embriones que llegan a fase de blastocistos en un estudio (Wu *et al.*, 2020), pero no en el otro en el que se analiza (Li *et al.*, 2022). No se han descrito asociaciones para cobre, zinc, molibdeno, cromo o manganeso con variables de desarrollo embrionario pre-implantacional (Tabla S3).

Adentrándonos en la relación de los elementos traza esenciales con los resultados clínicos del tratamiento de FIV, no se han descrito asociaciones entre la exposición materna a otros elementos, como arsénico, cobre, zinc, selenio, cobalto, molibdeno, cobre o hierro, y la probabilidad de implantación embrionaria (Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Ingle *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022; Tolunay *et al.*, 2016). Por lo que respecta al embarazo clínico, en algunos trabajos se describe una asociación positiva entre la presencia de elementos traza esenciales (selenio y zinc) con la probabilidad de embarazo clínico (Wang, Liang, *et al.*, 2021; Wdowiak *et al.*, 2018). Por el contrario, el cobre se ha relacionado con menor probabilidad de embarazo clínico, aunque con resultados no consistentes en todos los estudios en los que es evaluado (Ingle *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021). No se han descrito asociaciones entre la exposición a cromo, molibdeno, hierro ni manganeso y la probabilidad de embarazo clínico (Ingle *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021) (Tabla S4).

Continuando con los elementos traza no esenciales, de forma general se han descrito asociaciones negativas entre los elementos traza no esenciales evaluados y los resultados de FIV evaluados. Los elementos más comúnmente evaluados son aquellos tradicionalmente considerados metales y metaloides pesados tóxicos (mercurio, plomo, cadmio y arsénico).

Respecto a su impacto sobre la reserva ovárica, en algunos estudios se ha observado una asociación negativa entre una mayor concentración de mercurio en distintas matrices biológicas con el AFC, aunque no en todos los estudios en los que ha sido evaluado. Por lo que respecta a la presencia de otros elementos, como el bario, el arsénico y el plomo, no se han descrito asociaciones con el AFC (Jiang *et al.*, 2022) (Tabla S1).

Tampoco se ha observado ninguna asociación entre la presencia de mercurio y la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante de la ovulación (Wright *et al.*, 2015) y solo en uno de los cuatro trabajos en los que se evaluó la asociación entre la exposición a mercurio y el número de oocitos totales recuperados se observó asociación (Dickerson *et al.*, 2011; García-Forteza *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2022; Wright *et al.*, 2015). Por lo que respecta al número de oocitos maduros recuperados, se han descrito asociaciones negativas entre la exposición a elementos tradicionalmente considerados metales pesados tóxicos (plomo, mercurio y cadmio) con este parámetro. En el caso del

plomo, la evidencia parece ser moderada, ya que entre todos los trabajos en los que ha sido evaluado, solo se ha observado una asociación negativa en unos pocos (Bloom *et al.*, 2010; Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021). En el caso del cadmio (Bloom *et al.*, 2010; Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021) y el mercurio (Bloom *et al.*, 2010; Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2022; Tolunay *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2021), la evidencia de esta asociación puede considerarse baja, ya que solo ha sido descrita en un estudio del total en el que han sido evaluados (Tabla S2).

El caso del bario, un elemento traza no esencial poco estudiado, resulta controvertido, ya que en una investigación se informó de su asociación negativa con el número de oocitos recuperados (Jiang *et al.*, 2022), mientras que en otra investigación se observó una asociación positiva con esta misma variable (Zhou *et al.*, 2021). En el trabajo de Zhou *et al.* también observaron asociaciones positivas entre el plomo y el cromo con el número de oocitos maduros recuperados (Zhou *et al.*, 2021), lo que contraviene el resto de evidencias disponibles, por lo que es necesario ahondar en estas discrepancias (Tabla S2).

En los trabajos en los que han sido evaluados, no se han observado asociaciones entre las concentraciones de arsénico y vanadio en distintas matrices biológicas con el número de oocitos maduros recuperados tras un tratamiento de COS (Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Ingle *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2017; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021) (Tabla S2).

Además, recientemente se ha informado de una asociación negativa entre la concentración de bario y el número de embriones correctamente fecundados (Jiang *et al.*, 2022), aunque no ha sido confirmado en el otro estudio en el que se ha evaluado este elemento en relación con los resultados de FIV (Zhou *et al.*, 2021). Además, en este trabajo se ha descrito que la exposición al talio, mercurio y bario se asocia positivamente con el número de embriones en fase de blastocisto obtenidos (Zhou *et al.*, 2021). Por el contrario, la exposición materna al bario se ha relacionado con un incremento del riesgo de detención del desarrollo embrionario (Jiang *et al.*, 2022) y la exposición materna a elementos traza como el

cobre, el selenio o el zinc con un aceleramiento el desarrollo embrionario (Wdowiak *et al.*, 2018) (Tabla S3).

Para finalizar con los elementos traza no esenciales, existe una evidencia moderada entre la exposición a metales tradicionalmente descritos como metales pesados tóxicos (mercurio, cadmio, plomo) con menor probabilidad de implantación (Bloom *et al.*, 2012; Butts *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Tolunay *et al.*, 2016), embarazo clínico (Al-Saleh *et al.*, 2008; Bloom *et al.*, 2012; Tolunay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020) y recién nacido vivo (Butts *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020), aunque de forma inconsistente entre estudios (Al-Saleh *et al.*, 2008; Bloom *et al.*, 2012; Butts *et al.*, 2021; García-Forteza *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022; Tolunay *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021). Por último, también ha sido descrita una asociación entre la exposición al metal pesado plomo (Li *et al.*, 2022) con un incremento del riesgo de aborto espontáneo. No se han descrito asociaciones entre la exposición a arsénico, níquel, vanadio, bario y talio y la probabilidad de embarazo clínico (García-Forteza *et al.*, 2018; Ingle *et al.*, 2017; Tolunay *et al.*, 2016; Wdowiak *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021) (Tabla S4).

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis general es que las concentraciones de determinados compuestos ambientales y procedentes de la dieta, como los fitoestrógenos, parabenos, ftalatos y elementos traza tanto esenciales como no esenciales, a los que se encuentran expuestas las mujeres sometidas a tratamientos de fecundación *in vitro* pueden tener un papel modificador, tanto deletéreo como protector, sobre sus resultados reproductivos.

Basándonos en esta hipótesis general, en primer lugar suponemos que las concentraciones de estos compuestos ambientales y procedentes de la dieta son cuantificables en diversas matrices biológicas humanas. Como segunda conjetura, hipotetizamos que las relaciones de cada compuesto entre las distintas matrices biológicas evaluadas nos permitirá identificar las matrices más apropiadas para la cuantificación de estos compuestos. Por último, sospechamos que las concentraciones de estos compuestos en las distintas matrices biológicas se asociarán, bien de forma deletérea o protectora, con los resultados de reserva ovárica, respuesta a la estimulación ovárica, resultados embriológicos y resultados clínicos del tratamiento de fecundación *in vitro*.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar las asociaciones entre la presencia de ciertos compuestos ambientales y procedentes de la dieta, como fitoestrógenos, parabenos, ftalatos y elementos traza tanto esenciales como no esenciales, en matrices biológicas procedentes de mujeres sometidas a tratamientos de fecundación *in vitro* y los resultados de este.

Objetivos específicos:

1. Analizar las concentraciones en líquido folicular, plasma y orina de fitoestrógenos, parabenos, ftalatos y elementos traza esenciales y no esenciales en mujeres sometidas a tratamientos de fecundación *in vitro*.
2. Evaluar las relaciones de cada compuesto entre las distintas matrices biológicas evaluadas y del conjunto de compuestos en cada matriz biológica.
3. Evaluar las asociaciones de los compuestos ambientales y procedentes de la dieta en cada una de las matrices biológicas con resultados de reserva ovárica, respuesta a la estimulación ovárica, resultados embriológicos y resultados clínicos del tratamiento de fecundación *in vitro*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

En este estudio exploratorio prospectivo observacional unicéntrico se reclutaron sesenta mujeres que acudían a realizarse un tratamiento de FIV con análisis genético pre-implantacional para aneuploidías (DGP-A) y transferencia en diferido de un embrión único congelado (SET/FET) entre 2018 y 2019 en la clínica de reproducción asistida IVI-RMA NJ – Basking Ridge (Nueva Jersey, EEUU). Se recogieron muestras de orina, sangre y líquido folicular el día de la punción folicular, que fueron empleadas para evaluar su contenido de fitoestrógenos, parabenos, el metabolito de ftalato MEHP y distintos elementos traza, tanto esenciales como no esenciales. Los resultados clínicos del tratamiento de FIV se extrajeron de las historias clínicas electrónicas de las participantes. Posteriormente, se evaluaron las asociaciones entre los distintos compuestos y las variables del ciclo de FIV (Figura 10).

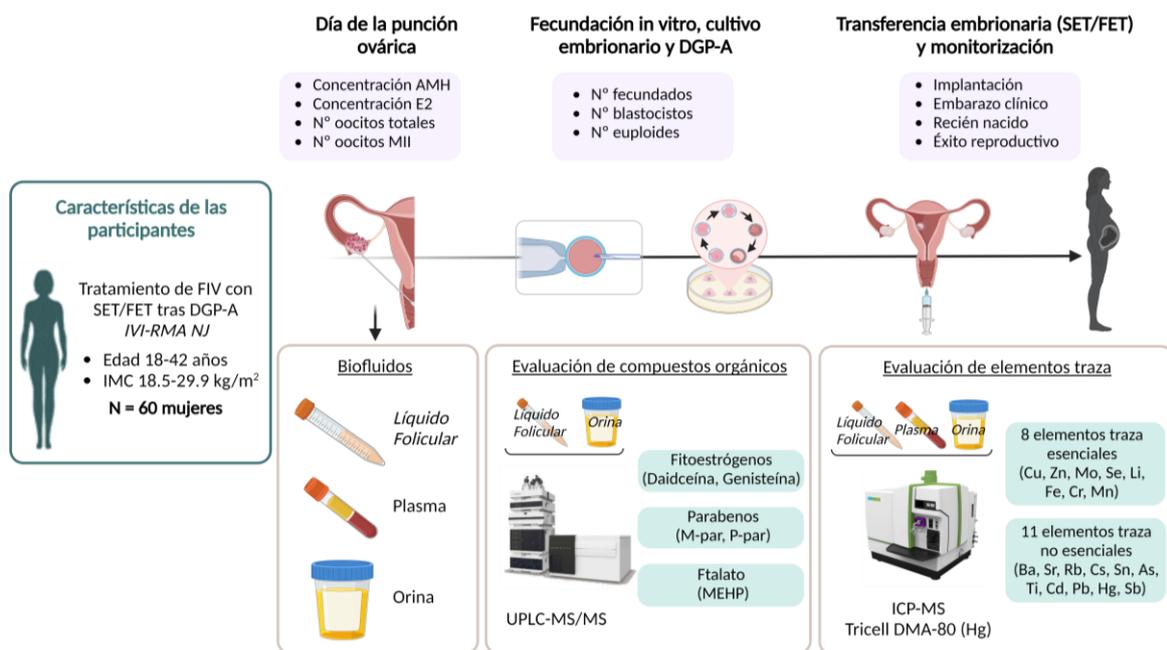


Figura 10. Esquema del diseño del estudio.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de IVI Valencia y el Western Institutional Review Board (#1606-FIVI-050-FD). Se obtuvo el consentimiento informado de todas las participantes antes de su inclusión en el estudio, después de que un equipo entrenado les explicara los objetivos del estudio y respondieran todas sus posibles dudas.

Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III, mediante un proyecto FIS (Código de Proyecto: PI17/00931); la Fundación IVI, mediante financiación interna; y la Generalitat Valenciana, mediante un contrato de técnico de apoyo a la investigación (APOTI/2018/010 y APOTI/2020/013).

2. Población de estudio

Mujeres que acudieran a realizarse un tratamiento de FIV con estimulación ovárica con antagonista, análisis genético pre-implantacional para aneuploidías (DGP-A) y transferencia en diferido de un embrión único congelado (SET/FET) y cumplieran los siguientes criterios fueron consultadas por facultativos especialistas en reproducción asistida para su inclusión en el estudio a través de las consultas de ginecología de RMANJ – Basking Ridge entre 2018 y 2019.

- *Criterios de inclusión*

Se incluyó a mujeres de 18 a 42 años, a las que se les realice un DGP-A con SET-FET, excepto por factor masculino severo, con IMC de entre 18.5 y 30 kg/m². Sin valor mínimo de reserva ovárica. El protocolo de estimulación fué siempre con antagonista de GnRH diario. La función tiroidea debía ser normal o estar corregida. La transferencia embrionaria no debía ser dificultosa.

- *Criterios de exclusión*

Se excluyó a aquellas mujeres con un embarazo previo, factor masculino severo, hidrosálpinx no operado, una historia conocida de insuficiencia endometrial (por ejemplo, un útero anormal o no reparado, un endometrio irregular o <7mm el día de la transferencia embrionaria); cariotipos alterados, síndrome antifosfolípido, trombofilias o patologías endocrinas sistémicas no corregidas.

Las sesenta mujeres que finalmente consintieron su participación en el estudio recibieron los mismos tratamientos y cuidados clínicos y de laboratorio que si no hubieran participado en este estudio de investigación. En ningún caso, la propuesta de inclusión en este estudio modificó la estrategia terapéutica de las participantes, ni se indicaron pruebas médicas con objeto de incluir a ninguna participante.

3. Obtención y procesamiento de las matrices biológicas

El día de la punción ovárica transvaginal eco guiada, las participantes proporcionaron una muestra de orina y una muestra de sangre y se obtuvo su líquido folicular tras el aislamiento de los complejos corona-oocito.

3.1. Muestras de orina

Para la determinación de fitoestrógenos (daidzeína y genisteína), parabenos (p-parabeno y m-parabeno), el metabolito de ftalato MEHP y distintos elementos traza no esenciales se recogió una muestra de orina en ayunas, a primera hora de la mañana, el día de la punción folicular.

Para la recogida de esta muestra, se emplearon frascos de propileno estériles (Maran Medical, Madrid, España) para la recolección de orina (libres de BPA). Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su envío al laboratorio, donde fueron centrifugadas a 500g durante 15 minutos a 4°C para precipitar el sedimento. El sobrenadante fue alicuotado en tubos eppendorf Safe-Lock de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) e inmediatamente se congelaron a -80°C en el biobanco de RMANJ – Basking Ridge hasta completar el reclutamiento.

3.2. Muestras de plasma

Para la determinación de elementos traza no esenciales se obtuvo una muestra de sangre el día de la punción folicular.

La sangre fue obtenida en tubos con EDTA, centrifugada a 1 300g durante 15 minutos a 4°C para separar las fases. El plasma fue alicuotado en tubos eppendorf Safe-Lock de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) e inmediatamente se congelaron a -80°C en el biobanco de RMANJ – Basking Ridge hasta completar el reclutamiento.

3.3. Muestras de líquido folicular

Para la determinación de fitoestrógenos (daidzeína y genisteína), parabenos (p-parabeno y m-parabeno), el metabolito de ftalato MEHP y distintos elementos traza no esenciales se recogió una muestra de líquido folicular el día de la punción folicular.

Tras el aislamiento de los complejos corona-oocito, se recogieron aproximadamente 10 mL de la mezcla de líquido folicular en tubos cónicos de propileno de 15 mL (Biologix, TX,

Estados Unidos). Posteriormente fue centrifugado a 1 000g durante 3 minutos a 4°C para eliminar posibles restos celulares. El sobrenadante fue alicuotado en tubos eppendorf Safe-Lock de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) e inmediatamente se congelaron a -80°C en el biobanco de RMANJ – Basking Ridge hasta completar el reclutamiento.

Una vez obtenidas todas las muestras, fueron enviadas en hielo seco a los laboratorios de la Fundación IVI (Valencia, España) y transferidos a la Unidad Analítica del IISS-La Fe (Valencia, España) para el análisis de los compuestos orgánicos y a la Unidad de Espectroscopía del CIEMAT (Madrid, España) para el análisis de elementos traza.

4. Evaluación de compuestos orgánicos mediante UPLC-MS/MS

Se evaluaron las concentraciones de cinco compuestos orgánicos con un potencial efecto deletéreo sobre la función reproductiva, dos fitoestrógenos (daidzeína y genisteína), dos parabenos (metil-parabeno y propil-parabeno) y un metabolito de ftalato (MEHP) en las muestras de líquido folicular y orina, obtenidas el día de la punción folicular, mediante espectrometría de masas con cromatografía líquida Ultra-Performance (UPLC-MS/MS, del inglés *Ultra-Performance Liquid Chromatography*) en la Unidad Analítica del IIS La Fe (Valencia, España).

4.1. Soluciones patrón y calibración

Para la generación de las soluciones patrón se prepararon soluciones patrón estándar para cada uno de los cinco metabolitos individuales y tres estándares internos deuterados a una concentración de 1mg/mL en un disolvente adecuado según las recomendaciones del fabricante. Puede encontrarse un resumen de estos compuestos en la tabla 1.

Tabla 1. Compuestos y patrones internos empleados en el análisis mediante UPLC/MS-MS

Compuesto	Estándar interno empleado
Daidzeína	Daidzeína – d4
Genisteína	Genisteína – d4
Metil-parabeno	Propil-parabeno – 13C
Propil-parabeno	Propil-parabeno – 13C
Mono-ethylhexil ftalato	Propil-parabeno – 13C

A partir de estas soluciones individuales se preparó una solución patrón mixta de los cinco compuestos en metanol a una concentración final de 30 µg/mL para cada compuesto. Además, también se preparó una solución mixta de los cuatro estándares internos a una concentración final de 4 µg/mL para la daidzeína-d4 y la genisteína-d4 y de 0,8 µg/mL para el

propil-parabeno-13C. Estas soluciones se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso, evitando más de un ciclo de congelación y descongelación.

Las soluciones de trabajo de los analitos se obtuvieron diluyendo la solución patrón mixta alicuotada en agua:acetonitrilo (70:30, v/v). Las curvas de calibración de los estándares, con concentraciones en el rango de 0,24-2000 ng/mL, se prepararon mediante medias diluciones seriadas de la solución patrón de la mezcla. Las concentraciones del estándar interno se mantuvieron constantes en todos los puntos de calibración en 1333 ng/mL para la daidzeína-d4 y la genisteína-d4 y en 266 ng/mL para el propil-parabeno-13C.

4.2. Preparación de las muestras

Tanto la orina como el líquido folicular fueron procesados de forma similar. Se comenzó sometiendo a 600 μL de cada muestra una hidrólisis enzimática de los conjugados de glucuronidasa empleando 6 μL β -Glucuronidasa *E. coli* K12 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Para realizar esta hidrólisis, se ajustó el pH de la muestra a las condiciones óptimas (pH 6) mediante el empleo de un tampón de acetato de amonio. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con la enzima durante 2 horas a 37°C . Tras estas 2 horas, se añadió a las muestras 100 μL de agua con ácido fórmico al 0,1% para detener la reacción. En esta fase del tratamiento se añadieron 20 μL de las soluciones de mezcla de estándares internos a cada muestra.

A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido. Para ello, se añadieron 600 μL de acetato de etilo, se agitó en vórtex durante 30 segundos y se agitó durante 15 minutos con un mezclador rotador de muestras. Este proceso de extracción se repitió y las dos fracciones de acetato de etilo resultantes se combinaron y se secaron en un concentrador speedvac. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80°C y se descongelaron el día del análisis LC-MS/MS.

El día del análisis, los residuos se reconstituyeron en 60 μL de agua:acetonitrilo (70:30, v/v). La concentración de la muestra de estas soluciones de muestra de medición es 10 veces más concentrada que las muestras originales y las concentraciones del patrón interno son constantes en 1333 ng/mL para, la daidzeína-d4 y la genisteína-d4 y en 266 ng/mL para el propil-parabeno-13C.

4.3. Método UPLC-MS/MS

Todas las muestras fueron analizadas mediante un UPLC-MS/MS, Triple Quad 1290-6460 de Agilent. Las muestras fueron inyectadas dos veces, empleando dos métodos instrumentales diferentes, uno para detectar los compuestos en ionización ESI+ (daidzeína y genisteína) y otro para detectar los compuestos en ionización ESI- (metil-parabeno, propil-parabeno y mono-ethylhexil ftalato). La principal diferencia entre ambos métodos fue la fase móvil empleada y los parámetros de la espectrometría de masas.

4.3.1. Método UPLC-MS/MS para la medición de fitoestrógenos

Las condiciones cromatográficas del método empleado para la determinación de la daidzeína y genisteína en una ionización ESI+ se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la medición de compuestos en ionización ESI+

Temperatura de la columna	55°C	
Volumen de inyección	5 μ	
Fase móvil A	Agua (0.1% v/v HCOOH)	
Fase móvil B	Acetonitrilo (0.1% v/v HCOOH)	
Flujo	0.4 mL min ⁻¹	
Columna	ACQUITY BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 100 mm)	
Gradiente	Tiempo	% de fase móvil B
	0	30
	0.5	30
	3	60
	3.2	98
	4.2	98
	4.4	30
5.5	30	

Los parámetros de espectrometría de masas, entre los que se incluyen las transiciones del monitoreo de múltiples reacciones (MRM, del inglés *Multiple Reaction Monitoring*), el cono optimizado, los voltajes de colisión y el tiempo de retención se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de espectrometría de masas para la medición de compuestos en ionización ESI+

Compuesto	MRM cuantitativo	MRM calificador	Fragmentador (V)	Energía de colisión (e V)	Tiempo de retención (min)	Polaridad
Daidzeína	255>199	255>137	100	20	1.5	ESI +
Genisteína	271>153	271>215	100	30	2.2	ESI +
Daidzeína – d4	259>203	-	100	20	1.5	ESI +
Genisteína – d4	275>219	-	100	30	2.2	ESI +

4.3.2. Método UPLC-MS/MS para la medición de parabenos y MEHP

Las condiciones cromatográficas del método empleado para la determinación de M-parabeno, P-parabeno y MEHP en una ionización ESI- se encuentran resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la medición de compuestos en ionización ESI-

Temperatura de la columna	55°C	
Volumen de inyección	5 μ	
Fase móvil A	Agua (buffer pH 8.5, AcONH 10 mM)	
Fase móvil B	Acetonitrilo	
Flujo	0.4 mL min ⁻¹	
Columna	ACQUITY BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 100 mm)	
Gradiente	Tiempo	% de fase móvil B
	0	30
	0.5	30
	3	60
	3.2	98
	4.2	98
	4.4	30
	5.5	30

Los parámetros de espectrometría de masas, entre los que se incluyen las transiciones del MRM, el cono optimizado, los voltajes de colisión y el tiempo de retención se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de espectrometría de masas para la medición de compuestos en ionización ESI-

Compuesto	MRM cuantitativo	MRM calificador	Fragmentador (V)	Energía de colisión (e V)	Tiempo de retención (min)	Polaridad
M-parabeno	151>92	151>136	100	20	1.5	ESI -
P-parabeno	179>92	179>136	100	20	2.8	ESI -
MEHP	277>134	277>127	100	10	2.5	ESI -
P-parabeno – ¹³ C	185>98	-	120	20	2.8	ESI -

4.4. Generación de la curva de calibración

Los estándares de calibración fueron preparados en el rango de concentración de 0,24-2000 ng/mL de cada compuesto para cada lote de muestras. Las curvas de calibración fueron generadas trazando la relación del área del pico del compuesto respectivo con el estándar interno correspondiente frente a la concentración nominal. La línea de mejor ajuste fue determinada mediante una regresión lineal ponderada (1/x) por mínimos cuadrados. El criterio de aceptación de la linealidad para el coeficiente de correlación fue de 0,99 o superior.

4.5. Estimación de los límites de cuantificación y límites superiores de cuantificación

Tanto los límites de cuantificación (LOQ) como los límites superiores de cuantificación (ULOQ) obtenidos para cada compuesto en las concentraciones finales de la muestra (no las concentraciones inyectadas) se encuentran descritos en la tabla 6. Los resultados por encima del ULOQ se calcularon por extrapolación de la curva de calibración, por lo que pueden esperarse mayores desviaciones del valor nominal.

Tabla 6. Límites de cuantificación y límites superiores de cuantificación para fitoestrógenos, parabenos y el metabolito de ftalato MEHP

Compuesto	LOQ (ng/mL)	ULOQ (ng/mL)
Daidzeína	0.5	200
Genisteína	0.5	200
M-parabeno	0.1	200
P-parabeno	0.1	200
MEHP	0.1	200

5. Evaluación de elementos traza mediante IPC-MS

Se evaluaron las concentraciones de 8 elementos traza esenciales (cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo), litio (Li), selenio (Se), hierro (Fe), cromo (Cr) y manganeso (Mn)) y 11 elementos traza no esenciales (bario (Ba), estroncio (Sr), rubidio (Rb), arsénico (As), estaño (Sn), cesio (Cs), mercurio (Hg), titanio (Ti), plomo (Pb), antimonio (Sb) y cadmio (Cd)) en líquido folicular, plasma y orina, obtenidas el día de la punción folicular, mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS, del inglés *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Las concentraciones de mercurio no fueron evaluadas empleando esta tecnología, sino mediante Tricell DMA-80. Todos estos análisis fueron llevados a cabo en la Unidad de Espectroscopía del CIEMAT (Madrid, España).

5.1. Soluciones patrón y calibración

Los elementos traza fueron cuantificados mediante un método de calibración externa en el que se emplearon estándares de calibración de 0,01 a 500 µg/L preparados diariamente mediante dilución en serie. Se emplearon galio (Ga), indio (In) y lutecio (Lu) como estándares internos (SPEX CertiPrep e Inorganic Ventures), que fueron añadidos a los blancos y estándares de calibración a una concentración final de 1 µg/L. Para las muestras de plasma y

orina, los blancos y estándares de calibración fueron preparados en ácido nítrico (HNO_3) al 2 % (v/v); mientras que, para las muestras de líquido folicular, los blancos y estándares de calibración fueron preparados en HNO_3 al 0,5 % (v/v) y Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,0005 % (v/v) como tensoactivo.

5.2. Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras de líquido folicular, se diluyeron 0.5 mL de muestra en una proporción 1:20 de HNO_3 al 0,5% (v/v), Triton® X-100 al 0,0005% (v/v), y se incluyeron como estándares internos 1 $\mu\text{g/L}$ de Ga, In y Lu.

Para la preparación de las muestras de plasma, se digirieron 0.5 mL de muestra en un bloque DigiPrep con rampa de temperatura utilizando 2 mL de HNO_3 al 65 % y 0,1 mL de ácido fluorhídrico de grado Suprapur® (Merck, 40 % p/v HF) (75 °C, 15 min) y luego 1 mL de H_2O_2 (115 °C, 60 min). La muestra digerida se completó hasta 10 mL con agua Milli-Q después de añadir 1 $\mu\text{g/L}$ de Ga, In y Lu como estándares internos.

Para la preparación de las muestras de orina, se diluyeron 0.5 mL de muestra en HNO_3 al 2% (v/v) a una proporción 1:10. Además se incluyó 1 $\mu\text{g/L}$ de Ga, In y Lu como estándares internos.

5.3. Método IPC-MS.

La determinación de elementos traza, excepto el mercurio, fue realizada mediante ICP-MS con un espectrómetro de masas i-CapRQ (Thermo Fisher Scientific) con analizador cuadrupolar y multiplicador secundario de electrones de modo dual como sistema de detección. Este instrumento incorpora una célula de colisión con modo de discriminación de energías cinéticas (KED) para eliminar impurezas. Antes de los análisis se realizó una comprobación diaria del funcionamiento en condiciones óptimas. La determinación de todos los elementos traza, excepto el Be y el Li, se realizó en modo KED para atenuar las interferencias poliatómicas debidas a la matriz. Los parámetros instrumentales y de adquisición se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros instrumentales y de adquisición para ICP-MS

Elemento	Parámetro	Valor
Introducción de la muestra	Nebulizador	Nebulizador concéntrico de vidrio Meinhard
	Cámara de pulverización	Cyclonic
Plasma	Potencia de avance	1550 W
	Flujo de Ar	13 L/min
	Auxiliar de Ar	0.8 L/min
	Nebulización de Ar	1 L/min
Célula de colisión	Célula de gas	Alphagaz™ 2 helio
	Flujo de gas	4.5 mL/min
	Modo	KED (todos los elementos, excepto Li y Be)
Parámetros de adquisición	Resolución	Media
	Modo de escaneo	Salto de picos
	Números de escaneo	20
	Corridas por réplica	5
	Canal por masa	1
	Tiempo de permanencia	50 ms

6. Evaluación de mercurio total mediante Tricell DMA-80

Se evaluaron las concentraciones de mercurio total en líquido folicular y orina, obtenidas el día de la punción folicular, mediante Tricell DMA-80. Por un problema técnico con el analizador, no pudieron evaluarse todas las muestras de plasma, por lo que esta información se excluyó de la presente tesis doctoral. Este se trata de un analizador específico para el mercurio, capaz de determinar las concentraciones de mercurio tanto en muestras sólidas como líquidas. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo en la Unidad de Espectroscopía del CIEMAT (Madrid, España).

6.1. Soluciones patrón y calibración

La calibración se realizó utilizando una solución patrón trazable de 1000 mg/L de Hg (Johnson Matthey GmbH Alpha, Karlsruhe, Alemania). Esta solución se utilizó para preparar

soluciones estándar y patrones de control mediante dilución con HNO_3 0,5 M. La calibración se confirmó diariamente al inicio de cada corrida utilizando una inyección de 20 μL de solución patrón que contenía 0,5 ng de mercurio. La evaluación de la calidad se realizó mediante el procesamiento y la determinación de muestras en blanco y de control de laboratorio siguiendo las directrices dadas en el método EPA 7473. Para validar las determinaciones de mercurio total, se analizó el SRM NIST 955c / Nivel 2 (Metales tóxicos en sangre caprina) con un valor certificado de Hg de $5,15 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{kg}$. El resultado obtenido fue de $5,23 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{kg}$, lo que coincide con el valor certificado. Además, se comprobó la viabilidad del método mediante la determinación de muestras contaminadas con mercurio preparadas para cada matriz biológica estudiada.

6.2. Preparación de las muestras

Las muestras de líquido folicular, plasma y orina fueron procesadas directamente, sin ningún tratamiento previo.

6.3. Método Tricell DMA-80

Las determinaciones de mercurio total de las muestras fueron realizadas empleando un instrumento Tricell DMA-80 (Milestone, Sorisole, Italia) siguiendo las recomendaciones dadas por el método EPA 7473.

Las muestras fueron pesadas en un bote de cuarzo y se colocaron en la bandeja del automuestreador. Los pesos típicos de las muestras oscilaron entre 10 y 20 mg. A continuación, el bote de muestras fue introducido en un horno de descomposición para liberar el mercurio en presencia de un flujo de oxígeno. Dentro del instrumento, las muestras se secaron y descompusieron y los productos de la combustión se realizaron mediante un flujo de oxígeno a través de un catalizador calentado para reducir las especies de mercurio a mercurio elemental y atrapar los halógenos, el nitrógeno y los óxidos de azufre. Posteriormente, el vapor de mercurio se pre-concentró en un amalgamador de oro y se desorbió rápidamente, liberando los vapores de mercurio a las celdas de absorbancia, donde se midió su absorbancia a 253,7 nm.

Los parámetros instrumentales y de adquisición se describen en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros instrumentales y de adquisición para el instrumento DMA-80

Parámetro	Valor
Ratio del flujo de oxígeno	120 mL/min
Temperatura/tiempo de secado	200 °C, 30s
Rampa de decomposición	90 s hasta 650 °C
Mantenimiento de decomposición	90 s a 650 °C
Tiempo de purgado	30 s
Tiempo de amalgamación	12 s a 900 °C
Tiempo de grabado	30 s

Las determinaciones de mercurio en las muestras estudiadas se realizaron por triplicado.

7. Cuantificación de creatinina urinaria

Una vez llegaron las muestras a los laboratorios de FIVI, se cuantificó la concentración de creatinina para poder corregir las concentraciones de los analitos en orina. La concentración de creatinina se cuantificó mediante la reacción de Jaffe, en la que la creatinina y el ácido pícrico alcalino producen un complejo rojo/naranja, utilizando un kit comercial (R&D Systems).

8. Gestión clínica y evaluación de los resultados de FIV

La información de los resultados de FIV fue obtenida por el equipo de investigación a partir del registro médico electrónico de cada participante. En el momento del reclutamiento se recogieron la fecha de nacimiento, el peso y la altura. El Índice de Masa Corporal (IMC) fue calculado como la ratio entre el peso (kilogramos) y la altura (metros) al cuadrado. Otras variables demográficas, como la raza/etnicidad, el nivel educativo o el tabaquismo fueron auto informados mediante un cuestionario.

La concentración de AMH fue la del análisis más reciente recogido en el registro médico electrónico. La concentración de estradiol fue medida en suero, recogido el día del desencadenante de maduración oocitaria, empleando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia automatizado en la clínica.

La estimulación ovárica controlada se realizó en todas las participantes empleando un antagonista de GnRH. El ciclo de FIV de cada participante fue gestionado por el especialista reproductivo de cada participante, siguiendo procedimientos de práctica clínica estandarizados. Las decisiones relativas a las dosis de gonadotropinas se basaron en la

discreción del clínico y la estimación de la reserva ovárica de cada participante. Se realizó la administración de hCG y/o el agonista de GnRH para inducir la maduración final del oocito cuando el conjunto de la cohorte folicular alcanzó un diámetro de entre 15 y 20mm. El procedimiento de punción ovárica transvaginal fue realizado mediante aspiración guiada por ultrasonidos 36 horas tras la administración del desencadenante.

Una vez recogidos los oocitos, se decumularon las células del cumulus y los embriólogos determinaron tanto el número total de oocitos recuperados como el número de oocitos maduros (metafase II). En todos los casos se realizó ICSI, independientemente de los parámetros seminales, para reducir las posibilidades de contaminación con ADN paterno en el momento del DGP-A. Además, esto ayudó a estandarizar el método de fecundación. Aproximadamente 18h tras el ICSI, los embriólogos determinaron el número de oocitos fecundados, y se continuó el desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto empleando medio de cultivo secuencial. A continuación, se realizó una biopsia de trofoectodermo para DGP-A y los embriones fueron vitrificados.

La transferencia de embriones congelados fue realizada en un ciclo posterior para permitir la sincronía entre el embrión y el endometrio. Una vez se determinó la ploidia de los embriones, un único embrión euploide fue transferido. Los protocolos de preparación endometrial consistieron en una primera fase de estrógenos orales, seguidos por progesterona intramuscular. El día de la transferencia embrionaria, los embriones fueron desvitrificados y transferidos a la cavidad endometrial mediante un catéter guiado con confirmación por ultrasonidos, como se realiza de forma rutinaria.

Los resultados clínicos de FIV fueron evaluados de acuerdo a los protocolos clínicos. Se definió la implantación como una concentración de β -hCG sérica superior a 5 mIU/mL, habitualmente evaluada 9 días después de la transferencia embrionaria. La confirmación de un embarazo intrauterino mediante ecografía fue considerada un embarazo clínico. Un recién nacido vivo fue definido como el nacimiento de un neonato tras 24 semanas de gestación.

9. Análisis estadístico.

Además de las concentraciones de cada analito independientemente, se evaluó la suma de compuestos con un potencial efecto sinérgico (fitoestrógenos y parabenos) y la ratio entre elementos para los que se ha descrito un comportamiento antagónico (ratio cobre/zinc y ratio cobre/molibdeno). Las concentraciones urinarias fueron corregidas por la concentración de creatinina, cuantificada mediante la reacción de Jaffé. Los valores por debajo del LOQ fueron sustituidos por la mitad del LOQ.

Las características demográficas y reproductivas basales de las participantes fueron presentadas como medias +- rangos intercuartílicos (IQR) o porcentajes.

Las asociaciones entre las concentraciones de los metabolitos, modelados como terciles, y las características demográficas y reproductivas basales de las participantes fueron evaluadas empleando la prueba de Kruskal-Wallis para las variables continuas y la prueba de chi-cuadrado para las variables categóricas.

Se realizaron matrices de correlación de Spearman para examinar las relaciones entre las matrices biológicas para cada metabolito y de las diferentes familias de metabolitos para cada matriz biológica.

Se emplearon modelos Lineales Generalizados Mixtos multivariable con interceptos aleatorios para evaluar la asociación entre las concentraciones de compuestos en las distintas matrices biológicas y los resultados de FIV.

Estimamos las diferencias entre medias para la concentración de AMH y la concentración de estradiol el día del desencadenante especificando una distribución gaussiana con una función de enlace de identidad. Estimamos las diferencias medias empleando una distribución de Poisson con una función de enlace logarítmica para las variables de conteo discretas, como el número total de oocitos recuperados; la frecuencia relativa de oocitos maduros, para la que se aplicó como compensación el número total de ovocitos recuperados; la frecuencia relativa de embriones fecundados, para la que se aplicó como compensación el número de oocitos maduros; la frecuencia relativa de llegada a blastocisto, para la que se aplicó como compensación el número de embriones fecundados; y la frecuencia relativa de embriones euploides, para la que se empleó como compensación el número de blastocistos. Las concentraciones de analitos fueron modeladas como continuas, tras su transformación

logarítmica, y las asociaciones fueron obtenidas mediante la comparación de los incrementos entre los percentiles 20 y 80.

Por último, se utilizó una distribución binomial con función de enlace logit para calcular la probabilidad de los resultados clínicos (implantación, embarazo clínico y recién nacido vivo), respecto al número de pacientes que tuvieron transferencia embrionaria. Además, se calculó la probabilidad de nacido vivo respecto al total de tratamientos iniciados, como una variable denominada el éxito reproductivo. Estas asociaciones se calcularon como Odds Ratio con intervalos de confianza (CI) del 95%.

Para permitir una mejor interpretación de los resultados, se presentan las medias marginales de la población ajustadas para todas las covariables del modelo. Las variables medidas como posibles factores de confusión incluyeron factores previamente relacionados con los resultados de la FIV. Los modelos finales se ajustaron para la edad (continua), el IMC (continuo), la raza/etnicidad y el hábito de fumar (nunca, alguna vez). Se estableció un nivel de significación estadística de 0.05 para todas las pruebas.

De forma complementaria, las distintas variables del tratamiento de FIV fueron evaluadas empleando las concentraciones de analitos modeladas como terciles. En este caso las estimaciones fueron obtenidas tras la comparación de los dos terciles superiores con el inferior. Además, se calcularon modelos intermedios, tanto no ajustados como ajustados por edad (continua), el IMC (continuo) y la raza/etnicidad, para las concentraciones de analitos, modeladas tanto de forma continua como en forma de terciles.

Para facilitar la presentación de los resultados, tanto las asociaciones entre las concentraciones de analitos y las características demográficas y reproductivas basales como estos análisis complementarios se presentan en el Anexo 1.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R (versión 3.6.2). Se utilizó el paquete "tableone" para calcular las características demográficas y reproductivas generales de los participantes y sus diferencias entre los terciles de analitos (Yoshida and Bartel, 2021), el paquete "corrplot" para generar las matrices de correlación (Wei and Simko, 2021) y el paquete "questionr" para la estimación de las odds ratio a partir de los resultados del modelo binomial (Barnier *et al.*, 2022).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Características demográficas y reproductivas basales de las participantes

Las sesenta participantes tenían una edad media de 33.40 años [IQR: 31.37, 36.50] y un IMC de 23.87 kg/m² [IQR: 21.57, 26.30], eran predominantemente caucásicas (71.7%) y el 81.7% nunca había fumado (Tabla 9).

En cuanto a las características reproductivas, las participantes tenían una concentración media de AMH de 3.60 ng/mL [IQR: 2.49, 5.17]. Las dosis totales de FSH y LH administradas para la estimulación ovárica fueron, respectivamente, 2 100.00 UI [IQR: 1 800.00, 2 700.00] y 1 125.00 UI [IQR: 675.00, 1 443.75]. La mediana de estradiol en suero el día de la administración del desencadenante de ovulación fue de 3 750.65 pg/mL [IQR: 2 622.20, 5 204.62] (Tabla 9).

En conjunto, el número medio de oocitos recuperados fue de 17 [IQR: 11.00, 24.25], de los cuales el 77.47 ± 14.30% eran maduros. Las tasas de fecundación, llegada a blastocisto y euploidía fueron de 81.44 ± 16.29%, 55.62 ± 21.47% y 60.17 ± 23.72%, respectivamente. Para las 55/60 (91.7%) mujeres que se sometieron a una SET/FET, las tasas de implantación, embarazo clínico y nacidos vivos fueron del 80.0%, 69.1% y 63.6%, respectivamente. De las 60 mujeres que iniciaron el tratamiento de FIV, el 58.3% lograron un nacimiento vivo (Tabla 9).

Tabla 9. Características demográficas y reproductivas basales de las sesenta participantes

Características demográficas	
Edad (años), mediana [IQR]	33.40 [31.37 - 36.50]
Índice de masa corporal (kg/m ²), mediana [IQR]	23.87 [21.57 - 26.30]
Raza/Grupo étnico, n (%)	
<i>Caucásica</i>	43 (71.7%)
<i>Afro-Americana</i>	2 (3.3%)
<i>Asiática</i>	6 (10.0%)
<i>Hispana</i>	6 (10.0%)
<i>Otra</i>	3 (5.0%)
Nivel educativo, n (%)	
> <i>Instituto</i>	55 (94.8%)
Tabaquismo, n (%)	
<i>Nunca fumador</i>	49 (81.7%)
<i>Exfumador</i>	10 (16.7%)
<i>Fumador pasivo</i>	1 (1.7%)
Características reproductivas	
AMH sérica (ng/mL), mediana [IQR]	3.60 [2.49 - 5.17]
Protocolo de estimulación con antagonista de GnRH, n (%)	60 (100.0%)
Dosis total de FSH durante la estimulación (IU), mediana [IQR]	2 100.00 [1 800.00 – 2 700.00]
Dosis total de LH durante la estimulación (IU), mediana [IQR]	1 125.00 [675.00 – 1 443.75]
E2 sérico el día del desencadenante (pg/mL), mediana [IQR]	3 750.65 [2 622.20 – 5 204.62]
Número de oocitos recuperados, mediana [IQR]	17.00 [11.00 - 24.25]
Tasa de oocitos maduros, % media ± SD	77.47 ± 14.30 %
Tasa de fecundación, % media ± SD	81.44 ± 16.29%
Tasa de llegada a blastocisto, % mean ± SD	55.62 ± 21.47%
Tasa de euploidia, % mean ± SD	60.17 ± 23.72%
Tasa de transferencia embrionaria, n (%)	55 (91.7%)
Tasa de implantación (hCG positiva), n (%)	44 (80.0%)
Tasa de embarazo clínico, n (%)	38 (69.1%)
Tasa de recién nacido vivo, n (%)	35 (63.6%)
Tasa de éxito reproductivo, n (%)	35 (58.3%)

2. Impacto de las concentraciones de fitoestrógenos en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV

2.1. Distribución de los fitoestrógenos en las matrices biológicas

En la tabla 10 se presentan las distribuciones y los porcentajes por encima del límite de cuantificación de los fitoestrógenos en el líquido folicular y la orina obtenida el día de la punción ovárica. Se obtuvieron concentraciones cuantificables tanto de daidzeína como de genisteína en el 100% de las orinas evaluadas. En el caso del líquido folicular, se obtuvieron concentraciones cuantificables de daidzeína en el 53.6% de las muestras y de genisteína en el 78.6% de las mismas.

Tabla 10. Distribución de las concentraciones de fitoestrógenos en las muestras de líquido folicular y orina recogidos el día de la punción ovárica

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Líquido Folicular</i>								
Daidzeína (ng/mL)	0.25	53.60%	0.24 (2.96)	0.10	0.10	0.17	0.32	20.94
Genisteína (ng/mL)	0.25	78.60%	1.19 (9.11)	0.20	0.47	0.81	2.78	44.74
Σ Fitoestrógenos (ng/mL)	N/A	N/A	1.51 (11.44)	0.30	0.60	1.10	3.44	57.88
<i>Orina</i>								
Daidzeína (ng/mL)	0.25	100%	47.64 (685.16)	3.45	16.24	36.56	137.69	3725.67
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			54.69 (565.26)	3.74	7.84	23.64	47.32	124.80
Genisteína (ng/mL)	0.25	100%	38.83 (348.60)	0.81	10.91	43.79	101.73	2010.60
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			44.57 (281.26)	2.76	7.04	16.10	35.45	114.57
Σ Fitoestrógenos (ng/mL)	N/A	N/A	104.88 (916.19)	4.69	39.65	77.76	243.17	4395.50
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			120.41 (728.19)	9.71	42.37	100.90	253.55	3988.65

También se evaluó la asociación de cada fitoestrógeno y la suma de fitoestrógenos entre líquido folicular y orina, las dos matrices biológicas en las que fue analizado mediante coeficientes de correlación de Spearman. En general observamos fuertes correlaciones positivas entre ambas matrices biológicas para cada fitoestrógeno evaluado ($r = 0.72$ para la suma de fitoestrógenos, $r = 0.83$ para la daidzeína, y $r = 0.80$ para la genisteína) (Figura 11).

Dentro de cada matriz biológica evaluada, se observaron correlaciones positivas moderadas/altas entre las concentraciones de fitoestrógenos estudiadas y su suma (Figura 11).

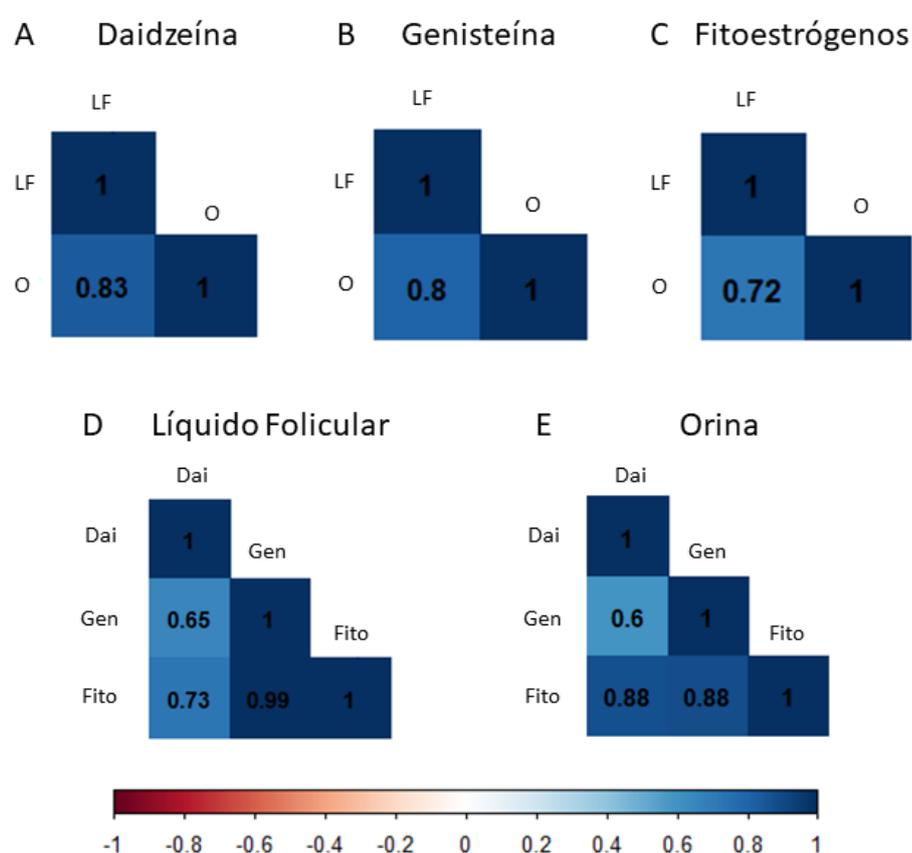


Figura 11. Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones entre los fitoestrógenos y las matrices biológicas. [A] Daidzeína (Dai), [B] Genisteína (Gen), [C] la suma de ambos fitoestrógenos (Fito), [D] líquido folicular (LF), [E] orina (O) obtenidos el día de la punción ovárica. El azul representa una correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de la correlación.

No se observaron diferencias en las variables demográficas, como la edad, el IMC, la raza/etnicidad, el nivel educativo o el tabaquismo, al comparar entre los terciles de daidzeína, genisteína o la suma de ambos fitoestrógenos, tanto en líquido folicular como en orina (Tabla S5). Asimismo, se observó una relación positiva entre los terciles tanto de daidzeína, genisteína y suma de ambos fitoestrógenos en líquido folicular con la concentración de estradiol el día del desencadenante y de genisteína y suma de ambos fitoestrógenos en líquido folicular y la tasa de éxito reproductivo (Tabla S5).

2.2. Asociación de las concentraciones de fitoestrógenos con variables de reserva ovárica

Tras evaluar la relación entre las concentraciones de fitoestrógenos en líquido folicular y orina obtenidos el día de la punción oocitaria con la concentración de AMH como marcador de reserva ovárica y observamos que, en los modelos ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, solamente una mayor concentración de genisteína en orina se asociada significativamente con mayor concentración de AMH (p20 vs p80 (95% CI): 3.28 (1.06, 10.20), p de tendencia = 0.040) (Tabla 11 y S6).

Tabla 11. Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de fitoestrógenos

	Concentración de AMH	
	p20 vs p80 (95% CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>		
Daidzeína	1.43 (0.75-2.76)	0.273
Genisteína	3.00 (0.84-10.74)	0.089
Σ Fitoestrógenos	2.51 (0.84-7.46)	0.097
<i>Orina</i>		
Daidzeína	1.45 (0.61-3.44)	0.389
Genisteína	3.28 (1.06-10.20)	0.040
Σ Fitoestrógenos	2.34 (0.84-6.52)	0.103

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.10 y 0.34 ng/mL para la daidzeína, 0.20 y 3.71 ng/mL para la genisteína, y 0.40 y 4.30 ng/mL para la suma de ambos fitoestrógenos cuantificados en el líquido folicular; y 21 y 145 µg/g CR para la daidzeína; 10 y 149 µg/g CR para la genisteína; 34 y 297 µg/g CR para la suma de ambos fitoestrógenos cuantificados en orina tras su corrección por creatinina.

2.3. Asociación de las concentraciones de fitoestrógenos con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV

A continuación trataremos los resultados de evaluar la relación entre las concentraciones de fitoestrógenos medidos en líquido folicular y orina obtenidos el día de la punción oocitaria con las variables de respuesta ovárica, entre las que se encuentra la concentración de estradiol el día de administración del desencadenante, número de oocitos totales recuperados y frecuencia relativa de oocitos maduros recuperados, y variables embriológicas del tratamiento de FIV, entre las que se encuentra la frecuencia relativa de embriones fecundados, frecuencia relativa de llegada a blastocisto y frecuencia relativa de embriones euploides.

En el caso de la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante de maduración oocitaria, en los modelos completamente ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo la diferencia de medias entre los percentiles 80 respecto al 20 (p20 vs 80) de las concentraciones de los distintos fitoestrógenos evaluados muestra un incremento estadísticamente significativo para la daidzeína, la genisteína y la suma de ambos fitoestrógenos en líquido folicular (p20 vs p80 (95% CI): 1.15 (1.00, 1.31), p de tendencia = 0.044; 1.41 (1.09, 1.82), p de tendencia = 0.010; 1.33 (1.07, 1.66), p de tendencia = 0.012, respectivamente) y la genisteína en orina (p20 vs p80 (95% CI): 1.29 (1.02, 1.63), p de tendencia = 0.040) (Tabla 12 y S6).

Respecto a la frecuencia relativa de oocitos maduros recuperados, en los modelos completamente ajustados se observa un incremento estadísticamente significativo asociado con el incremento de la concentración de daidzeína en ambas matrices biológicas (p20 vs p80 (95% CI): 1.16 (1.03, 1.31), p de tendencia = 0.017; 1.23 (1.06, 1.43), p de tendencia = 0.010, para el líquido folicular y la orina, respectivamente), y para la concentración de genisteína en orina (p20 vs p80 (95% CI): 1.31 (1.03, 1.66), p de tendencia = 0.030) (Tabla 12 y S6).

Tabla 12. Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de fitoestrógenos

	Concentración de E2 el día del desencadenante		Número de oocitos recuperados		Frecuencia relativa de oocitos maduros	
	p20 vs p80 (95% CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95% CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95% CI)	<i>p</i>
<i>Líquido Folicular</i>						
Daidzeína	1.15 (1.00-1.31)	0.044	1.10 (0.95-1.27)	0.195	1.16 (1.03-1.31)	0.017
Genisteína	1.41 (1.09-1.82)	0.010	1.13 (0.82-1.56)	0.456	1.23 (0.92-1.65)	0.166
Σ Fitoestrógenos	1.33 (1.07-1.66)	0.012	1.13 (0.86-1.48)	0.382	1.22 (0.96-1.56)	0.105
<i>Orina</i>						
Daidzeína	1.13 (0.95-1.35)	0.176	1.10 (0.91-1.34)	0.300	1.23 (1.06-1.43)	0.007
Genisteína	1.29 (1.02-1.63)	0.036	1.21 (0.92-1.59)	0.175	1.31 (1.03-1.66)	0.030
Σ Fitoestrógenos	1.23 (1.00-1.52)	0.054	1.17 (0.93-1.47)	0.188	1.30 (1.08-1.56)	0.007

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.10 y 0.34 ng/mL para la daidzeína, 0.20 y 3.71 ng/mL para la genisteína, y 0.40 y 4.30 ng/mL para la suma de ambos fitoestrógenos cuantificados en el líquido folicular; y 21 y 145 µg/g CR para la daidzeína; 10 y 149 µg/g CR para la genisteína; 34 y 297 µg/g CR para la suma de ambos fitoestrógenos cuantificados en orina tras su corrección por creatinina.

Finalmente, en los modelos completamente ajustados se observa un incremento estadísticamente significativo de la frecuencia relativa de embriones fecundados asociado con la concentración de daidzeína en ambas matrices biológicas (p20 vs p80 (95% CI): 1.19 (1.05, 1.35), *p* de tendencia = 0.009; 1.27 (1.09, 1.48), *p* de tendencia = 0.003, para el líquido folicular y la orina, respectivamente), y la concentración de genisteína y la suma de ambos fitoestrógenos en la orina (p20 vs p80 (95% CI): 1.34 (1.05, 1.72), *p* de tendencia = 0.02; 1.34 (1.10, 1.62), *p* de tendencia = 0.004, respectivamente) (Tabla 13 y S6).

Tabla 13. Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de fitoestrógenos

	Frecuencia relativa de embriones fecundados		Frecuencia relativa de llegada a blastocisto		Frecuencia relativa de embriones euploides	
	p20 vs p80 (95% CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Follicular</i>						
Daidzeína	1.19 (1.05-1.35)	0.009	1.11 (0.97-1.27)	0.134	1.04 (0.89-1.21)	0.604
Genisteína	1.28 (0.94-1.75)	0.112	1.12 (0.82-1.52)	0.481	1.00 (0.71-1.40)	0.997
Σ Fitoestrógenos	1.27 (0.98-1.64)	0.066	1.12 (0.86-1.45)	0.388	1.02 (0.77-1.35)	0.903
<i>Orina</i>						
Daidzeína	1.27 (1.09-1.48)	0.003	1.12 (0.95-1.32)	0.171	1.07 (0.89-1.28)	0.450
Genisteína	1.34 (1.05-1.72)	0.020	1.21 (0.94-1.56)	0.133	1.14 (0.86-1.51)	0.352
Σ Fitoestrógenos	1.34 (1.10-1.62)	0.004	1.17 (0.95-1.43)	0.133	1.12 (0.89-1.40)	0.320

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.10 y 0.34 ng/mL para la daidzeína, 0.20 y 3.71 ng/mL para la genisteína, y 0.40 y 4.30 ng/mL para la suma de ambos fitoestrógenos cuantificados en el líquido folicular; y 21 y 145 µg/g CR para la daidzeína; 10 y 149 µg/g CR para la genisteína; 34 y 297 µg/g CR para la suma de ambos fitoestrógenos cuantificados en orina tras su corrección por creatinina.

2.4. Asociación de las concentraciones de fitoestrógenos con los resultados clínicos del tratamiento de FIV

Evaluamos la asociación entre la daidzeína, la genisteína y la suma de concentraciones de fitoestrógenos en líquido folicular y orina con las variables clínicas del tratamiento de FIV, implantación, embarazo clínico y recién nacido vivo relativizados a los tratamientos en los que hubo transferencia embrionaria, y éxito reproductivo, calculado como los recién nacidos vivos relativizados al total de tratamientos iniciados (Figura 12, Tabla S7).

En los modelos completamente ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, mayor concentración de fitoestrógenos en líquido folicular se asoció con un incremento significativo de la probabilidad de implantación (OR (95% CI): 2.57 (1.19, 7.74), p valor: 0.045), embarazo clínico (OR (95% CI): 2.05 (1.16, 4.38), p valor: 0.031), recién nacido vivo (OR (95% CI): 2.07 (1.21, 4.12), p valor: 0.018), y éxito reproductivo (OR (95% CI): 1.88 (1.18, 3.29), p valor: 0.015) (Figura 12, Tabla S7). Al evaluar cada fitoestrógeno individualmente en líquido folicular, en los modelos completamente ajustados se observó una asociación positiva estadísticamente significativa para la concentración de genisteína en el caso de la probabilidad

de implantación (OR (95% CI): 2.27 (1.15, 5.8), p valor: 0.043), y embarazo clínico (OR (95% CI): 1.91 (1.13, 3.75), p valor: 0.030); y para ambos fitoestrógenos en el caso de la probabilidad de recién nacido vivo (OR (95% CI): 2.51 (1.24, 6.76), p valor: 0.031); 1.95 (1.18, 3.63), p valor: 0.018, para daidzeína y genisteína, respectivamente) y éxito reproductivo (OR (95% CI): 2.33 (1.23, 5.44), p valor: 0.024); 1.78 (1.16, 2.97), p valor: 0.015, para daidzeína y genisteína, respectivamente) (Figura 12, Tabla S7).

En el caso de la orina, se observó un incremento estadísticamente significativo para la probabilidad de embarazo clínico (OR (95% CI): 1.73 (1.06, 3.18), p valor: 0.047), recién nacido vivo (OR (95% CI): 1.73 (1.06, 3.18), p valor: 0.047), y éxito reproductivo (OR (95% CI): 1.65 (1.05, 2.8), p valor: 0.043); aunque la concentración de ninguno de los fitoestrógenos individualmente se asoció con este incremento de los resultados clínicos de FIV en los modelos completamente ajustados (Figura 12, Tabla S7).

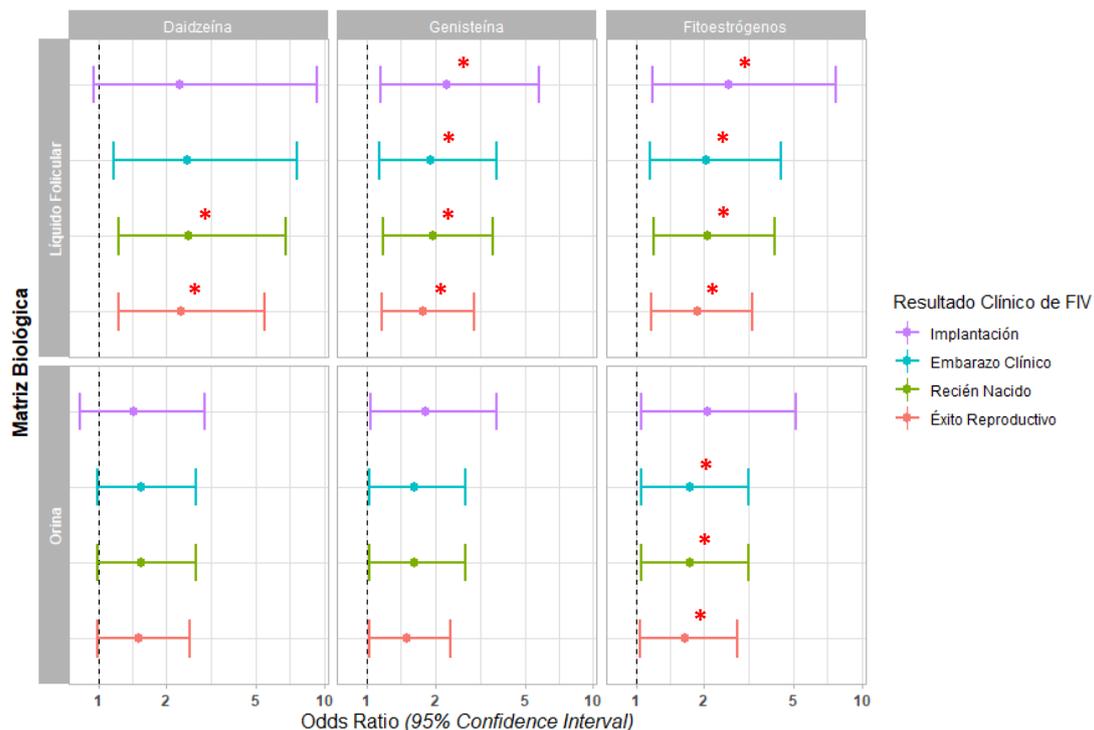


Figura 12. Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de fitoestrógenos y los resultados clínicos de FIV. Las asociaciones se representan por sus Odds Ratio con intervalos de confianza del 95% a partir de modelo ajustados por edad, ICM, raza/etnicidad y tabaquismo, para cada uno de los compuestos en líquido folicular y orina obtenidos el día de la punción ovárica. Los resultados incluyen probabilidad de implantación, embarazo clínico y nacimiento de un recién nacido vivo en aquellas participantes que tuvieron transferencia de un solo embrión congelado y la probabilidad de nacimiento de un recién nacido vivo en todas las participantes (éxito reproductivo). Las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representan con un asterisco rojo.

3. Impacto de las concentraciones de parabenos en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV

3.1. Distribución de los parabenos en las matrices biológicas

Las distribuciones y los porcentajes por encima del límite de cuantificación de los parabenos en líquido folicular y orina, obtenidos el día de la punción ovárica, se presentan en la tabla 14. Se obtuvieron concentraciones cuantificables de M-parabeno en el 100% de las orinas y en el 83.9% de los líquidos foliculares. Por el contrario, el P-parabeno pudo ser detectable en el 98.3% de las orinas y solo en el 7.1% de los líquidos foliculares (Tabla 14). Por este motivo, descartamos las concentraciones de P-parabeno del resto de los análisis.

Tabla 14. Distribución de las concentraciones de parabenos en las muestras de líquido folicular y orina recogidos el día de la punción ovárica

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Líquido Folicular</i>								
P-Parabeno (ng/mL)	0.1	7.1%	0.055 (0.042)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.26
M-Parabeno (ng/mL)	0.1	83.9%	0.517 (2.619)	0.05	0.21	0.50	1.14	13.31
Σ Parabenos (ng/mL)			0.636 (2.616)	0.10	0.26	0.57	1.35	13.36
<i>Orina</i>								
P-Parabeno (ng/mL)	0.1	98.3%	2.05 (45.77)	0.05	0.34	1.14	14.04	289.63
<i>Corrección por creatinina (μg/g CR)</i>			2.35 (33.52)	0.04	0.26	0.44	1.330	10.48
M-Parabeno (ng/mL)	0.1	100%	16.29 (654.28)	0.90	4.21	12.79	59.86	4985.53
<i>Corrección por creatinina (μg/g CR)</i>			18.7 (290.76)	1.77	3.10	5.41	15.49	48.520
Σ Parabenos (ng/mL)			20.67 (658.55)	1.03	5.00	14.88	74.15	4988.24
<i>Corrección por creatinina (μg/g CR)</i>			23.74 (295.6)	1.99	6.47	18.52	85.62	2213.85

Al evaluar los coeficientes de correlación de Spearman para cada parabeno estudiado y la suma de parabenos entre las dos matrices biológicas en las que fueron analizados, líquido folicular y orina; observamos correlaciones positivas moderadas entre ambas matrices biológicas ($r = 0.38$ para la suma de parabenos, $r = 0.37$ para M-Parabeno y $r = 0.45$ para P-Parabenos) (Figura 13).

Tras analizar las correlaciones dentro de cada matriz, se observó, tanto en líquido folicular como en orina, una correlación muy alta entre el M-parabeno y la suma de parabenos ($r = 0.99$ en el líquido folicular y $r = 0.98$ en orina). Por el contrario, en líquido folicular no existía correlación entre el P-parabeno y el M-parabeno y la suma de parabenos. En orina la correlación fue moderada-alta ($r = 0.68$ de P-parabeno con M-parabeno y $r = 0.75$ de P-parabeno con la suma de ambos parabenos) (Figura 13).

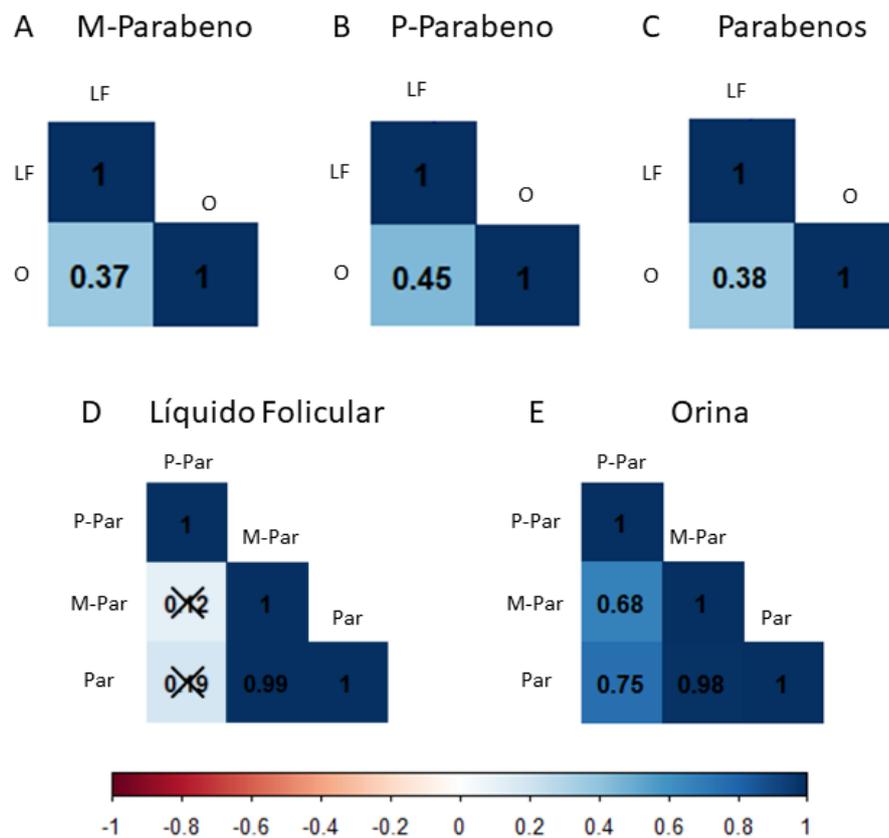


Figura 13. Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones entre los parabenos y las matrices biológicas. [A] P-parabeno (P-Par), [B] M-parabeno (M-Par), [C] la suma de ambos parabenos (Par), [D] líquido folicular (LF), [E] orina (O) obtenidos el día de la punción ovárica. El azul representa una correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de la correlación. Los valores tachados representan asociaciones no significativas ($p > 0,05$).

No se observaron diferencias en las variables demográficas, como la edad, IMC, la raza/etnicidad, el nivel educativo o el tabaquismo, al comparar entre los terciles de M-parabeno, P-parabeno o suma de parabenos, tanto en líquido folicular como en orina (Tabla S8). Asimismo, tampoco se observaron asociaciones entre los terciles crecientes de estos compuestos y los resultados reproductivos de las participantes (Tabla S8).

3.2. Asociación de las concentraciones de parabenos con variables de reserva ovárica

Evaluamos la relación entre las concentraciones de parabenos en líquido folicular y orina obtenidos el día de la punción oocitaria con la concentración de AMH como marcador de reserva ovárica y observamos que, en los modelos ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, no se observó ninguna asociación para la suma de concentraciones de parabenos ni de los compuestos por separado, tanto en líquido folicular como en orina, con la concentración de AMH (Tabla 15).

Tabla 15. Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de parabenos

	Concentración de AMH	
	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>		
M-parabeno	1.35 (0.47, 3.87)	0.565
∑ Parabenos	1.31 (0.44, 3.93)	0.622
<i>Orina</i>		
M-parabeno	0.89 (0.25, 3.14)	0.854
P-parabeno	0.59 (0.18, 1.96)	0.378
∑ Parabenos	0.79 (0.23, 2.75)	0.711

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.20 y 2.23 ng/mL para la M-parabeno, y 0.25 y 2.28 ng/mL para la suma de ambos parabenos cuantificados en el líquido folicular; y 0.42 y 21.36 µg/g CR para la P-parabeno; 4.68 y 79.07 µg/g CR para la M-parabeno; 5.12 y 96.12 µg/g CR para la suma de ambos parabenos cuantificados en orina tras su corrección por creatinina.

3.3. Asociación de las concentraciones de parabenos con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV

En los modelos completamente ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, no se observaron asociaciones entre las concentraciones de M-parabeno, P-parabeno y la suma de ambos parabenos, tanto en líquido folicular como en la orina obtenida el día de la punción folicular, con las variables de respuesta ovárica ni con las variables embriológicas del tratamiento de FIV en nuestra población de estudio (Tablas 16 y 17). En concreto, no se observaron asociaciones significativas dosis-respuesta entre las concentraciones de parabenos con las concentraciones de estradiol el día del desencadenante, número de oocitos

recuperados, frecuencia relativa de oocitos maduros, frecuencia relativa de embriones fecundados, frecuencia relativa de llegada a blastocisto, ni frecuencia relativa de embriones euploides. Se observó la misma tendencia tanto en los modelos no ajustados como cuando se ajustaron por edad, IMC y raza/etnicidad, solos o junto al estado de tabaquismo (Tabla S9).

Tabla 16. Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de parabenos

	Concentración de E2 el día del desencadenante		Número de oocitos recuperados		Frecuencia relativa de oocitos maduros	
	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>
<i>Líquido Folicular</i>						
M-Parabeno	1.02 (0.82, 1.28)	0.828	1.03 (0.79, 1.35)	0.804	1.07 (0.84, 1.37)	0.570
∑ Parabenos	1.03 (0.82, 1.30)	0.774	1.05 (0.80, 1.38)	0.705	1.10 (0.85, 1.42)	0.457
<i>Orina</i>						
M-Parabeno	1.07 (0.82, 1.39)	0.615	1.02 (0.75, 1.38)	0.909	1.01 (0.76, 1.35)	0.924
P-Parabeno	1.03 (0.80, 1.33)	0.791	0.89 (0.66, 1.21)	0.462	0.94 (0.70, 1.27)	0.689
∑ Parabenos	1.06 (0.82, 1.37)	0.646	0.99 (0.73, 1.34)	0.950	1.00 (0.75, 1.33)	0.989

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.20 y 2.23 ng/mL para la M-parabeno, y 0.25 y 2.28 ng/mL para la suma de ambos parabenos cuantificados en el líquido folicular; y 0.42 y 21.36 µg/g CR para la P-parabeno; 4.68 y 79.07 µg/g CR para la M-parabeno; 5.12 y 96.12 µg/g CR para la suma de ambos parabenos cuantificados en orina tras su corrección por creatinina.

Tabla 17. Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de parabenos

	Frecuencia relativa de embriones fecundados		Frecuencia relativa de llegada a blastocisto		Frecuencia relativa de embriones euploides	
	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>
<i>Líquido Folicular</i>						
M-Parabeno	1.11 (0.86, 1.44)	0.417	1.00 (0.78, 1.30)	0.972	1.22 (0.94, 1.56)	0.126
∑ Parabenos	1.14 (0.88, 1.48)	0.311	1.02 (0.78, 1.33)	0.896	1.23 (0.95, 1.58)	0.112
<i>Orina</i>						
M-Parabeno	1.08 (0.81, 1.45)	0.581	1.09 (0.82, 1.46)	0.548	1.07 (0.79, 1.46)	0.647
P-Parabeno	1.01 (0.74, 1.39)	0.940	1.08 (0.79, 1.48)	0.614	1.00 (0.71, 1.40)	0.993
∑ Parabenos	1.08 (0.80, 1.45)	0.615	1.11 (0.83, 1.49)	0.475	1.07 (0.79, 1.46)	0.657

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.20 y 2.23 ng/mL para la M-parabeno, y 0.25 y 2.28 ng/mL para la suma de ambos parabenos cuantificados en el líquido folicular; y 0.42 y 21.36 µg/g CR para la P-parabeno; 4.68 y 79.07 µg/g CR para la M-parabeno; 5.12 y 96.12 µg/g CR para la suma de ambos parabenos cuantificados en orina tras su corrección por creatinina.

3.4. Asociación de las concentraciones de parabenos con los resultados clínicos del tratamiento de FIV

Al evaluar la asociación entre las concentraciones de parabenos y la suma de los mismos en líquido folicular y orina obtenida el día de la punción ovárica con las variables clínicas del tratamiento de FIV, en los modelos ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, no se observó ninguna asociación con la probabilidad de implantación, embarazo clínico, recién nacido vivo ni éxito reproductivo (Figura 14, Tabla S10). La misma ausencia de asociación fue observada tanto en los modelos no ajustados como tras el ajuste por edad, IMC y raza/etnicidad (Tabla S10).

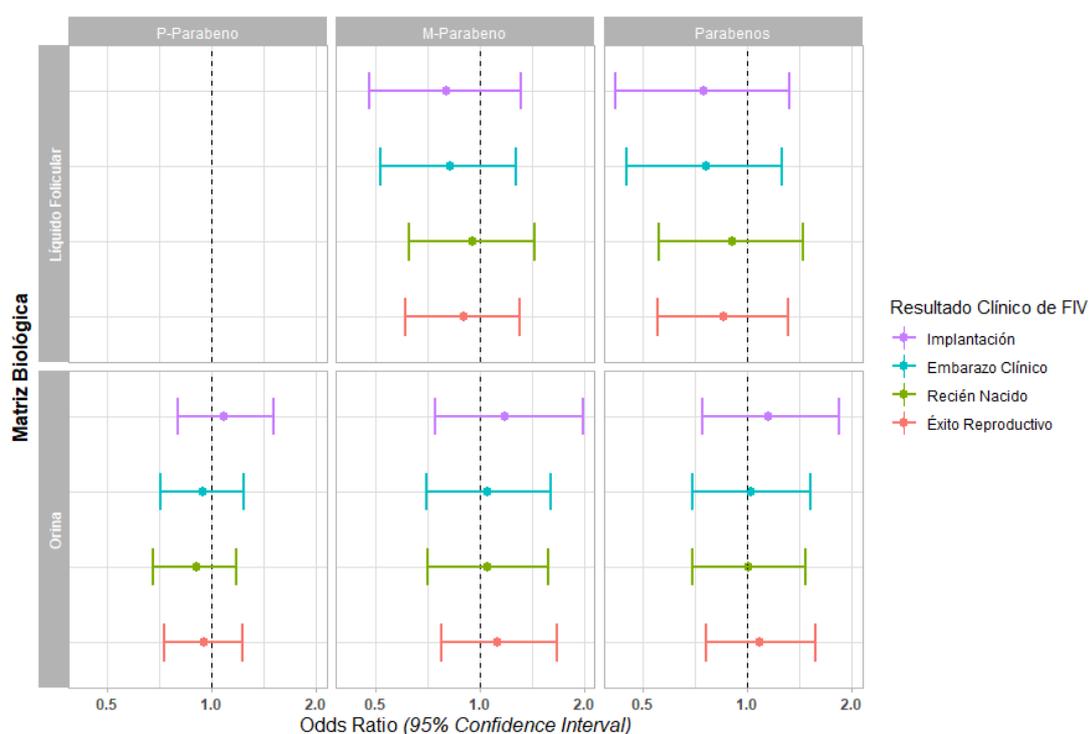


Figura 14. Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de parabenos y los resultados clínicos de FIV. Las asociaciones se representan por sus Odds Ratio con intervalos de confianza del 95% a partir de modelo ajustados por edad, ICM, raza/etnicidad y tabaquismo, para cada uno de los compuestos en líquido folicular y orina obtenidos el día de la punción ovárica. Los resultados incluyen probabilidad de implantación, embarazo clínico y nacimiento de un recién nacido vivo en aquellas participantes que tuvieron transferencia de un solo embrión congelado y la probabilidad de nacimiento de un recién nacido vivo en todas las participantes (éxito reproductivo). Las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representan con un asterisco rojo.

4. Impacto de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV

4.1. Distribución del metabolito de ftalato MEHP en las matrices biológicas

En la tabla 18 se presentan los porcentajes por encima del límite de cuantificación y las distribuciones del metabolito de ftalato MEHP en el líquido folicular y orina. Este compuesto fue cuantificado en el 100% de las muestras de orina y solo en el 3.6% de las muestras de líquido folicular, por lo que la concentración de MEHP en líquido folicular fue excluida de los subsiguientes análisis.

Tabla 18. Distribución de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en las muestras de líquido folicular y orina recogidos el día de la punción ovárica

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Líquido Folicular</i>								
MEHP (ng/mL)	0.1	3.6%	0.051 (0.012)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.14
<i>Orina</i>								
MEHP (ng/mL)	0.1	96.5%	0.39 (0.65)	0.05	0.25	0.35	0.70	4.60
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			0.46 (1.03)	0.01	0.14	0.22	0.46	0.98

Cuando analizamos el coeficiente de correlación de Spearman para la concentración de MEHP entre líquido folicular y orina obtenida el día de la punción ovárica, no observamos ninguna asociación.

Al evaluar las variables demográficas y reproductivas en relación con la concentración de MEHP modelada como terciles, observamos que las mujeres en el tercil superior tenían menor probabilidad de éxito reproductivo que las menos expuestas (Tabla S11).

4.2. Asociación de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP con variables de reserva ovárica

Evaluamos la relación entre las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en la orina obtenida el día de la punción oocitaria con la concentración de AMH como marcador de reserva ovárica y observamos que, en los modelos ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, no se observaba ninguna asociación con la concentración de AMH (Tabla 19).

Tabla 19. Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP

	Concentración de AMH	
	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Orina</i>		
MEHP	0.79 (0.26, 2.38)	0.674

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.18 y 1.11 µg/g CR para MEHP cuantificado en orina tras su corrección por creatinina.

4.3. Asociación de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV

Respecto a la relación entre las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en la orina obtenida el día de la punción oocitaria con variables de respuesta ovárica, entre las que se encuentra la concentración de estradiol el día de administración del desencadenante, número de oocitos totales recuperados y frecuencia relativa de oocitos maduros recuperados, y variables embriológicas del tratamiento de FIV, entre las que se encuentra la frecuencia relativa de embriones fecundados, frecuencia relativa de llegada a blastocisto y frecuencia relativa de embriones euploides, no se observaron asociaciones con las variables de respuesta ovárica ni con las variables embriológicas del tratamiento de FIV (Tablas 20 y 21). Se observó la misma tendencia tanto en los modelos no ajustados como cuando se ajustaron por edad, IMC y raza/etnicidad, solos o junto al hábito de tabaquismo (Tabla S12).

Tabla 20. Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP

	Concentración de E2 el día del desencadenante		Número de oocitos recuperados		Frecuencia relativa de oocitos maduros	
	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Orina</i>						
MEHP	0.88 (0.70, 1.10)	0.249	0.91 (0.70, 1.19)	0.485	0.94 (0.73, 1.22)	0.638

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.18 y 1.11 µg/g CR para MEHP cuantificado en orina tras su corrección por creatinina.

Tabla 21. Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP

	Frecuencia relativa de embriones fecundados		Frecuencia relativa de llegada a blastocisto		Frecuencia relativa de embriones euploides	
	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>
<i>Orina</i>						
MEHP	0.92 (0.70, 1.20)	0.519	0.95 (0.72, 1.26)	0.706	1.10 (0.81, 1.51)	0.528

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 0.18 y 1.11 µg/g CR para MEHP cuantificado en orina tras su corrección por creatinina.

4.4. Asociación de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP con los resultados clínicos del tratamiento de FIV

Tras examinar la relación entre las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP en orina obtenida el día de la punción ovárica con las variables clínicas del tratamiento de FIV, tras el ajuste por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, una mayor concentración de MEHP en orina se asoció significativamente con menor probabilidad de recién nacido vivo (OR (95% CI): 0.48 (0.22, 0.92), *p* valor: 0.040), y de éxito reproductivo (OR (95% CI): 0.46 (0.23, 0.82), *p* valor: 0.015) (Figura 15, Tabla S13).

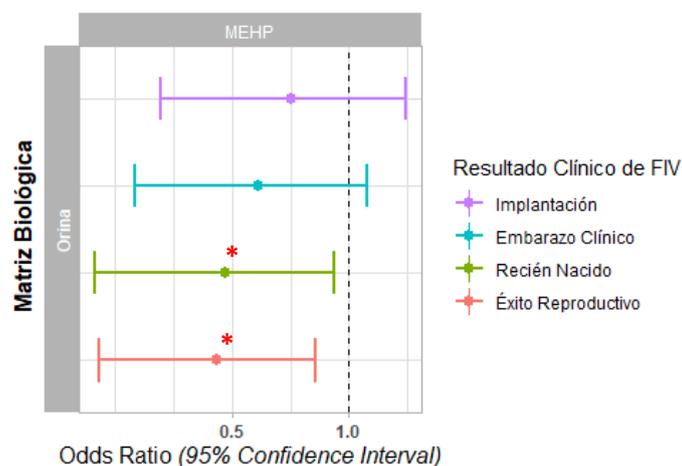


Figura 15. Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP y los resultados clínicos de FIV. Las asociaciones se representan por sus Odds Ratio con intervalos de confianza del 95% a partir de modelo ajustados por edad, ICM, raza/etnicidad y tabaquismo, para cada uno de los compuestos en orina obtenidas el día de la punción ovárica. Los resultados incluyen probabilidad de implantación, embarazo clínico y nacimiento de un recién nacido vivo en aquellas participantes que tuvieron transferencia de un solo embrión congelado y la probabilidad de nacimiento de un recién nacido vivo en todas las participantes (éxito reproductivo). Las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representan con un asterisco rojo.

5. Impacto de las concentraciones de elementos traza esenciales en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV

5.1. Distribución de los elementos traza esenciales en las matrices biológicas

En la tabla 22 se presentan los porcentajes por encima del límite de cuantificación y las distribuciones de elementos traza esenciales en el líquido folicular, el plasma y la orina, obtenidos el día de la punción ovárica. Elementos traza esenciales con un porcentaje de detección inferior al 50%, como el molibdeno en plasma y el cromo y manganeso en líquido folicular y orina, fueron excluidos de los subsiguientes análisis.

Tabla 22. Distribución de las concentraciones de elementos traza esenciales en las muestras de líquido folicular, plasma y orina recogidos el día de la punción ovárica

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Líquido Folicular</i>								
Cobre (Cu) (ng/mL)	N/A	100%	974.35 (277.76)	535.00	825.00	966.50	1210.00	1970.00
Zinc (Zn) (ng/mL)	N/A	100%	383.49 (109.60)	81.71	340.98	392.43	454.23	690.00
Ratio Cu/Zn			2.54 (1.39)	1.17	2.14	2.54	2.94	11.60
Molibdeno (Mo) (ng/mL)	1	68%	1.06 (0.60)	0.50	0.50	1.22	1.71	2.50
Ratio Cu/Mo			935.95 (745.88)	377.50	564.70	898.84	1525.00	3940.00
Litio (Li) (ng/mL)	1	82%	1.34 (1.98)	0.50	1.10	1.35	1.78	13.00
Selenio (Se) (ng/mL)	N/A	100%	66.30 (14.09)	31.00	60.50	69.00	73.50	111.00
Hierro (Fe) (ng/mL)	N/A	100%	539.37 (535.84)	278.00	429.46	487.60	598.32	3455.00
Cromo (Cr) (ng/mL)	1	50%	2.65 (11.56)	0.50	0.50	0.84	12.50	62.36
Manganeso (Mn) (ng/mL)	1	40.4%	0.76 (0.51)	0.50	0.50	0.50	1.20	2.20
<i>Plasma</i>								
Cobre (Cu) (ng/mL)	N/A	100%	1241.62 (274.66)	801.41	1107.79	1279.68	1434.14	2030.92
Zinc (Zn) (ng/mL)	N/A	100%	960.58 (150.10)	714.03	847.36	962.61	1062.44	1281.21
Ratio Cu/Zn			1.293 (0.346)	0.67	1.09	1.33	1.61	2.13
Molibdeno (Mo) (ng/mL)	5	28.1%	3.29 (2.20)	2.50	2.50	2.50	5.26	11.64
Ratio Cu/Mo			379.31 (170.55)	112.45	277.92	452.52	550.59	812.37
Litio (Li) (ng/mL)	5	91.5%	5.91 (1.42)	2.50	5.72	6.27	6.71	10.08
Selenio (Se) (ng/mL)		100%	99.43 (18.20)	60.90	91.53	99.08	106.56	185.52
Cromo (Cr) (ng/mL)	5	52.5%	5.24 (8.14)	2.50	2.50	5.36	8.92	52.36
Manganeso (Mn) (ng/mL)	5	54.2%	4.3 (5.10)	2.50	2.50	4.12	7.05	38.86

Tabla 22. Distribución de las concentraciones de elementos traza esenciales en las muestras de líquido folicular, plasma y orina recogidos el día de la punción ovárica (Continuación)

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Orina</i>								
Cobre (Cu) (ng/mL)	5	94.8%	5.38 (5.65)	0.25	2.68	6.60	11.35	25.55
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			6.18 (6.52)	0.14	1.96	4.68	8.23	10.49
Zinc (Zn) (ng/mL)	50	94.8%	270.87 (354.78)	25.00	158.63	303.77	494.93	1726.10
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			310.95 (635.96)	26.84	138.93	204.58	323.81	473.12
Ratio Cu/Zn			0.02 (0.053)	0.00	0.01	0.02	0.04	0.31
Molibdeno (Mo) (ng/mL)	5	98.3%	46.25 (51.62)	2.50	34.50	53.81	81.08	311.68
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			53.09 (43.55)	12.04	24.66	38.24	54.24	74.78
Ratio Cu/Mo			0.116 (0.182)	0.01	0.08	0.13	0.18	1.02
Litio (Li) (ng/mL)	5	98.3%	23.32 (28.16)	2.50	13.72	23.26	36.81	173.50
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			26.77 (26.89)	8.37	12.82	17.13	25.66	35.21
Selenio (Se) (ng/mL)	N/A	100%	39.74 (30.55)	4.32	32.35	44.49	63.95	157.56
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			45.62 (27.53)	17.30	27.04	35.89	40.92	58.08
Hierro (Fe) (ng/mL)	5	93.1%	19.22 (46.12)	2.50	19.00	27.00	27.50	365.24
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			22.07 (243.62)	1.44	5.15	12.69	20.83	37.08
Cromo (Cr) (ng/mL)	0.5	43.1%	0.41 (0.58)	0.25	0.25	0.25	0.65	3.54
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			0.47 (0.8)	0.070	0.130	0.230	0.460	0.800
Manganeso (Mn) (ng/mL)	0.5	8.6%	0.28 (0.16)	0.25	0.25	0.25	0.25	1.11
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			0.32 (0.65)	0.07	0.13	0.18	0.25	0.47

Al evaluar los coeficientes de correlación de Spearman para los elementos traza esenciales entre las diferentes matrices biológicas en las que fueron evaluados, líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica, hemos identificado correlaciones positivas moderadas/altas para algunos oligoelementos entre el líquido folicular y el plasma (Figura 16). Concretamente, observamos estas asociaciones para el cobre ($r=0.66$), la ratio Cu/Zn ($r=0.73$), el selenio ($r=0.44$), el cromo ($r=0.41$) y la ratio Cu/Mo ($r=0.39$). Por el contrario, no se observaron asociaciones entre las concentraciones de elementos traza esenciales en estos dos biofluidos y la orina, excepto en el caso del litio, para el que se observó una concentración moderada entre la concentración en líquido folicular y en orina ($r=0.4$) (Figura 16).

También evaluamos los coeficientes de correlación de Spearman entre los elementos traza esenciales evaluados para cada una de las matrices biológicas. Para el líquido folicular y el plasma, observamos principalmente correlaciones entre el cobre, el zinc y el molibdeno con sus ratios derivados, siendo moderadamente positivas para el cobre con la ratio Cu/Mo ($r=0.36$) y el cobre con el zinc ($r=0.57$) en el líquido folicular; y para el cobre con la ratio Cu/Zn ($r=0,8$) y Cu/Mo ($r=0.53$) y de ambas ratios entre sí ($r=0.47$) para el plasma. Por el contrario, observamos asociaciones negativas altas/moderadas en estas matrices biológicas para el zinc con la relación Cu/Zn ($r=-0.34$, $r=-0.57$ para el líquido folicular y el plasma, respectivamente) y para el molibdeno con la relación Cu/Mo ($r=-0.91$, $r=-0.79$ para el líquido folicular y el plasma, respectivamente) (Figura 17).

En cuanto a la orina obtenida el día de punción ovárica, de forma general observamos correlaciones moderadas/altas entre los elementos traza esenciales evaluados (Figura 17).

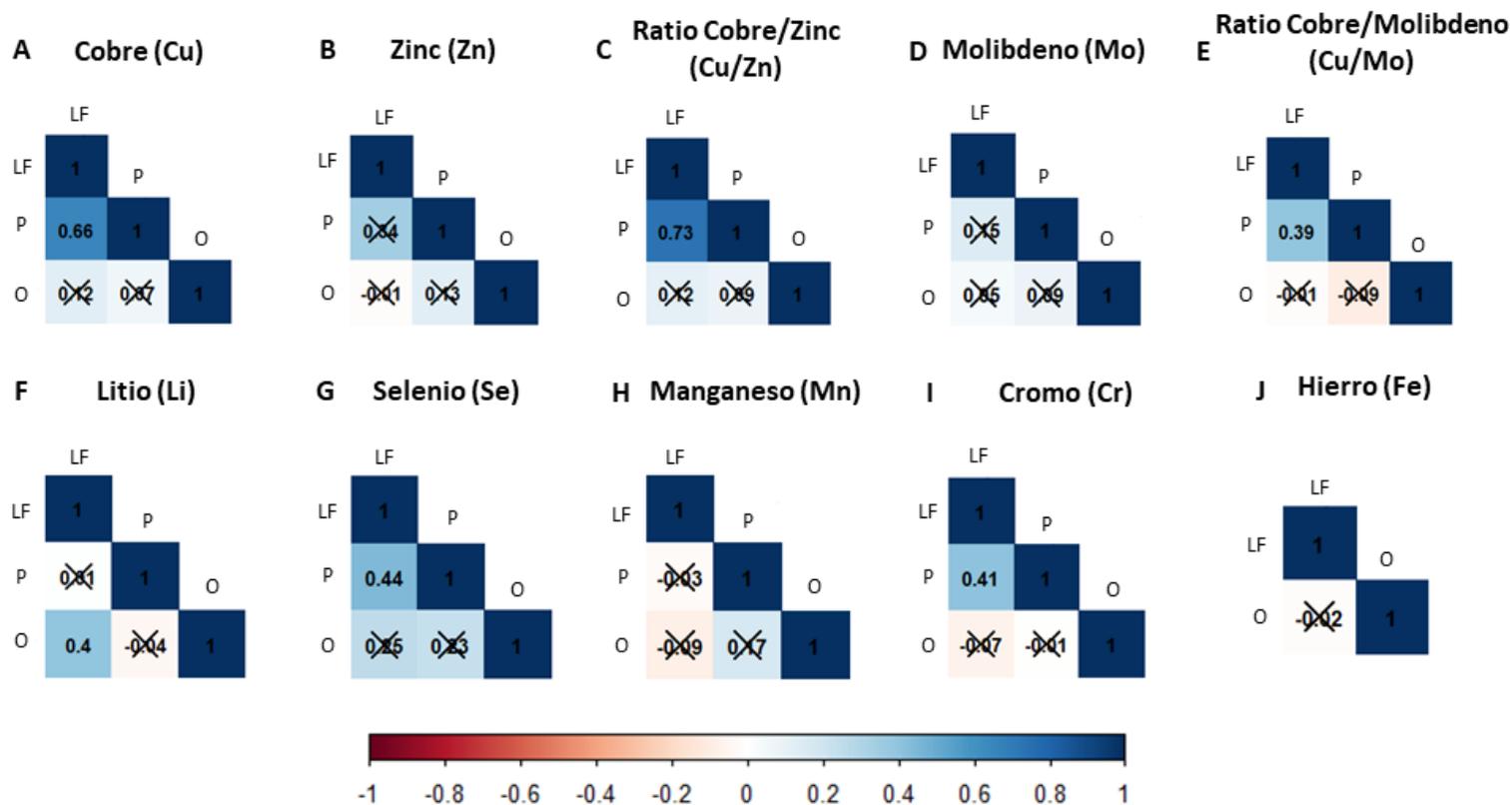


Figura 16. Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza esenciales entre las matrices biológicas. Elementos traza esenciales en líquido folicular (LF), plasma (P) y orina (O) obtenidos el día de la punción ovárica. El azul representa una correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de la correlación. Los valores tachados representan asociaciones no significativas ($p > 0,05$).

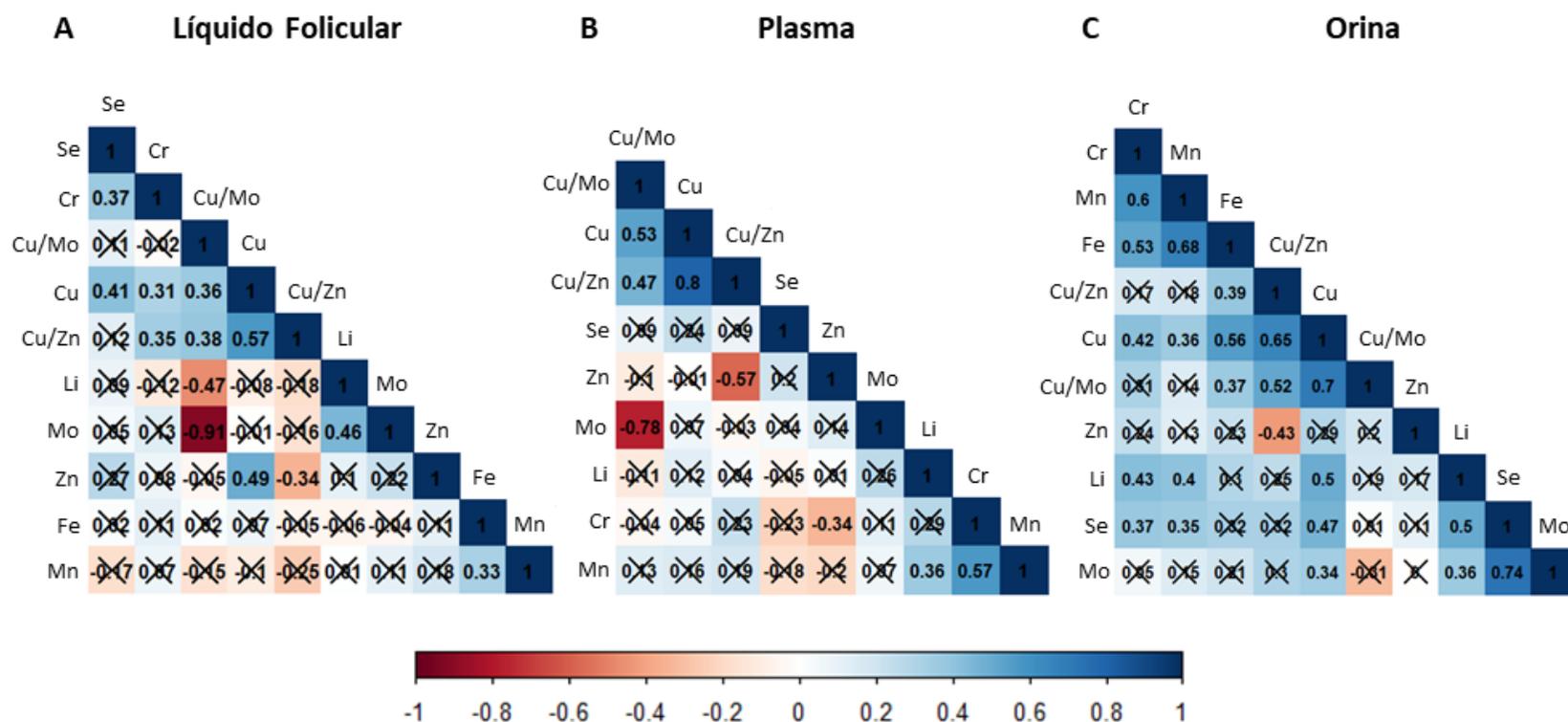


Figura 17. Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza esenciales para cada matriz biológica. [A] Líquido Folicular, [B] Plasma, y [C] Orina. El azul representa una correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de la correlación. Los valores tachados representan asociaciones no significativas ($p > 0,05$).

Se observaron diferencias ligeras e inconsistentes para las variables demográficas en la comparación entre terciles de metales traza esenciales para las diferentes matrices biológicas evaluadas. En particular, se ha observado que las participantes en el tercil superior de molibdeno en líquido folicular tenían mayores probabilidades de no tener estudios superiores a educación secundaria, mientras que las participantes en el tercil superior de zinc tenían más probabilidades de ser más delgadas (Tabla S14). Además, en estos análisis exploratorios comienzan a ser identificables relaciones entre los elementos traza evaluados y los resultados del tratamiento de FIV. En resumen, se observa un mayor número de oocitos recuperados a medida que se incrementa la concentración de cobre en el líquido folicular y en el plasma y la concentración de selenio y la ratio cobre/zinc en líquido folicular. Además, en los terciles superiores de cobre y de ratio cobre/zinc en el líquido folicular se observa una mayor concentración de estradiol el día del desencadenante, mientras que esta disminuye al aumentar la concentración de manganeso en plasma. También en plasma, mayores concentraciones de zinc se asocian con una mayor proporción de ovocitos fecundados y menor proporción de embriones euploides. Por el contrario, una mayor ratio cobre/zinc en plasma se relaciona con mayor proporción de embriones euploides. Por último, una mayor concentración de molibdeno en orina se asocia con una menor tasa de implantación y menor proporción de recién nacidos vivos (Tabla S14).

5.2. Asociación de las concentraciones de elementos traza esenciales con variables de reserva ovárica

Evaluamos la relación entre las concentraciones de elementos traza esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción oocitarias con la concentración de AMH como marcador de reserva ovárica.

En los modelos multivariable ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, el incremento de la concentración de cobre en líquido folicular y plasma se asoció significativamente con un incremento de la concentración de AMH (p20 vs p80 (95% CI): 4.22 (1.34, 13.25), p de tendencia = 0.015 y p20 vs p80 (95% CI): 4.04 (1.31, 12.50), p de tendencia = 0.016, para líquido folicular y plasma respectivamente). También se observó una asociación positiva estadísticamente significativa para la ratio entre las concentraciones de cobre y zinc (Cu/Zn ratio) en líquido folicular y la concentración de AMH (p20 vs p80 (95% CI): 3.15 (1.36, 7.31), p de tendencia = 0.009) en estos modelos (Tabla 23 y S15).

Además, en los modelos completamente ajustados se observó una asociación estadísticamente positiva entre la concentración plasmática de manganeso y la concentración de AMH (p20 vs p80 (95% CI): 5.37 (1.86, 15.53), p de tendencia = 0.003) (Tabla 23 y S15).

Tabla 23. Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de elementos traza esenciales

	Concentración de AMH			Concentración de AMH	
	p20 vs p80 (95%CI)	p		p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>			<i>Orina</i>		
Cobre (Cu)	4.22 (1.34, 13.25)	0.015	Cobre (Cu)	0.87 (0.42, 1.79)	0.695
Zinc (Zn)	0.79 (0.34, 1.81)	0.566	Zinc (Zn)	1.16 (0.49, 2.75)	0.729
Ratio Cu/Zn	3.15 (1.36, 7.31)	0.009	Ratio Cu/Zn	0.75 (0.29, 1.92)	0.539
Molibdeno (Mo)	0.78 (0.18, 3.44)	0.741	Molibdeno (Mo)	1.97 (0.74, 5.27)	0.172
Ratio Cu/Mo	3.16 (0.87, 11.47)	0.079	Ratio Cu/Mo	0.63 (0.28, 1.38)	0.238
Litio (Li)	0.56 (0.27, 1.18)	0.124	Litio (Li)	1.37 (0.48, 3.93)	0.553
Selenio (Se)	0.93 (0.39, 2.20)	0.867	Selenio (Se)	1.45 (0.57, 3.69)	0.423
Hierro (Fe)	0.81 (0.39, 1.67)	0.564	Hierro (Fe)	0.65 (0.26, 1.61)	0.346
Cromo (Cr)	0.84 (0.20, 3.54)	0.813	Cromo (Cr)	0.57 (0.16, 2.10)	0.395
<i>Plasma</i>					
Cobre (Cu)	4.04 (1.31, 12.50)	0.016			
Zinc (Zn)	1.68 (0.55, 5.13)	0.354			
Ratio Cu/Zn	2.20 (0.70, 6.93)	0.174			
Litio (Li)	1.51 (1.00, 2.29)	0.052			
Selenio (Se)	1.12 (0.55, 2.27)	0.756			
Cromo (Cr)	2.19 (0.70, 6.88)	0.174			
Manganeso (Mn)	5.37 (1.86, 15.53)	0.003			

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 785 y 1267.4 ng/mL para el cobre, 324.2 y 480.76 ng/mL para el zinc, 1.99 y 3.06 para la ratio Cu/Zn, 0.5 y 1.8 ng/mL para el molibdeno, 485.29 y 1723.2 para la ratio Cu/Mo, 0.9 y 1.8 ng/mL para el litio, 58.2 y 77 ng/mL para el selenio, 416.9 y 659.1 ng/mL para el hierro, y 0.5 y 16.88 ng/mL para el cromo, cuantificados en el líquido folicular; 993.96 y 1519.19 ng/mL para el cobre, 829.34 y 1104.32 ng/mL para el zinc, 0.98 y 1.64 para la ratio Cu/Zn, 2.5 y 5.52 ng/mL para el molibdeno, 218.75 y 564.23 para la ratio Cu/Mo, 5.57 y 6.85 ng/mL para el litio, 90.79 y 109.83 ng/mL para el selenio, 2.5 y 11.66 ng/mL para el cromo, y 2.5 y 7.72 ng/mL para el manganeso, cuantificados en plasma; 4.25 y 11.22 ng/g CR para el cobre, 186.4 y 535.29 ng/g CR para el zinc, 0.96 y 4.15 para la ratio Cu/Zn, 35.05 y 80.35 ng/g CR para el molibdeno, 6.98 y 21.53 para la ratio Cu/Mo, 16.05 y 43.81 ng/g CR para el litio, 33.86 y 63.42 ng/g CR para el selenio, 9.14 y 47.12 ng/g CR para el hierro, y 0.17 y 1.14 ng/g CR para el cromo, cuantificados en orina tras la corrección por creatinina.

5.3. Asociación de las concentraciones de elementos traza esenciales con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV

Posteriormente evaluamos la relación entre las concentraciones de elementos traza esenciales medidos en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción oocitaria con las variables de respuesta ovárica, entre las que se encuentra la concentración de estradiol el día de administración del desencadenante, número de oocitos totales recuperados y frecuencia relativa de oocitos maduros recuperados, y variables embriológicas del tratamiento de FIV, entre las que se encuentra la frecuencia relativa de embriones fecundados, frecuencia relativa de llegada a blastocisto y frecuencia relativa de embriones euploides.

En los modelos multivariable ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, el incremento de la concentración de cobre en líquido folicular se asoció significativamente con una mayor concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante (p20 vs p80 (95% CI): 1.59 (1.28, 1.97), p de tendencia < 0.001), mayor número de oocitos totales recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 1.64 (1.25, 2.16), p de tendencia < 0.001), mayor proporción de oocitos maduros recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 1.55 (1.16, 2.07), p de tendencia = 0.004) y mayor frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 1.52 (1.11, 2.07), p de tendencia = 0.009). En el caso de las concentraciones plasmáticas de cobre, también observamos una asociación positiva estadísticamente significativa con el número total de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 1.42 (1.08, 1.86), p de tendencia = 0.012), frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 1.34 (1.03, 1.75), p de tendencia = 0.03) y frecuencia relativa de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 1.50 (1.12, 2.01), p de tendencia = 0.007) (Tablas 24, 25 y S15).

Tabla 24. Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de elementos traza esenciales

	Concentración de E2 el día del desencadenante		Número de oocitos recuperados		Frecuencia relativa de oocitos maduros	
	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>						
Cobre (Cu)	1.59 (1.28, 1.97)	<0.001	1.64 (1.25, 2.16)	<0.001	1.55 (1.16, 2.07)	0.004
Zinc (Zn)	1.05 (0.88, 1.25)	0.569	1.06 (0.85, 1.33)	0.582	1.04 (0.84, 1.28)	0.719
Ratio Cu/Zn	1.26 (1.05, 1.50)	0.012	1.24 (1.02, 1.50)	0.029	1.21 (1.00, 1.47)	0.055
Molibdeno (Mo)	1.10 (0.78, 1.56)	0.560	1.04 (0.68, 1.58)	0.868	1.02 (0.67, 1.55)	0.938
Ratio Cu/Mo	1.17 (0.86, 1.59)	0.297	1.29 (0.90, 1.85)	0.16	1.27 (0.89, 1.83)	0.183
Litio (Li)	1.02 (0.87, 1.20)	0.808	0.82 (0.68, 0.98)	0.030	0.80 (0.67, 0.95)	0.015
Selenio (Se)	1.08 (0.90, 1.29)	0.408	1.08 (0.87, 1.35)	0.488	1.02 (0.82, 1.26)	0.879
Hierro (Fe)	1.01 (0.87, 1.17)	0.923	0.99 (0.83, 1.19)	0.909	0.96 (0.81, 1.14)	0.626
Cromo (Cr)	1.08 (0.80, 1.44)	0.618	1.16 (0.81, 1.66)	0.42	1.01 (0.70, 1.46)	0.946
<i>Plasma</i>						
Cobre (Cu)	1.22 (0.96, 1.56)	0.108	1.42 (1.08, 1.86)	0.012	1.34 (1.03, 1.75)	0.03
Zinc (Zn)	0.92 (0.73, 1.16)	0.473	0.95 (0.71, 1.26)	0.711	0.96 (0.72, 1.27)	0.759
Ratio Cu/Zn	1.23 (0.97, 1.56)	0.086	1.37 (1.04, 1.80)	0.027	1.29 (0.99, 1.68)	0.059
Litio (Li)	1.01 (0.92, 1.11)	0.834	0.97 (0.88, 1.08)	0.584	0.97 (0.88, 1.06)	0.469
Selenio (Se)	0.86 (0.74, 0.99)	0.038	0.96 (0.81, 1.15)	0.652	0.96 (0.81, 1.15)	0.669
Cromo (Cr)	1.13 (0.89, 1.44)	0.314	1.24 (0.93, 1.65)	0.148	1.24 (0.94, 1.63)	0.118
Manganeso (Mn)	1.16 (0.91, 1.47)	0.227	1.28 (0.98, 1.66)	0.066	1.31 (1.04, 1.65)	0.023
<i>Orina</i>						
Cobre (Cu)	0.94 (0.81, 1.09)	0.397	0.90 (0.77, 1.06)	0.213	0.91 (0.78, 1.06)	0.225
Zinc (Zn)	1.03 (0.86, 1.23)	0.729	1.11 (0.90, 1.38)	0.32	1.12 (0.92, 1.38)	0.255
Ratio Cu/Zn	0.91 (0.75, 1.10)	0.312	0.81 (0.65, 1.01)	0.057	0.81 (0.65, 0.99)	0.045
Molibdeno (Mo)	1.13 (0.92, 1.39)	0.223	1.16 (0.93, 1.44)	0.195	1.20 (0.97, 1.48)	0.093
Ratio Cu/Mo	0.88 (0.75, 1.04)	0.125	0.83 (0.70, 0.99)	0.041	0.83 (0.70, 0.98)	0.027
Litio (Li)	1.10 (0.89, 1.37)	0.376	0.92 (0.72, 1.19)	0.53	0.96 (0.76, 1.21)	0.717
Selenio (Se)	1.01 (0.83, 1.22)	0.946	1.00 (0.80, 1.24)	0.975	1.03 (0.83, 1.27)	0.772
Hierro (Fe)	0.82 (0.68, 0.98)	0.028	0.81 (0.64, 1.02)	0.074	0.84 (0.67, 1.06)	0.137
Cromo (Cr)	0.93 (0.71, 1.21)	0.579	0.83 (0.61, 1.14)	0.254	0.89 (0.65, 1.21)	0.45

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 785 y 1267.4 ng/mL para el cobre, 324.2 y 480.76 ng/mL para el zinc, 1.99 y 3.06 para la ratio Cu/Zn, 0.5 y 1.8 ng/mL para el molibdeno, 485.29 y 1723.2 para la ratio Cu/Mo, 0.9 y 1.8 ng/mL para el litio, 58.2 y 77 ng/mL para el selenio, 416.9 y 659.1 ng/mL para el hierro, y 0.5 y 16.88 ng/mL para el cromo, cuantificados en el líquido folicular; 993.96 y 1519.19 ng/mL para el cobre, 829.34 y 1104.32 ng/mL para el zinc, 0.98 y 1.64 para la ratio Cu/Zn, 2.5 y 5.52 ng/mL para el molibdeno, 218.75 y 564.23 para la ratio Cu/Mo, 5.57 y 6.85 ng/mL para el litio, 90.79 y 109.83 ng/mL para el selenio, 2.5 y 11.66 ng/mL para el cromo, y 2.5 y 7.72 ng/mL para el manganeso, cuantificados en plasma; 4.25 y 11.22 ng/g CR para el cobre, 186.4 y 535.29 ng/g CR para el zinc, 0.96 y 4.15 para

la ratio Cu/Zn, 35.05 y 80.35 ng/g CR para el molibdeno, 6.98 y 21.53 para la ratio Cu/Mo, 16.05 y 43.81 ng/g CR para el litio, 33.86 y 63.42 ng/g CR para el selenio, 9.14 y 47.12 ng/g CR para el hierro, y 0.17 y 1.14 ng/g CR para el cromo, cuantificados en orina tras la corrección por creatinina.

Para la ratio de la concentración de cobre y zinc (ratio Cu/Zn), en los modelos completamente ajustados se observó una asociación positiva estadísticamente significativa con la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante (p20 vs p80 (95% CI): 1.26 (1.05, 1.50), p de tendencia = 0.012), el número de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 1.24 (1.02, 1.50), p de tendencia = 0.029), y la frecuencia relativa de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 1.38 (1.09, 1.75), p de tendencia = 0.009) cuando se midió en líquido folicular y una asociación positiva estadísticamente significativa tanto para el número total de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 1.37 (1.04, 1.80), p de tendencia = 0.027) como para la frecuencia relativa de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 1.38 (1.03, 1.85), p de tendencia = 0.031) cuando se evaluó en plasma. Por el contrario, al ser evaluada en la orina, los modelos completamente ajustados muestran una asociación negativa estadísticamente significativa de la ratio Cu/Zn tanto para la frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 1.38 (1.03, 1.85), p de tendencia = 0.031), la frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 1.38 (1.03, 1.85), p de tendencia = 0.031) y la frecuencia relativa de llegada a blastocisto (p20 vs p80 (95% CI): 1.38 (1.03, 1.85), p de tendencia = 0.031) (Tablas 24, 25 y S15).

En los modelos completamente ajustados, también se observan asociaciones positivas estadísticamente significativas entre las concentraciones de manganeso en plasma y la frecuencia relativa de oocitos maduros p20 vs p80 (95% CI): 1.31 (1.04, 1.65), p de tendencia = 0.023), la frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 1.33 (1.04, 1.70), p de tendencia = 0.022), y la frecuencia relativa de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 1.40 (1.10, 1.79), p de tendencia = 0.007) (Tablas 24, 25 y S15). Otros elementos traza esenciales para los que se han observado asociaciones positivas estadísticamente significativas es para la ratio de la concentración de cobre y molibdeno medidas en líquido folicular, asociada con una mayor proporción de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 1.48 (1.01, 2.16), p de tendencia = 0.045) (Tablas 24, 25 y S15).

Tabla 25. Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de los elementos traza esenciales

	Frecuencia relativa de embriones fecundados		Frecuencia relativa de llegada a blastocisto		Frecuencia relativa de embriones euploides	
	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>	p20 vs p80 (95%CI)	<i>p</i>
<i>Líquido Folicular</i>						
Cobre (Cu)	1.52 (1.11, 2.07)	0.009	1.35 (0.97, 1.88)	0.074	1.26 (0.92, 1.73)	0.152
Zinc (Zn)	1.03 (0.83, 1.28)	0.759	1.08 (0.87, 1.36)	0.469	0.89 (0.71, 1.12)	0.324
Ratio Cu/Zn	1.19 (0.97, 1.46)	0.093	1.08 (0.86, 1.35)	0.513	1.38 (1.09, 1.75)	0.009
Molibdeno (Mo)	0.95 (0.61, 1.47)	0.809	1.01 (0.65, 1.58)	0.952	0.84 (0.54, 1.30)	0.414
Ratio Cu/Mo	1.33 (0.91, 1.94)	0.138	1.24 (0.84, 1.83)	0.264	1.48 (1.01, 2.16)	0.045
Litio (Li)	0.78 (0.65, 0.94)	0.011	0.89 (0.73, 1.08)	0.223	0.89 (0.73, 1.07)	0.216
Selenio (Se)	0.99 (0.79, 1.23)	0.895	0.96 (0.77, 1.19)	0.698	0.88 (0.74, 1.07)	0.190
Hierro (Fe)	0.96 (0.80, 1.15)	0.630	0.90 (0.75, 1.09)	0.287	0.89 (0.74, 1.07)	0.218
Cromo (Cr)	0.92 (0.63, 1.35)	0.658	0.97 (0.66, 1.43)	0.882	0.89 (0.62, 1.30)	0.549
<i>Plasma</i>						
Cobre (Cu)	1.32 (1.00, 1.75)	0.053	1.34 (0.99, 1.81)	0.056	1.50 (1.12, 2.01)	0.007
Zinc (Zn)	1.03 (0.76, 1.39)	0.861	1.12 (0.82, 1.54)	0.465	0.99 (0.71, 1.37)	0.936
Ratio Cu/Zn	1.23 (0.93, 1.63)	0.151	1.18 (0.88, 1.59)	0.271	1.38 (1.03, 1.85)	0.031
Litio (Li)	0.99 (0.89, 1.10)	0.860	1.04 (0.93, 1.17)	0.500	1.10 (0.97, 1.25)	0.131
Selenio (Se)	0.97 (0.81, 1.17)	0.769	1.01 (0.84, 1.23)	0.882	1.05 (0.87, 1.26)	0.602
Cromo (Cr)	1.26 (0.94, 1.68)	0.120	1.09 (0.79, 1.49)	0.595	1.10 (0.81, 1.51)	0.535
Manganeso (Mn)	1.33 (1.04, 1.70)	0.022	1.27 (0.97, 1.65)	0.082	1.40 (1.10, 1.79)	0.007
<i>Orina</i>						
Cobre (Cu)	0.90 (0.77, 1.06)	0.204	0.91 (0.78, 1.08)	0.272	0.92 (0.78, 1.08)	0.305
Zinc (Zn)	1.14 (0.92, 1.41)	0.223	1.15 (0.93, 1.43)	0.189	1.06 (0.84, 1.34)	0.595
Ratio Cu/Zn	0.78 (0.63, 0.98)	0.032	0.79 (0.63, 0.99)	0.039	0.84 (0.66, 1.08)	0.171
Molibdeno (Mo)	1.15 (0.92, 1.44)	0.221	1.22 (0.97, 1.52)	0.083	1.11 (0.88, 1.41)	0.371
Ratio Cu/Mo	0.84 (0.70, 1.00)	0.047	0.83 (0.69, 0.99)	0.035	0.86 (0.71, 1.04)	0.119
Litio (Li)	0.94 (0.73, 1.20)	0.597	1.09 (0.85, 1.38)	0.487	1.16 (0.91, 1.47)	0.225
Selenio (Se)	1.00 (0.80, 1.24)	0.969	0.99 (0.79, 1.24)	0.934	1.05 (0.83, 1.32)	0.690
Hierro (Fe)	0.83 (0.65, 1.07)	0.147	0.84 (0.65, 1.09)	0.181	0.90 (0.68, 1.18)	0.423
Cromo (Cr)	0.88 (0.63, 1.21)	0.419	0.86 (0.62, 1.19)	0.351	0.98 (0.70, 1.37)	0.895

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 785 y 1267.4 ng/mL para el cobre, 324.2 y 480.76 ng/mL para el zinc, 1.99 y 3.06 para la ratio Cu/Zn, 0.5 y 1.8 ng/mL para el molibdeno, 485.29 y 1723.2 para la ratio Cu/Mo, 0.9 y 1.8 ng/mL para el litio, 58.2 y 77 ng/mL para el selenio, 416.9 y 659.1 ng/mL para el hierro, y 0.5 y 16.88 ng/mL para el cromo, cuantificados en el líquido folicular; 993.96 y 1519.19 ng/mL para el cobre, 829.34 y 1104.32 ng/mL para el zinc, 0.98 y 1.64 para la ratio Cu/Zn, 2.5 y 5.52 ng/mL para el molibdeno, 218.75 y 564.23 para la ratio Cu/Mo, 5.57 y 6.85 ng/mL para el litio, 90.79 y 109.83 ng/mL para el selenio, 2.5 y 11.66 ng/mL para el cromo, y 2.5 y 7.72 ng/mL para el manganeso, cuantificados en plasma; 4.25 y 11.22 ng/g CR para el cobre, 186.4 y 535.29 ng/g CR para el zinc,

0.96 y 4.15 para la ratio Cu/Zn, 35.05 y 80.35 ng/g CR para el molibdeno, 6.98 y 21.53 para la ratio Cu/Mo, 16.05 y 43.81 ng/g CR para el litio, 33.86 y 63.42 ng/g CR para el selenio, 9.14 y 47.12 ng/g CR para el hierro, y 0.17 y 1.14 ng/g CR para el cromo, cuantificados en orina tras la corrección por creatinina.

Por el contrario, en los modelos completamente ajustados se observa una asociación negativa estadísticamente significativa entre la concentración de litio medido en líquido folicular y el número de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 0.82 (0.68, 0.98), p de tendencia = 0.03), la frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 0.80 (0.67, 0.95), p de tendencia = 0.015), y la frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 0.78 (0.65, 0.94), p de tendencia = 0.011) (Tablas 24, 25 y S15).

En el caso de la ratio de las concentraciones de cobre y molibdeno (ratio Cu/Mo) medidos en orina, en los modelos completamente ajustados se observa una asociación negativa estadísticamente significativa para el número de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 0.83 (0.70, 0.99), p de tendencia = 0.041), la frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 0.83 (0.70, 0.98), p de tendencia = 0.027), la frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 0.84 (0.70, 1.00), p de tendencia = 0.047), y la frecuencia relativa de llegada a blastocisto (p20 vs p80 (95% CI): 0.83 (0.69, 0.99), p de tendencia = 0.035) (Tablas 24, 25 y S15). Finalmente, otros elementos traza esenciales para los que se han observado asociaciones negativas estadísticamente significativas son para la concentración plasmática de selenio y la concentración urinaria de hierro en relación con la concentración de estradiol el día de la administración del desencadenante (p20 vs p80 (95% CI): 0.86 (0.74, 0.99), p de tendencia = 0.038; y 0.82 (0.68, 0.98), p de tendencia = 0.028, respectivamente) (Tablas 24, 25 y S15).

5.4. Asociación de las concentraciones de elementos traza esenciales con las variables clínicas del tratamiento de FIV

También examinamos la relación entre las concentraciones de elementos traza esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción oocitaria con las variables clínicas del tratamiento de FIV. Los datos de implantación, embarazo clínico y recién nacido vivo fueron relativizados a aquellas mujeres que tuvieron transferencia embrionaria, mientras que la evaluación del éxito reproductivo fue calculada como el número de recién nacidos vivos respecto al total de mujeres que comenzaron el tratamiento de FIV (Figura 18, Tabla S16).

En los modelos ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, una mayor concentración de molibdeno en orina se asoció significativamente con menor probabilidad de implantación (OR (95% CI): 0.19 (0.03, 0.86), p valor: 0.043), embarazo clínico (OR (95% CI): 0.2 (0.04, 0.76), p valor: 0.027) y recién nacido vivo (OR (95% CI): 0.2 (0.04, 0.72), p valor: 0.024). Además, el incremento de las concentraciones de litio y cromo en esta matriz biológica también se asociaron significativamente con menor probabilidad de recién nacido vivo (OR (95% CI): 0.33 (0.11, 0.89), p valor: 0.036); 0.5 (0.24, 0.97), p valor: 0.049, para el litio y el cromo, respectivamente) (Figura 18, Tabla S16).

No observamos cambios significativos de las probabilidades de las variables clínicas de FIV asociadas con las concentraciones de elementos traza esenciales medidos en líquido folicular o plasma (Figura 18, Tabla S16).

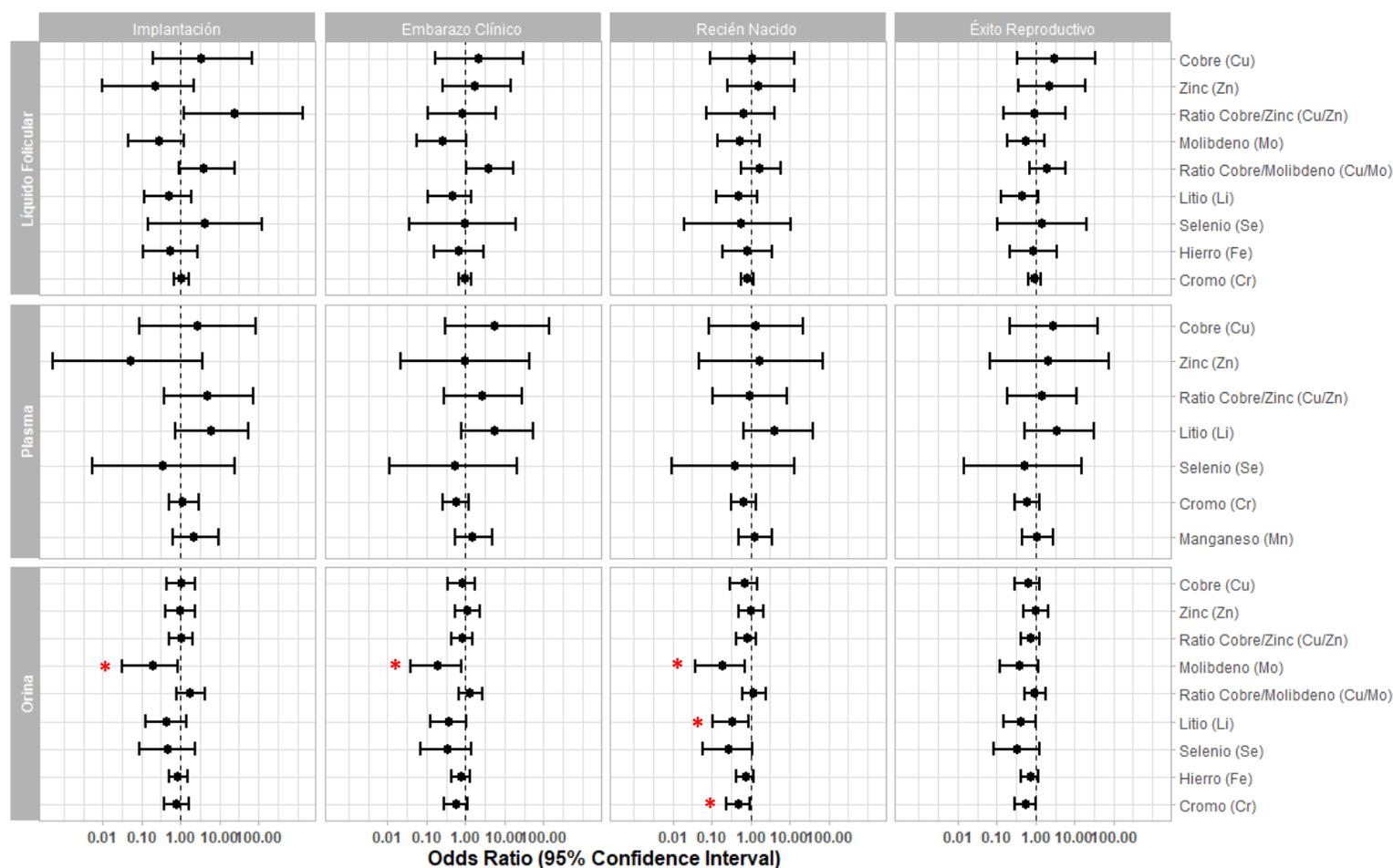


Figura 18. Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de elementos traza esenciales y los resultados clínicos de FIV. Las asociaciones se representan por sus Odds Ratio con intervalos de confianza (CI) del 95% a partir de modelo ajustados por edad, ICM, raza/etnicidad y tabaquismo, para cada uno de los compuestos en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica. Los resultados incluyen probabilidad de implantación, embarazo clínico y nacimiento de un recién nacido vivo en aquellas participantes que tuvieron transferencia de un solo embrión congelado y la probabilidad de nacimiento de un recién nacido vivo en todas las participantes (éxito reproductivo). Las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representan con un asterisco rojo.

6. Impacto de las concentraciones de elementos traza no esenciales en matrices biológicas femeninas sobre los resultados de FIV

6.1. Distribución de los elementos traza no esenciales en las matrices biológicas

Las distribuciones y los porcentajes por encima del límite de cuantificación de los elementos traza no esenciales en líquido folicular, plasma y orina, obtenidos el día de la punción ovárica, se presentan en la tabla 26. Elementos traza no esenciales con un porcentaje de detección inferior al 50%, como el arsénico, estaño, cesio, antimonio y cadmio en líquido folicular, cadmio en plasma y antimonio y cadmio en orina, fueron excluidos de los subsiguientes análisis. Dado que por problemas técnicos el mercurio en plasma no pudo analizarse en todas las muestras, también fue excluido del resto de análisis.

Tabla 26. Distribución de las concentraciones de elementos traza no esenciales en las muestras de líquido folicular, plasma y orina recogidos el día de la punción ovárica

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Líquido Folicular</i>								
Bario (Ba) (ng/mL)	2	96.1%	2.082 (1.907)	0.50	1.50	2.00	2.70	11.10
Estroncio (Sr) (ng/mL)	N/A	100%	27.38 (7.595)	9.00	22.27	28.79	32.60	45.00
Rubidio (Rb) (ng/mL)	N/A	100%	116.28 (22.915)	46.00	108.50	124.00	130.25	171.00
Arsénico (As) (ng/mL)	1	15.4%	0.638 (1.271)	0.50	0.50	0.50	0.50	7.08
Estaño (Sn) (ng/mL)	2	0%	-	-	-	-	-	-
Cesio (Cs) (ng/mL)	1	0%	-	-	-	-	-	-
Mercurio (Hg) (ng/mL)	N/A	100%	1.841 (2.567)	0.10	1.22	1.76	2.81	14.90
Titanio (Ti) (ng/mL)	N/A	100%	2.636 (0.759)	1.40	2.20	2.55	3.03	6.10
Plomo (Pb) (ng/mL)	1	6.2%	0.542 (0.361)	0.50	0.50	0.50	0.50	2.37
Antimonio (Sb) (ng/mL)	10	0%	-	-	-	-	-	-
Cadmio (Cd) (ng/mL)	1	0%	-	-	-	-	-	-
<i>Plasma</i>								
Bario (Ba) (ng/mL)	N/A	100%	26.24 (121.34)	15.97	20.70	22.86	26.65	953.79
Estroncio (Sr) (ng/mL)	N/A	100%	37.99 (10.05)	22.90	32.03	38.30	44.41	73.36
Rubidio (Rb) (ng/mL)	N/A	100%	361.6 (182.19)	194.28	268.64	306.64	488.42	959.40
Arsénico (As) (ng/mL)	2	88.1%	4.16 (1.19)	2.50	3.61	4.11	5.20	8.22
Estaño (Sn) (ng/mL)	N/A	100%	9.55 (5.96)	5.25	6.67	8.07	14.22	33.21
Cesio (Cs) (ng/mL)	N/A	100%	3.71 (7.53)	1.97	2.47	3.03	3.62	53.16
Titanio (Ti) (ng/mL)	N/A	100%	567.6 (386.27)	94.24	426.40	618.05	887.93	1697.53
Plomo (Pb) (ng/mL)	N/A	100%	4.3 (1.87)	2.58	3.24	4.20	5.22	11.14
Antimonio (Sb) (ng/mL)	5	94.9%	9.48 (6.09)	2.50	6.80	9.63	13.56	38.56
Cadmio (Cd) (ng/mL)	1	0%	-	-	-	-	-	-

Tabla 26. Distribución de las concentraciones de elementos traza no esenciales en las muestras de líquido folicular, plasma y orina recogidos el día de la punción ovárica (Continuación)

	LOQ	> LOQ (%)	GM (SD)	Mínimo	25%	50%	75%	Máximo
<i>Orina</i>								
Bario (Ba) (ng/mL)	1	94.8%	1.4 (2.69)	0.25	0.81	1.31	2.47	19.99
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			1.61 (2.07)	0.15	0.38	0.98	1.85	3.05
Estroncio (Sr) (ng/mL)	N/A	100%	84.16 (84.6)	9.56	49.28	88.56	150.43	477.11
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			96.61 (89.54)	10.26	33.31	58.98	109.17	151.86
Rubidio (Rb) (ng/mL)	N/A	100%	1125.99 (810.16)	110.84	807.99	1161.52	2039.44	3515.73
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			1307.16 (1084.25)	500.16	683.38	960.52	1202.80	1749.01
Arsénico (As) (ng/mL)	0.5	98.3%	13.36 (61.02)	0.25	5.94	12.59	28.29	345.52
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			15.33 (59.49)	0.91	4.70	6.61	12.64	30.29
Estaño (Sn) (ng/mL)	0.5	84.5%	0.92 (1.13)	0.25	0.50	0.92	1.59	5.75
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			1.05 (1.88)	0.13	0.36	0.55	1.07	1.83
Cesio (Cs) (ng/mL)	N/A	100%	5.54 (3.84)	0.58	4.04	5.94	10.13	15.97
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			6.36 (4.52)	1.78	3.45	4.62	6.22	7.89
Mercurio (Hg) (ng/mL)	N/A	100%	1.15 (0.8)	0.27	0.78	1.21	1.58	4.94
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			1.32 (2.89)	0.26	0.46	0.67	1.26	2.29
Titanio (Ti) (ng/mL)	N/A	100%	10.23 (7.34)	2.25	6.80	12.07	16.99	27.10
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			12.12 (11.54)	3.59	6.25	6.78	12.87	21.02
Plomo (Pb) (ng/mL)	0.5	65.5%	0.46 (0.74)	0.25	0.25	0.50	0.52	5.80
<i>Corrección por creatinina (µg/g CR)</i>			0.53 (1.42)	0.07	0.18	0.26	0.46	0.90
Antimonio (Sb) (ng/mL)	5	0%	-	-	-	-	-	-
Cadmio (Cd) (ng/mL)	1	0%	-	-	-	-	-	-

Cuando evaluamos la asociación de los elementos traza no esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica mediante coeficientes de correlación de Spearman, en general no observamos correlaciones de estos elementos entre fluidos. Hallamos correlaciones positivas entre el líquido folicular y el plasma para el estroncio ($r=0.71$) y el rubidio ($r=0.4$), y entre el líquido folicular y la orina en el caso del arsénico ($r=0.37$) (Figura 19).

Al evaluar las correlaciones entre los elementos traza no esenciales evaluados para cada una de las matrices biológicas, de forma general no observamos correlaciones de estos elementos en líquido folicular. En el caso del plasma, observamos correlaciones positivas moderadas-altas entre el plomo, estroncio, estaño, bario y cesio y correlaciones negativas moderadas del titanio con el plomo, el estroncio y el estaño. Por último, en el caso de la orina, de forma general observamos asociaciones positivas moderadas-altas de estos elementos (Figura 20).

En un primer análisis exploratorio, evaluamos las variables demográficas y reproductivas para cada uno de los elementos traza no esenciales modelados como terciles. De forma general no observamos diferencias para estas variables entre los terciles de elementos traza no esenciales medidos en líquido folicular, plasma y orina; aunque sí se observó que la concentración de bario en líquido folicular se asociaba con mayor edad y el estroncio en líquido folicular con menor probabilidad de tener educación secundaria. Por lo que respecta a las características reproductivas, el tercil superior de concentración de bario en plasma se asocia con menor concentración de estradiol el día del desencadenante, mientras que mayor concentración de bario en orina se asocia con menor probabilidad de recién nacido vivo y éxito reproductivo. Por último, en el tercil superior de rubidio en líquido folicular se observa menor tasa de ovocitos maduros que en el tercil inferior (Tabla S17).

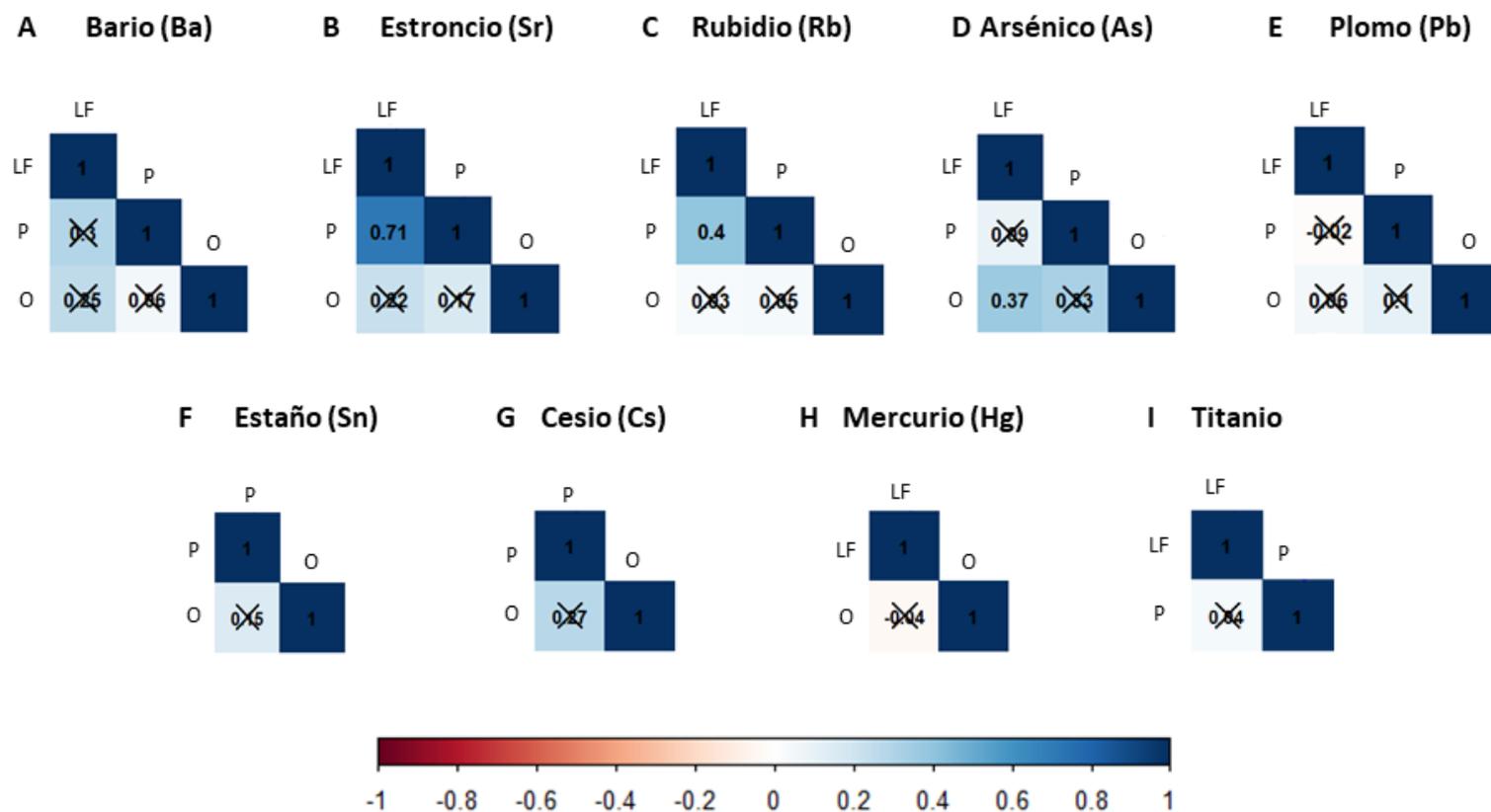


Figura 19. Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza no esenciales entre las matrices biológicas. Elementos traza no esenciales en líquido folicular (LF), plasma (P) y orina (O) obtenidos el día de la punción ovárica. El azul representa una correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de la correlación. Los valores tachados representan asociaciones no significativas ($p > 0,05$).

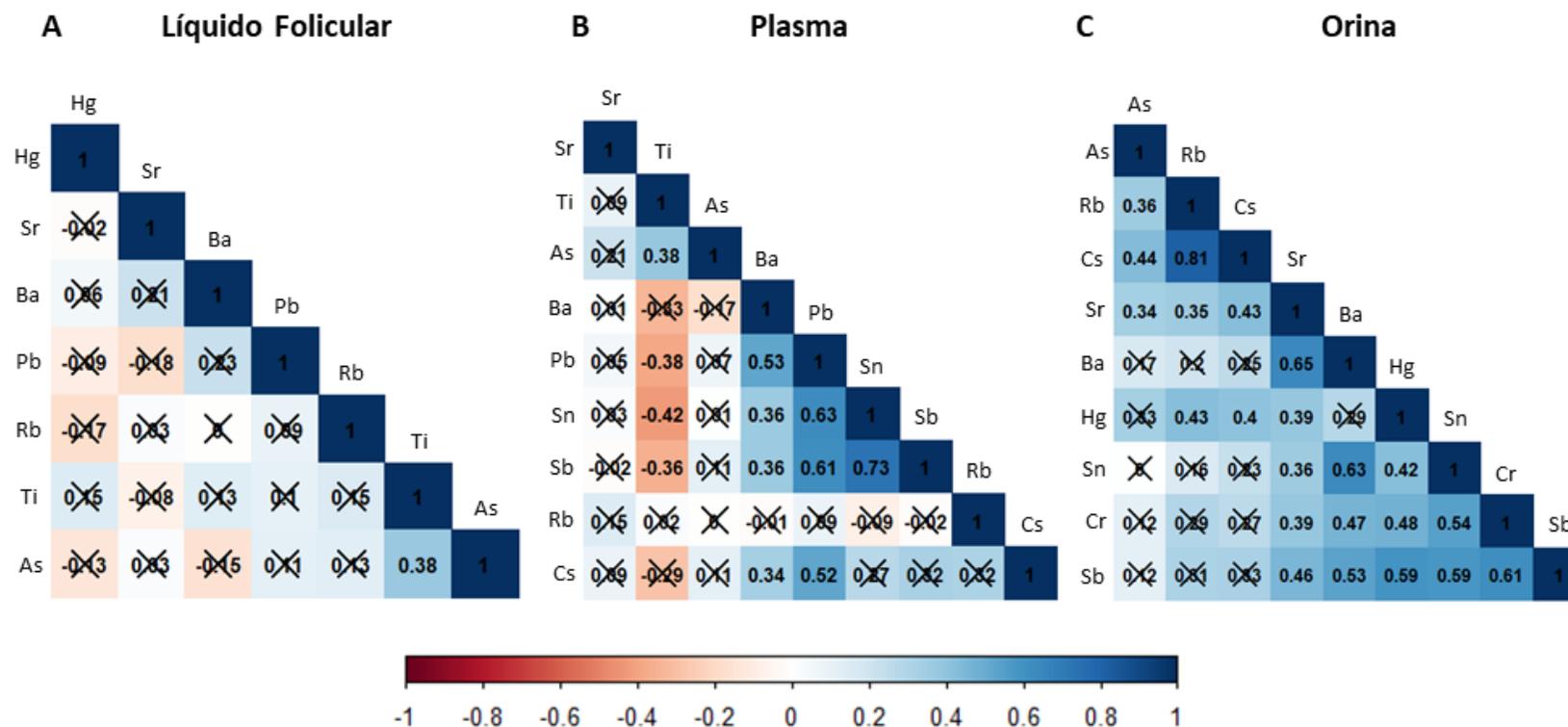


Figura 20. Matrices de correlación de Spearman que representan las relaciones de los elementos traza esenciales para cada matriz biológica. [A] Líquido Folicular, [B] Plasma, y [C] Orina. El azul representa una correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa. La intensidad del color es proporcional a la fuerza de la correlación. Los valores tachados representan asociaciones no significativas ($p > 0,05$).

6.2. Asociación de las concentraciones de elementos traza no esenciales con variables de reserva ovárica

También evaluamos la relación entre las concentraciones de elementos traza no esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción oocitaria con la concentración de AMH como marcador de reserva ovárica.

En los modelos multivariable ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, mayores concentraciones de estroncio y rubidio medidos en plasma se asociaron de forma estadísticamente significativa con menor concentración de AMH (p20 vs p80 (95% CI): 0.37 (0.15, 0.91), p de tendencia = 0.032; y 0.25 (0.08, 0.81), p de tendencia = 0.022, para estroncio y rubidio respectivamente) (Tabla 27 y S18).

Tabla 27. Diferencia de medias para la concentración de AMH según las concentraciones de elementos traza no esenciales

	Concentración de AMH			Concentración de AMH	
	p20 vs p80 (95%CI)	p		p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>			<i>Orina</i>		
Bario (Ba)	0.59 (0.27, 1.30)	0.186	Bario (Ba)	0.84 (0.30, 2.36)	0.735
Estroncio (Sr)	0.41 (0.15, 1.14)	0.085	Estroncio (Sr)	1.11 (0.38, 3.27)	0.844
Rubidio (Rb)	0.57 (0.27, 1.18)	0.127	Rubidio (Rb)	1.32 (0.53, 3.30)	0.543
Mercury (Hg)	1.26 (0.58, 2.77)	0.553	Arsénico (As)	2.09 (0.73, 6.03)	0.168
Titanio (Ti)	0.97 (0.33, 2.84)	0.952	Estaño (Sn)	0.88 (0.35, 2.23)	0.792
<i>Plasma</i>			Cesio (Cs)	1.06 (0.45, 2.47)	0.896
Bario (Ba)	1.01 (0.65, 1.57)	0.976	Mercury (Hg)	1.53 (0.53, 4.42)	0.425
Estroncio (Sr)	0.37 (0.15, 0.91)	0.032	Plomo (Pb)	1.06 (0.36, 3.07)	0.917
Rubidio (Rb)	0.25 (0.08, 0.81)	0.022			
Arsénico (As)	0.52 (0.21, 1.33)	0.170			
Estaño (Sn)	2.76 (0.96, 7.94)	0.059			
Cesio (Cs)	1.21 (0.79, 1.85)	0.370			
Titanio (Ti)	0.52 (0.20, 1.35)	0.175			
Plomo (Pb)	1.05 (0.38, 2.94)	0.923			
Antimonio (Sb)	1.45 (0.59, 3.56)	0.416			

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 1.5 y 2.8 ng/mL para el bario, 22.04 y 34.21 ng/mL para el estroncio, 103.20 y 134 ng/mL para el rubidio, 1.2 y 2.99 ng/mL para el mercurio, y 2.12 y 3.10 ng/mL para el titanio, cuantificados en el líquido folicular; 19.99 y 30.1 ng/mL para el bario, 31.02 y 45.39 ng/mL para el estroncio, 264.72 y 578.41 ng/mL para el rubidio, 3.43 y 5.29 ng/mL para el arsénico, 6.58 y 14.82 ng/mL para el estaño, 2.46 y 3.93 ng/mL para el cesio, 328.86 y 908.27 ng/mL para el titanio, 3.06 y 5.65 ng/mL para el plomo, y 6.47 y 14.11 ng/mL para el antimonio, cuantificados en plasma; 0.72

y 3.24 ng/g CR para el bario, 53.79 y 190.25 ng/g CR para el estroncio, 924.42 y 1885.94 ng/g CR para el rubidio, 6.22 y 38.89 ng/g CR para el arsénico, 0.54 y 2.01 ng/g CR para el estaño, 4.37 y 8.29 ng/g CR para el cesio, 6.73 y 21.76 ng/g CR para el titanio, 0.63 y 2.40 ng/g CR para el mercurio, y 0.26 y 1.13 ng/g CR para el plomo, cuantificados en orina tras la corrección por creatinina.

6.3. Asociación de las concentraciones de elementos traza no esenciales con variables de respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV

En los modelos multivariados completamente ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, se observaron múltiples asociaciones negativas estadísticamente significativas entre la concentración de distintos elementos traza no esenciales medidos en distintas matrices biológicas y diversas variables de respuesta ovárica y variables embriológicas del tratamiento de FIV. En concreto, se observa que mayor concentración de bario medido en líquido folicular se asoció significativamente con un descenso en la concentración de estradiol en el momento del desencadenante (p20 vs p80 (95% CI): 0.83 (0.70, 0.97), p de tendencia = 0.019), el número de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 0.81 (0.66, 0.99), p de tendencia = 0.042), la frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 0.81 (0.66, 0.99), p de tendencia = 0.041), la frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 0.79 (0.64, 0.99), p de tendencia = 0.038), la frecuencia relativa de llegada a blastocisto (p20 vs p80 (95% CI): 0.78 (0.63, 0.97), p de tendencia = 0.027) y la frecuencia relativa de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 0.73 (0.60, 0.90), p de tendencia = 0.004) (Tablas 28, 29 y S18).

Tabla 28. Diferencia de medias y frecuencias relativas para las variables de respuesta ovárica según las concentraciones de elementos traza no esenciales

	Concentración de E2 el día del desencadenante		Número de oocitos recuperados		Frecuencia relativa de oocitos maduros	
	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>						
Bario (Ba)	0.83 (0.70, 0.97)	0.019	0.81 (0.66, 0.99)	0.042	0.81 (0.66, 0.99)	0.041
Estroncio (Sr)	0.88 (0.71, 1.10)	0.251	0.83 (0.65, 1.05)	0.123	0.81 (0.65, 1.01)	0.062
Rubidio (Rb)	1.06 (0.91, 1.24)	0.447	0.98 (0.82, 1.18)	0.866	0.99 (0.83, 1.17)	0.871
Mercury (Hg)	1.03 (0.86, 1.23)	0.743	1.04 (0.85, 1.28)	0.679	1.04 (0.86, 1.26)	0.675
Titanio (Ti)	1.05 (0.84, 1.31)	0.679	1.05 (0.80, 1.37)	0.733	1.00 (0.75, 1.33)	0.992
<i>Plasma</i>						
Bario (Ba)	0.97 (0.88, 1.07)	0.527	1.01 (0.91, 1.12)	0.899	1.02 (0.92, 1.12)	0.762
Estroncio (Sr)	0.85 (0.70, 1.04)	0.113	0.82 (0.64, 1.03)	0.088	0.77 (0.62, 0.96)	0.022
Rubidio (Rb)	0.88 (0.68, 1.13)	0.310	0.74 (0.55, 1.01)	0.055	0.78 (0.58, 1.03)	0.083
Arsénico (As)	0.93 (0.76, 1.13)	0.451	0.74 (0.59, 0.92)	0.009	0.75 (0.61, 0.92)	0.008
Estaño (Sn)	0.94 (0.75, 1.18)	0.596	0.87 (0.66, 1.14)	0.310	0.90 (0.69, 1.16)	0.400
Cesio (Cs)	1.00 (0.91, 1.09)	0.993	0.99 (0.89, 1.11)	0.910	0.99 (0.89, 1.10)	0.864
Titanio (Ti)	1.01 (0.83, 1.24)	0.894	0.95 (0.74, 1.23)	0.702	0.98 (0.77, 1.24)	0.841
Plomo (Pb)	0.97 (0.78, 1.20)	0.750	0.79 (0.61, 1.04)	0.089	0.80 (0.62, 1.04)	0.096
Antimonio (Sb)	0.94 (0.78, 1.14)	0.536	0.85 (0.69, 1.06)	0.139	0.88 (0.72, 1.08)	0.205
<i>Orina</i>						
Bario (Ba)	0.93 (0.75, 1.15)	0.500	0.88 (0.69, 1.11)	0.273	0.82 (0.66, 1.02)	0.069
Estroncio (Sr)	0.89 (0.72, 1.12)	0.315	0.85 (0.66, 1.09)	0.194	0.85 (0.67, 1.08)	0.185
Rubidio (Rb)	1.06 (0.89, 1.27)	0.508	0.99 (0.79, 1.23)	0.931	1.01 (0.81, 1.26)	0.918
Arsénico (As)	1.18 (0.95, 1.47)	0.136	1.21 (0.95, 1.54)	0.116	1.19 (0.95, 1.49)	0.122
Estaño (Sn)	0.86 (0.72, 1.04)	0.126	0.88 (0.70, 1.11)	0.275	0.89 (0.71, 1.12)	0.315
Cesio (Cs)	1.06 (0.89, 1.26)	0.536	0.98 (0.80, 1.20)	0.849	0.97 (0.80, 1.18)	0.778
Mercury (Hg)	0.95 (0.76, 1.18)	0.623	1.02 (0.78, 1.34)	0.860	1.09 (0.84, 1.41)	0.516
Plomo (Pb)	0.95 (0.76, 1.18)	0.610	0.97 (0.74, 1.28)	0.840	1.02 (0.78, 1.33)	0.885

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 1.5 y 2.8 ng/mL para el bario, 22.04 y 34.21 ng/mL para el estroncio, 103.20 y 134 ng/mL para el rubidio, 1.2 y 2.99 ng/mL para el mercurio, y 2.12 y 3.10 ng/mL para el titanio, cuantificados en el líquido folicular; 19.99 y 30.1 ng/mL para el bario, 31.02 y 45.39 ng/mL para el estroncio, 264.72 y 578.41 ng/mL para el rubidio, 3.43 y 5.29 ng/mL para el arsénico, 6.58 y 14.82 ng/mL para el estaño, 2.46 y 3.93 ng/mL para el cesio, 328.86 y 908.27 ng/mL para el titanio, 3.06 y 5.65 ng/mL para el plomo, y 6.47 y 14.11 ng/mL para el antimonio, cuantificados en plasma; 0.72 y 3.24 ng/g CR para el bario, 53.79 y 190.25 ng/g CR para el estroncio, 924.42 y 1885.94 ng/g CR para el rubidio, 6.22 y 38.89 ng/g CR para el arsénico, 0.54 y 2.01 ng/g CR para el estaño, 4.37 y 8.29 ng/g CR para el cesio, 6.73 y 21.76 ng/g CR para el titanio, 0.63 y 2.40 ng/g CR para el mercurio, y 0.26 y 1.13 ng/g CR para el plomo, cuantificados en orina tras la corrección por creatinina.

En el caso del estroncio, las concentraciones halladas en plasma se asociaron significativamente con menor frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 0.77 (0.62, 0.96), p de tendencia = 0.022), menor frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 0.77 (0.61, 0.98), p de tendencia = 0.035) y menor frecuencia relativa de blastocistos (p20 vs p80 (95% CI): 0.77 (0.60, 0.98), p de tendencia = 0.036). Por otro lado, una mayor concentración de estroncio medido en líquido folicular se asoció de forma estadísticamente significativa con menor frecuencia relativa de blastocistos (p20 vs p80 (95% CI): 0.76 (0.62, 0.94), p de tendencia = 0.014), y menor frecuencia relativa de embriones euploides (p20 vs p80 (95% CI): 0.77 (0.63, 0.93), p de tendencia = 0.008) (Tablas 28, 29 y S18).

Por último, otro de los metales pesados para los que se observó una asociación negativa estadísticamente significativa con variables de respuesta ovárica y variables embriológicas del tratamiento de FIV es para la concentración de arsénico en plasma. En este caso, en los modelos completamente ajustados se observó que la concentración de arsénico en plasma se asociaba inversamente con el número de oocitos recuperados (p20 vs p80 (95% CI): 0.74 (0.59, 0.92), p de tendencia = 0.009), frecuencia relativa de oocitos maduros (p20 vs p80 (95% CI): 0.75 (0.61, 0.92), p de tendencia = 0.008) y frecuencia relativa de embriones fecundados (p20 vs p80 (95% CI): 0.77 (0.62, 0.97), p de tendencia = 0.028) (Tablas 28, 29 y S18).

Tabla 29. Frecuencias relativas para las variables embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de los elementos traza no esenciales

	Frecuencia relativa de embriones fecundados		Frecuencia relativa de llegada a blastocisto		Frecuencia relativa de embriones euploides	
	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p	p20 vs p80 (95%CI)	p
<i>Líquido Folicular</i>						
Bario (Ba)	0.79 (0.64, 0.99)	0.038	0.78 (0.63, 0.97)	0.027	0.73 (0.60, 0.90)	0.004
Estroncio (Sr)	0.81 (0.65, 1.01)	0.060	0.76 (0.62, 0.94)	0.014	0.77 (0.63, 0.93)	0.008
Rubidio (Rb)	1.00 (0.84, 1.20)	0.991	0.95 (0.80, 1.12)	0.515	0.89 (0.78, 1.02)	0.102
Mercury (Hg)	1.02 (0.83, 1.26)	0.814	0.96 (0.79, 1.16)	0.649	0.98 (0.82, 1.18)	0.838
Titanio (Ti)	0.96 (0.71, 1.30)	0.799	0.96 (0.71, 1.31)	0.811	0.99 (0.72, 1.38)	0.972
<i>Plasma</i>						
Bario (Ba)	1.02 (0.92, 1.14)	0.677	1.03 (0.92, 1.16)	0.572	1.07 (0.94, 1.21)	0.309
Estroncio (Sr)	0.77 (0.61, 0.98)	0.035	0.77 (0.60, 0.98)	0.036	0.80 (0.62, 1.03)	0.087
Rubidio (Rb)	0.83 (0.61, 1.12)	0.213	0.89 (0.65, 1.22)	0.453	0.94 (0.69, 1.28)	0.69
Arsénico (As)	0.77 (0.62, 0.97)	0.028	0.83 (0.65, 1.05)	0.116	0.80 (0.63, 1.01)	0.065
Estaño (Sn)	0.92 (0.70, 1.22)	0.563	0.97 (0.73, 1.30)	0.835	1.01 (0.76, 1.33)	0.948
Cesio (Cs)	0.99 (0.88, 1.11)	0.833	0.98 (0.86, 1.11)	0.698	0.94 (0.82, 1.07)	0.360
Titanio (Ti)	1.00 (0.77, 1.30)	0.992	0.98 (0.74, 1.29)	0.864	1.07 (0.82, 1.40)	0.617
Plomo (Pb)	0.85 (0.64, 1.11)	0.228	0.78 (0.58, 1.05)	0.096	0.90 (0.65, 1.23)	0.493
Antimonio (Sb)	0.89 (0.72, 1.11)	0.294	0.90 (0.72, 1.13)	0.373	0.91 (0.73, 1.14)	0.422
<i>Orina</i>						
Bario (Ba)	0.80 (0.64, 1.00)	0.055	0.88 (0.69, 1.11)	0.276	0.90 (0.70, 1.16)	0.406
Estroncio (Sr)	0.86 (0.67, 1.11)	0.232	0.95 (0.73, 1.23)	0.674	0.95 (0.71, 1.27)	0.717
Rubidio (Rb)	1.00 (0.80, 1.26)	0.974	0.98 (0.78, 1.24)	0.888	0.98 (0.76, 1.26)	0.856
Arsénico (As)	1.16 (0.92, 1.48)	0.204	1.15 (0.91, 1.47)	0.233	1.16 (0.91, 1.50)	0.227
Estaño (Sn)	0.85 (0.67, 1.09)	0.192	0.90 (0.70, 1.16)	0.405	1.03 (0.80, 1.33)	0.802
Cesio (Cs)	0.95 (0.78, 1.16)	0.616	0.97 (0.80, 1.19)	0.798	0.95 (0.77, 1.18)	0.653
Mercury (Hg)	1.08 (0.81, 1.42)	0.601	1.02 (0.77, 1.35)	0.870	1.01 (0.75, 1.35)	0.961
Plomo (Pb)	1.03 (0.78, 1.37)	0.810	1.06 (0.80, 1.41)	0.672	1.04 (0.76, 1.42)	0.805

Los datos fueron ajustados por edad (continua), IMC (continua), raza/etnicidad y tabaquismo (alguna vez, nunca). Los datos se presentan como la diferencia entre los percentiles 20 y 80, que fueron respectivamente: 1.5 y 2.8 ng/mL para el bario, 22.04 y 34.21 ng/mL para el estroncio, 103.20 y 134 ng/mL para el rubidio, 1.2 y 2.99 ng/mL para el mercurio, y 2.12 y 3.10 ng/mL para el titanio, cuantificados en el líquido folicular; 19.99 y 30.1 ng/mL para el bario, 31.02 y 45.39 ng/mL para el estroncio, 264.72 y 578.41 ng/mL para el rubidio, 3.43 y 5.29 ng/mL para el arsénico, 6.58 y 14.82 ng/mL para el estaño, 2.46 y 3.93 ng/mL para el cesio, 328.86 y 908.27 ng/mL para el titanio, 3.06 y 5.65 ng/mL para el plomo, y 6.47 y 14.11 ng/mL para el antimonio, cuantificados en plasma; 0.72 y 3.24 ng/g CR para el bario, 53.79 y 190.25 ng/g CR para el estroncio, 924.42 y 1885.94 ng/g CR para el rubidio, 6.22 y 38.89 ng/g CR para el arsénico, 0.54 y 2.01 ng/g CR para el estaño, 4.37 y 8.29 ng/g CR para el cesio, 6.73 y 21.76 ng/g CR para el titanio, 0.63 y 2.40 ng/g CR para el mercurio, y 0.26 y 1.13 ng/g CR para el plomo, cuantificados en orina tras la corrección por creatinina.

6.4. Asociación de las concentraciones de elementos traza no esenciales con los resultados clínicos del tratamiento de FIV

Al evaluar la relación entre las concentraciones de elementos traza no esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica con las variables clínicas del tratamiento de FIV, se observaron asociaciones negativas para las concentraciones de bario y estaño medidas en orina.

En concreto, en los modelos ajustados por edad, IMC, raza/etnicidad y tabaquismo, el incremento en la concentración de bario en orina se asoció significativamente con menor probabilidad de recién nacido vivo (OR (95% CI): 0.5 (0.24, 0.95), p valor: 0.049) y éxito reproductivo (OR (95% CI): 0.49 (0.23, 0.91), p valor: 0.036). En este sentido, tras el mismo tipo de ajuste también se asoció una mayor concentración de estaño en orina con un descenso en la probabilidad de éxito reproductivo (OR (95% CI): 0.5 (0.25, 0.95), p valor: 0.042) (Figura 21, Tabla S19).

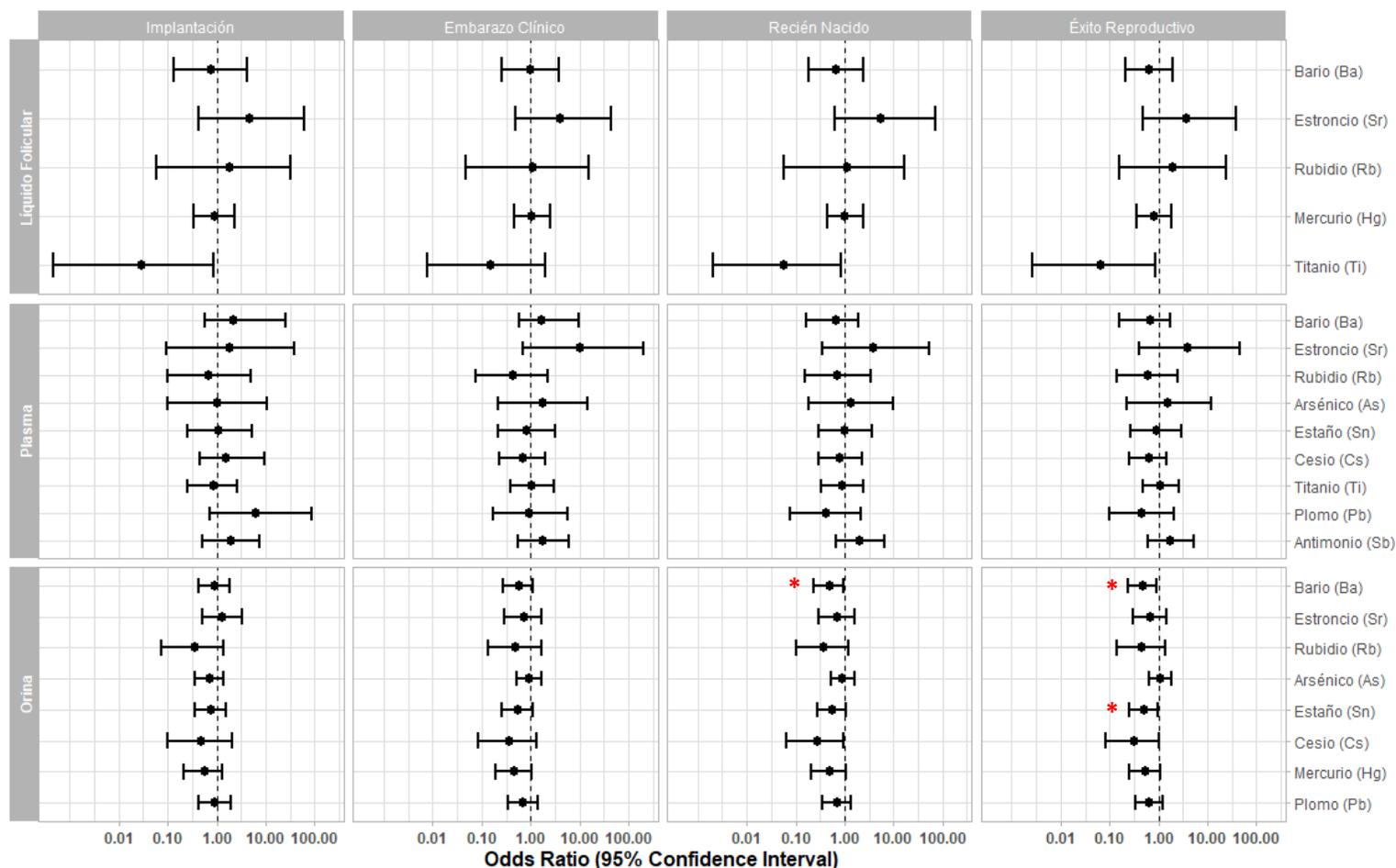


Figura 21. Diagrama de bosque para las asociaciones entre las concentraciones de elementos traza no esenciales y los resultados clínicos de FIV. Las asociaciones se representan por sus Odds Ratio con intervalos de confianza (CI) del 95% a partir de modelo ajustados por edad, ICM, raza/etnicidad y tabaquismo, para cada uno de los compuestos en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica. Los resultados incluyen probabilidad de implantación, embarazo clínico y nacimiento de un recién nacido vivo en aquellas participantes que tuvieron transferencia de un solo embrión congelado y la probabilidad de nacimiento de un recién nacido vivo en todas las participantes (éxito reproductivo). Las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representan con un asterisco rojo.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Diseño del estudio

En este estudio hemos evaluado una cohorte de sesenta mujeres que acudían a someterse a un tratamiento de FIV con DGP-A y transferencia en diferido de un único embrión euploide. La selección tan específica de estas participantes, con una estimulación ovárica y procedimientos embriológicos similares, nos ha permitido evaluar variables (como las tasas de fecundación, llegada a blastocisto, o ploidía embrionaria) que de forma normal no serían monitorizables. De hecho, la transferencia en diferido de un único embrión euploide nos ha permitido incrementar el peso de la función endometrial respecto a la función embrionaria a la hora de evaluar el impacto de la exposición a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la implantación embrionaria. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados de este estudio pueden no ser fácilmente generalizables para mujeres fértiles e incluso para mujeres infértiles que no estén sometidas a un tratamiento de FIV con estas características.

Además, aunque hemos evaluado entre dos y tres matrices biológicas, todas fueron tomadas el día de la punción ovárica, lo que puede no ser reflejo de la situación de las participantes en todos los momentos del procedimiento. En el caso de los compuestos con una vida media corta, esta limitación puede haber conducido a un error de medida por el que las asociaciones existentes se hayan visto atenuadas.

Pensando un poco más a largo plazo, aunque hubiéramos podido monitorizar a las participantes durante todo su tratamiento de reproducción asistida, se ha descrito que los contaminantes ambientales pueden afectar al organismo en múltiples ventanas de susceptibilidad, entre los que destaca el desarrollo embrionario y peri-puberal como los más sensibles, y pudiendo llegar a transmitirse durante generaciones. Por ejemplo, los oocitos quedan detenidos en el principio de la metafase II en el periodo fetal y se mantienen así hasta que su folículo es activado, siendo susceptibles a los efectos de diversos compuestos ambientales durante toda la vida. Por este motivo, la evaluación en la edad adulta puede tener un efecto pronóstico limitado, aunque hemos observado asociaciones interesantes.

A la hora de interpretar estos resultados también hay que tener en cuenta las diferencias temporales y geográficas entre estudios. Así, pueden ser reflejo del impacto de distintas medidas regulatorias de estos compuestos (como en el caso del plomo o el cadmio, cuyos niveles de exposición han descendido dramáticamente en el último siglo (Lee *et al.*, 2020; Tellez-Plaza *et al.*, 2012)), de la presencia de fuentes específicas de algún tipo de compuesto (como actividades económicas específicas, accidentes, residencia en zonas urbanas o rurales), de la gran variabilidad de diferencias raciales y étnicas, hábitos dietéticos y otros factores de estilo de vida que afecten tanto la exposición a contaminantes ambientales (James-Todd *et al.*, 2016) como las probabilidades de recién nacido vivo tras el tratamiento de FIV (Humphries *et al.*, 2016; McQueen *et al.*, 2015).

El número de participantes incluido en nuestro estudio es limitado, situándose por debajo de muchos otros trabajos con un enfoque similar en el que se han evaluado unos cientos de participantes. Sin embargo, gracias a este diseño hemos podido eliminar múltiples variables de confusión derivadas de la selección de las participantes (mujeres con infertilidad primaria, iatrogénica) y los procedimientos del tratamiento de FIV (mismo tipo de estimulación hormonal, técnica de fecundación, desarrollo hasta blastocisto, DGP-A, transferencia en diferido de un único embrión euploide), lo que aporta robustez a nuestros resultados.

Además de esta selección tanto en las participantes como en los procedimientos del tratamiento de FIV para homogeneizar al máximo nuestra población de estudio, hemos tenido en cuenta variables de confusión como la edad, el IMC, la raza/etnicidad y el estatus de tabaquismo como covariables en los modelos, ya que son factores bien establecidos que pueden afectar tanto los niveles de exposición a los contaminantes ambientales como los resultados de la FIV (Luke *et al.*, 2012; Sermondade *et al.*, 2019). Sin embargo, no hemos tenido en cuenta otros factores de confusión biológicos, como la modificación del efecto debido a causas genética (por ejemplo, polimorfismos de genes del sistema de detoxificación) (Syrkasheva *et al.*, 2021), la dieta o a la presencia conjunta de micronutrientes protectores (por ejemplo, la vitamina D o los ácidos grasos poliinsaturados omega-3) (Lass and Belluzzi, 2019; Makieva *et al.*, 2020) que pueden dar lugar a un sesgo de atenuación o a la anulación de las asociaciones (Cano-Sancho and Casas, 2020).

En este estudio hemos incluido la variable éxito reproductivo, en la que se incorporaron los tratamientos en los que no se obtuvieron embriones euploides o estos no fueron viables. Hemos agregado esta variable siguiendo la argumentación de Messerlian y Gaskins (Messerlian and Gaskins, 2017). Según estos autores, la exclusión de estos tratamientos, que pueden representar el 10-20% de los ciclos, puede conducir a un sesgo si la exposición de interés se asocia con un fracaso temprano de las técnicas de reproducción asistida (p. ej., no obtener oocitos maduros, fallos de fecundación o ausencia de embriones euploides).

Por último, en este estudio no hemos evaluado la aportación del factor masculino, aunque este juega un papel clave en las probabilidades de recién nacido vivo tras el tratamiento de reproducción asistida. Aunque en la actualidad está más que demostrado el impacto negativo de múltiples contaminantes ambientales sobre la calidad seminal (Krzastek *et al.*, 2020), habría sido muy interesante poder evaluar el efecto conjunto y el grado de impacto de cada uno de los factores.

2. Metodología del estudio

Entre el gran número de familias de compuestos ambientales y procedentes de la dieta susceptibles de afectar la fertilidad humana y los resultados de los tratamientos de FIV, nos centramos en un número limitado de metabolitos de fitoestrógenos, parabenos, ftalatos, y un amplio panel de elementos traza, tanto esenciales como no esenciales, por ser compuestos escasamente evaluados con relación a este tipo de variables en el momento de inicio de este proyecto.

Sin embargo, sería interesante ampliar el análisis en nuestra población a un mayor número de metabolitos para las familias evaluadas e incorporar otras familias de contaminantes, como POPs (PCBs, pesticidas, etc), triclosan, micotoxinas, etc.

Con el gran desarrollo de tecnologías que se está produciendo en los últimos años, la generalización de los espectrómetros de masas de alta resolución en los laboratorios de investigación y de los servicios analíticos (p. ej. Qq-TOF-MS, Orbitrap, FT-ICR-MS) está comenzando a facilitarse la identificación de contaminantes ambientales en distintas matrices biológicas (Metcalf *et al.*, 2022). Aun así, para cubrir el amplio espectro de estos compuestos es necesario llevar a cabo en paralelo separaciones cromatográficas, tanto líquida para los

compuestos menos volátiles como gaseosa para los compuestos más volátiles, antes de la detección por espectrometría de masas (Metcalf *et al.*, 2022). Además, las técnicas de ionización varían según los compuestos a evaluar y el tipo de instrumento de espectrometría de masas y en la actualidad no hay casi estándares comerciales ni sustitutos marcados isotópicamente para la cuantificación de múltiples compuestos diana (Metcalf *et al.*, 2022). Por lo tanto, aunque se están realizando esfuerzos en este sentido, la cuantificación no dirigida de posibles contaminantes ambientales en muestras biológicas continúa resultando un reto para los químicos analíticos, por lo que en la actualidad existe una limitación tecnológica a la hora de obtener esta información.

Además, como en la mayoría de los estudios disponibles hasta el momento, generalmente hemos considerado cada compuesto como variables de exposición independientes; aunque en el caso de los fitoestrógenos y los parabenos hemos considerado también la suma de los congéneres evaluados. Sin embargo, este enfoque es poco realista teniendo en cuenta que diariamente y a lo largo de la vida nos encontramos expuestos a una mezcla múltiple y dinámica de compuestos ambientales, y que estos compuestos pueden actuar de forma tanto sinérgica como antagónica. Además, como hemos podido observar en las correlaciones globales y se ha descrito en otros estudios, gran parte de los compuestos ambientales se encuentran incluidos en mezclas complejas de sustancias altamente correlacionadas con propiedades fisicoquímicas similares. Para afrontar estas limitaciones metodológicas intrínsecas, en la última década se están desarrollando distintos enfoques estadísticos para el modelado de múltiples contaminantes, mediante la adaptación de técnicas de otros campos o el desarrollo de nuevas metodologías. Parte de estas nuevas metodologías están descritas en el manual editado por la doctora Andrea Bellavia (Bellavia *et al.*, 2019). Sin embargo, aunque hemos aplicado esta metodología hasta el punto de que nuestros datos nos lo han permitido, el modesto tamaño de nuestra muestra no ha permitido que pudiéramos hacer converger estos modelos, ya que requieren una vasta cantidad de datos. Por poner en contexto, Chung *et al.* calcularon un tamaño muestral mínimo de aproximadamente 2 700 participantes para poder establecer conexiones claras y significativas entre la exposición a una mezcla bastante detallada de DE y los parámetros seminales mediante este tipo de aproximaciones (Chung *et al.*, 2019).

Por lo tanto, a la hora de embarcarse en un proyecto de este calibre, con el desarrollo técnico existente en la actualidad es necesario poder disponer de grandes recursos materiales, instrumentales y estadísticos para poder evaluar en una población extensa el mayor número de contaminantes ambientales y de esta forma generar información sólida.

3. Resultados del estudio

Tras discutir y contextualizar las particularidades, tanto de diseño como metodológicas, del estudio en el que se enmarca la presente tesis doctoral, pasamos a discutir los resultados del estudio, para cada uno de los tipos de compuestos ambientales y procedentes de la dieta evaluados en mujeres sometidas a tratamientos de FIV, y a relacionarlos con otros estudios.

3.1. Impacto de las concentraciones de fitoestrógenos sobre los resultados de FIV

Tras comparar los resultados del tratamiento de FIV de sesenta mujeres que tuvieron un tratamiento de DGP-A con SET/FET con las concentraciones de fitoestrógenos en líquido folicular y orina obtenidos el día de la punción ovárica, observamos que mayores concentraciones de fitoestrógenos mostraban asociaciones positivas estadísticamente significativas con variables de reserva ovárica, respuesta ovárica a la estimulación hormonal y variables embriológicas del ciclo de FIV. Además, la suma de fitoestrógenos presentes en ambas matrices biológicas favorecieron significativamente los resultados clínicos del tratamiento de FIV tras el SET/FET y la probabilidad de tener un recién nacido vivo por cada ciclo iniciado.

Hasta dónde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que directamente se relaciona la presencia de fitoestrógenos en matrices biológicas femeninas con los resultados del tratamiento de FIV. Las concentraciones urinarias de daidzeína y genisteína halladas en nuestra población fueron similares a las descritas en la población general de EEUU (Sun *et al.*, 2020). Nuestros resultados coinciden con un estudio observacional previo, con 315 mujeres subfértiles procedentes de EEUU que en conjunto se realizaron 530 ciclos de reproducción asistida, en el que se informó de una asociación positiva estadísticamente significativa entre el consumo de soja a través de la dieta y las ratios de fecundación, embarazo y recién nacido vivo (Vanegas *et al.*, 2015). Además, en el estudio clínico aleatorizado realizado por Shahin *et al.* se evaluó el impacto de la suplementación con fitoestrógenos (120 mg/día

durante los primeros 12 días del ciclo) en 147 mujeres con infertilidad de causa desconocida en un tratamiento de coito programado. Las mujeres que recibieron la suplementación con fitoestrógenos, además de la estimulación ovárica con citrato de clomifeno, mostraron tasas de embarazo clínico significativamente superiores a aquellas que no recibieron la suplementación junto con la estimulación ovárica (Shahin *et al.*, 2009). De forma similar, en el ensayo clínico aleatorizado realizado por Unfer *et al.* con 213 mujeres, que en conjunto participaron en 284 ciclos de FIV, se informó de un incremento significativo de las tasas de implantación, embarazo clínico, y embarazo en marcha/recién nacido vivo en mujeres que recibieron soporte en fase lútea con una suplementación diaria de isoflavonas (1 500 mg/día), comparado con aquellas a las que se les suministró placebo junto al soporte en fase lútea (Unfer *et al.*, 2004).

Los resultados de los dos ensayos clínicos, en los que se evaluaron los beneficios potenciales de la suplementación con fitoestrógenos, sugieren que estos compuestos pueden actuar a través de mecanismos moduladores de la respuesta endometrial a estrógenos, ya que en ambos estudios se observaron incrementos en el grosor endometrial tras la suplementación con fitoestrógenos (Shahin *et al.*, 2009; Unfer *et al.*, 2004). Esta observación puede tener sentido en el contexto de ambos estudios, ya que se las participantes se sometieron a una estimulación ovárica con citrato de clomifeno, que puede ejercer un efecto deletéreo sobre la función endometrial (Montenegro *et al.*, 2021). De hecho, en el estudio de Vanegas *et al.* no se observó un mayor grosor endometrial en aquellas mujeres que informaron de un mayor consumo de soja (Vanegas *et al.*, 2015). Con nuestro diseño de estudio, los potenciales efectos de confusión de la estimulación hormonal sobre la receptividad endometrial fueron prevenidos mediante la realización de una transferencia embrionaria en diferido. Además, la transferencia de un único embrión euploide previno de sesgos por posibles fallos de implantación de origen embrionario, lo que nos permite evaluar de forma fiable la función endometrial. Los hallazgos de este estudio implican que el consumo de fitoestrógenos puede mejorar la función endometrial durante la implantación, además de estar implicados en otros mecanismos que faciliten el mantenimiento del embarazo.

Basándonos en la premisa de que una mejor competencia oocitaria puede ser parcialmente responsable de los resultados clínicos observados por Vanegas *et al.*,

postulamos que, en nuestra cohorte femenina, aquellas participantes con mayores concentraciones de fitoestrógenos el día de la punción ovárica presentan una mejor respuesta ovárica, con mayor maduración oocitaria y tasas de fecundación. De hecho, la teoría de que la administración de fitoestrógenos tiene efectos positivos sobre la función ovárica queda reforzada por un ensayo clínico en el que se observaron mejoras en la ovulación y la producción de estradiol en mujeres anovuladoras con una suplementación diaria de 6 g de polvo de soja negra (Kohama *et al.*, 2005).

Finalmente, los fitoestrógenos también pueden tener un efecto protector sobre la función reproductiva femenina. Además de los beneficios de la suplementación con fitoestrógenos sobre la función endometrial de mujeres tratadas con citrato de clomifeno que previamente discutidos, en un estudio observacional en humanos y en experimentos preclínicos con roedores se ha descrito que dietas ricas en soja contrarrestan los efectos de sustancias con efecto disruptor endocrino como el BPA (Chavarro *et al.*, 2016; Muhlhauser *et al.*, 2009). También se ha descrito que los fitoestrógenos pueden tener un efecto protector contra la infertilidad iatrogénica causada por la irradiación pélvica (Haddad *et al.*, 2020).

Por este motivo, es necesario continuar ahondando en los mecanismos subyacentes a los efectos beneficiosos de los fitoestrógenos sobre los resultados del tratamiento de FIV.

3.2. Impacto de las concentraciones de parabenos sobre los resultados de FIV

También hemos evaluado la asociación entre las concentraciones de dos parabenos, Metil-parabeno y Propil-parabeno, en líquido folicular y orina obtenida el día de la punción ovárica con los resultados del tratamiento de FIV de sesenta mujeres sometidas a un tratamiento de DGP-A con SET/FET. No hemos observado ningún tipo de asociación entre las concentraciones de ambos parabenos, tanto en conjunto como cada uno de forma individual, con variables de reserva ovárica, respuesta a la estimulación ovárica ni parámetros embriológicos o clínicos del tratamiento de FIV.

Respecto a las variables de reserva ovárica, como hemos visto anteriormente, habitualmente se evalúa el AFC o la concentración de AMH. En el caso de los parabenos, se ha descrito una asociación entre mayores niveles urinarios de P-parabeno con un AFC disminuido (Jurewicz, Radwan, Wielgomas, Karwacka, *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2013), que en el caso del

trabajo de Jurewicz *et al.* no se veía asociado con el valor de AMH (Jurewicz, Radwan, Wielgomas, Karwacka, *et al.*, 2020). Dado que en este trabajo exclusivamente hemos evaluado el valor de AMH como marcador de reserva ovárica, no podemos descartar que en nuestra población también se observe el impacto negativo de los parabenos sobre el AFC, informado en estos trabajos. Estos datos refuerzan la necesidad de incorporar distintas variables (p. ej. AFC, AMH y FSH), a la hora de evaluar la reserva ovárica.

La relación entre la exposición a tres parabenos en orina con las variables embriológicas y clínicas del tratamiento de FIV ha sido previamente explorada en un trabajo (Mínguez-Alarcón, Chiu, *et al.*, 2016). Nuestros resultados coinciden con este estudio observacional previo, con 245 mujeres subfértiles sometidas a tratamientos de FIV, en el que no encontraron asociaciones de las concentraciones urinarias de M-parabeno, P-parabeno y B-parabeno con variables de respuesta a la estimulación ovárica, tasas de fecundación, calidad embrionaria, ni con las tasas de implantación, embarazo clínico, ni recién nacido vivo (Mínguez-Alarcón, Chiu, *et al.*, 2016). Por tanto, a la luz de la evidencia disponible, la exposición a parabenos no parece afectar los resultados del tratamiento de FIV.

3.3. Impacto de las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP sobre los resultados de FIV

Respecto a la exposición a ftalatos, hemos evaluado la asociación entre las concentraciones de MEHP, principal metabolito del ftalato mayoritario DEHP, en el líquido folicular y la orina obtenidos el día de la punción ovárica con los resultados del tratamiento de FIV de sesenta mujeres sometidas a un tratamiento de DGP-A con SET/FET. En este caso, solamente hemos observado que una mayor concentración de MEHP en orina se asocia con menores probabilidades de tener un recién nacido vivo y éxito reproductivo, sin verse afectadas otras variables de reserva ovárica, respuesta a la estimulación ovárica ni parámetros embriológicos u otras variables clínicas del tratamiento de FIV.

Como hemos visto anteriormente, la relación entre la presencia de distintos metabolitos de ftalatos en distintas matrices biológicas ha sido previamente relacionadas con distintas variables del tratamiento de FIV en otros trabajos (Al-Saleh, Coskun, Al-Doush, Abduljabbar, *et al.*, 2019; Begum *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2016, 2019; Hauser *et al.*, 2016;

Machtinger et al., 2018; Messerlian et al., 2016; Sacha et al., 2021), aunque con discrepancias tanto en los resultados como en los metabolitos implicados entre los distintos estudios.

Por lo que respecta a los resultados clínicos del tratamiento de FIV, de acuerdo con nuestros resultados, también se han relacionado niveles elevados de metabolitos de DEHP con menores tasas de embarazo clínico y recién nacido vivo (Al-Saleh, Coskun, Al-Doush, Abduljabbar, et al., 2019; Hauser et al., 2016; Mínguez-Alarcón et al., 2019).

Hemos de destacar que en este estudio hemos evaluado los niveles de un único metabolito de ftalato, el MEHP, mientras que en el resto de trabajos han sido evaluados entre 8 y 17 metabolitos de ftalato (Al-Saleh, Coskun, Al-Doush, Abduljabbar, et al., 2019; Begum et al., 2021; Deng et al., 2020; Hauser et al., 2016; Machtinger et al., 2018; Mínguez-Alarcón et al., 2019). En este estudio hemos seleccionado el MEHP por ser el metabolito primario del DEHP, el ftalato más comúnmente empleado y ampliamente distribuido. Esta elección deriva de que, al ser el metabolito de ftalato más abundante y preferentemente absorbido, es de los más frecuentemente detectados. Sin embargo, al igual que con otras clases de DEs, es importante señalar que la generalización sobre las acciones de los ftalatos como un único grupo colectivo pueden no ser apropiadas. Las discrepancias observadas entre estudios pueden tener su origen en los metabolitos de ftalato evaluados, además de en el contexto étnico y de estilo de vida de las participantes.

3.4. Impacto de las concentraciones de elementos traza esenciales sobre los resultados de FIV

Al evaluar la relación entre las concentraciones de elementos traza esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica con los resultados del tratamiento de FIV de las sesenta participantes que tuvieron un tratamiento de DGP-A con SET/FET, nuestros hallazgos sugieren que las concentraciones de elementos traza esenciales en diferentes matrices biológicas son capaces de influir en los resultados del tratamiento de FIV. En concreto, hemos observado asociaciones positivas estadísticamente significativas entre mayores concentraciones de cobre, evaluadas en líquido folicular y plasma, y manganeso, medido en plasma, con variables de respuesta ovárica y variables embriológicas del tratamiento de FIV. También hemos observado una mejora significativa de estas variables asociado con una mayor ratio de cobre/zinc en líquido folicular y plasma, junto con

asociaciones negativas estadísticamente significativas al medirse en la orina obtenida el día de la punción ovárica. Para el litio, hemos observado asociaciones negativas estadísticamente significativas de sus concentraciones, analizadas en líquido folicular, con las variables embriológicas del tratamiento de FIV. Respecto a las variables clínicas del tratamiento de FIV, hemos observado que las concentraciones urinarias de algunos elementos traza esenciales, especialmente el molibdeno, se asocian significativamente con menor probabilidad de que ocurran.

Además, gracias a la evaluación de los elementos traza en diferentes matrices biológicas, hemos sido capaces de evaluar la idoneidad de cada fluido para predecir distintos resultados y evaluar los más fácilmente obtenibles. De forma general hemos identificado correlaciones positivas entre algunos elementos traza (Cu, Cu/Zn, Se, Cr) en líquido folicular y plasma. Por el contrario, no hemos observado ninguna asociación entre las concentraciones de elementos traza esenciales en líquido folicular o plasma con aquellos observados en orina. Estos resultados parecen indicar que el plasma puede actuar como un sustituto más accesible que el líquido folicular para la detección de elementos traza esenciales, mientras que los resultados observados en orina pueden representar otras realidades biológicas, como un exceso de excreción.

Para contextualizar nuestros resultados, hemos identificado otros estudios en los que se ha evaluado el impacto de elementos traza esenciales en diferentes matrices biológicas procedentes de mujeres sometidas a tratamientos de FIV sobre sus resultados reproductivos (Abbood et al., 2017; Ingle et al., 2017; Sun et al., 2017; Tolunay et al., 2016; Wang, Liang, et al., 2021; Wdowiak et al., 2018). Sin embargo, en ninguno de estos estudios se ha examinado de forma simultánea tantas matrices biológicas para cada participante o tantos elementos traza esenciales, por lo que la información disponible hasta el momento es limitada y los hallazgos disponibles son inconsistentes entre estudios. Respecto a las concentraciones de elementos traza esenciales en líquido folicular y orina obtenidos en nuestro estudio, las concentraciones de las que informamos son similares a las descritas en estudios previos (Ingle et al., 2017). Nos llamó la atención el hecho de que en el caso del zinc, el elemento traza esencial más comúnmente evaluado en relación con los parámetros de FIV, las concentraciones que obtuvimos son sustancialmente más bajas que las descritas en algunos

trabajos (Sun et al., 2017; Tolunay et al., 2016), aunque nos encontramos en el rango observado en otros estudios (Ingle et al., 2017; Wang, Liang, et al., 2021). En el caso del litio, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se evalúa su concentración en alguna matriz biológica en relación con los resultados reproductivos. En algunas matrices biológicas, como el plasma, los elementos traza esenciales han sido escasamente investigados.

A continuación, nos centraremos en los elementos traza esenciales que han sido más relevantes en nuestra investigación, como el cobre, la ratio de Cu/Zn, el molibdeno, el manganeso y el litio.

El cobre es un elemento traza esencial que participa como cofactor estructural y/o regulatorio de numerosas proteínas, entre las que se incluyen la ceruloplasmina; enzimas relacionadas con reacciones de óxido-reducción como la superóxido dismutasa, la oxidasa de aminoácidos, la citocromo C oxidasa y la dopamina β -hidroxilasa; y neuropéptidos, entre ellos algunos implicados en el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (Carvalho et al., 2015; Michaluk and Kochman, 2007; Peacey et al., 2020). Además, se ha descrito que la deficiencia de cobre altera el metabolismo del colesterol (Carvalho et al., 2015). La principal fuente de exposición al cobre es la dieta, ya que se encuentra ampliamente distribuidos en varios alimentos, entre los que se incluye el hígado, los mejillones, las ostras, los cereales integrales, las nueces y el chocolate (Carvalho et al., 2015).

Disminuciones en los niveles plasmáticos de cobre han sido asociados con disminución de la fertilidad en animales (Khan et al., 2014). El impacto de las concentraciones de cobre en diferentes matrices biológicas, como el líquido folicular, plasma u orina, sobre las variables reproductivas de mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida ha sido evaluado previamente (Ingle et al., 2017; Sun et al., 2017; Tolunay et al., 2016; Wdowiak et al., 2018). Entre estos trabajos, Ingle et al. han descrito un incremento significativo del número total de oocitos recuperados asociado con las concentraciones urinarias de cobre (Ingle et al., 2017) y Sun et al. han observado una correlación positiva estadísticamente significativa entre las concentraciones de cobre en líquido folicular con el número de oocitos maduros y las tasas de fecundación (Sun et al., 2017). Estos resultados son consistentes con nuestras observaciones de que las mujeres con mayor concentración de cobre en líquido folicular y plasma muestran mejores resultados de punción ovárica y variables embriológicas del tratamiento de FIV. Estas

observaciones sugieren que una concentración óptima de cobre en el medio interno puede promover el crecimiento oocitario y mejorar la fecundación. Parte de los mecanismos subyacentes a estas mejoras puede estar relacionado con la secreción de hormonas reproductivas (Michaluk and Kochman, 2007; Peacey et al., 2020) o por un efecto directo sobre la maduración oocitaria, ya que la suplementación con cobre en el medio de maduración in vitro se ha visto que mejora la calidad oocitaria y el subsiguiente potencial embrionario (Choi et al., 2021; Gao et al., 2007).

El zinc es el elemento traza esencial más estudiado, por encima del cobre, en relación con los resultados de FIV, aunque los hallazgos son inconsistentes entre estudios (Abbood et al., 2017; Ingle et al., 2017; Sun et al., 2017; Tolunay et al., 2016; Wang, Liang, et al., 2021; Wdowiak et al., 2018). Como el cobre y el zinc tienen una relación metabólica muy cercana, con interacciones principalmente antagónicas, cualquier variación en alguno de estos elementos traza esenciales pueden alterar su balance (Osredkar, 2011; Thaker et al., 2019). Por esta razón se ha establecido que la ratio de Cu/Zn tiene un impacto clínico más relevante que la concentración individualizada de cada elemento (Osredkar, 2011).

Nuestros hallazgos muestran que una mayor ratio de Cu/Zn en líquido folicular y plasma se asocia con mejores resultados de la punción ovárica, principalmente en el número de oocitos recuperados, y mayor número de embriones euploides. Análogamente, una mayor ratio de Cu/Zn en la orina obtenida el día de la punción ovárica se asocia con peores resultados de punción ovárica y variables embriológicas del tratamiento de FIV. Esta observación tiene sentido, ya que la orina al ser un fluido de excreción puede estar reflejando un exceso de eliminación urinaria que pueda estar desequilibrando la ratio Cu/Zn endógena. Considerando que este es el primer trabajo en el que se evalúa esta relación en relación con la respuesta ovárica y variables embriológicas del tratamiento de FIV, no podemos contextualizar nuestros hallazgos con los obtenidos en otros estudios. Además de estas asociaciones, en un estudio previo se ha informado que una mayor ratio de Cu/Zn en mujeres embarazadas se asocian con menor probabilidad de aborto (Thaker et al., 2019), aunque nuestros datos no muestran ninguna asociación entre este parámetro y las variables clínicas del tratamiento de FIV.

Se necesitan investigaciones adicionales para contextualizar el significado biológico de estos hallazgos, ya que se ha descrito que durante el envejecimiento se inducen señales

metabólicas dirigidas a disminuir los niveles de zinc en plasma y a aumentar los de cobre como parte de un mecanismo para promover el mantenimiento y la reparación celular mediante el aumento de las defensas antioxidantes (Malavolta et al., 2015). Debemos tener en mente que nuestra población de estudio son mujeres subfértiles, cuyas necesidades reproductivas pueden reflejar una senescencia prematura del sistema reproductivo. Alternativamente, esta ratio puede ser también indicativa de una deficiencia nutricional de zinc (Osredkar, 2011). Las concentraciones de zinc halladas en nuestra población son similares a las descritas en otros estudios realizados en población sometida a tratamientos de FIV (Ingle et al., 2017; Wang, Liang, et al., 2021), aunque es destacable que las concentraciones observadas en líquido folicular son inferiores a las descritas en otros estudios (Sun et al., 2017; Tolunay et al., 2016). No obstante, se ha informado de que las concentraciones de cobre y zinc son más bajas en las mujeres que se someten a un tratamiento de FIV que en la población general (Grieger et al., 2019; Özkaya et al., 2011; Skalny et al., 2018). Por tanto, se necesita más investigación para discernir el papel de esta relación sobre la fertilidad femenina.

El molibdeno es un elemento traza esencial ya que participa como cofactor de diversas metaloenzimas con actividad oxidoreductasa (ATSDR, 2020; Carvalho et al., 2015). Se han descrito cuatro grupos de estas enzimas en humanos: la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la sulfito oxidasa y el componente reductor de la amidoxima mitocondrial. Estas enzimas están implicadas en el catabolismo de compuestos heterocíclicos, como las purinas y pirimidinas, y de aminoácidos azufrados, así como el metabolismo de aldehídos aromáticos, fármacos y toxinas (ATSDR, 2020; Carvalho et al., 2015). La población general obtiene el molibdeno a través de la dieta, siendo las principales fuentes de este elemento las legumbres, los cereales (y por tanto el pan y los productos horneados), las verduras de hoja verde, la leche, las vísceras (hígado, riñón) y los frutos secos (Carvalho et al., 2015).

Como el zinc, el molibdeno presenta un efecto antagónico con los niveles de cobre, con la excepción de que el consumo excesivo de molibdeno es capaz de inducir deficiencia de cobre (ATSDR, 2020; Vyskočil and Viau, 1999) y que niveles elevados de cobre son capaces de disminuir la toxicidad del molibdeno (Lyubimov et al., 2004; Meeker et al., 2008). Basándonos en esta interacción, al igual que para el zinc, además de evaluar las concentraciones absolutas, hemos incorporado en nuestros análisis la ratio Cu/Mo.

Aunque principalmente estudiado en relación con la fertilidad masculina (ATSDR, 2020; Lyubimov et al., 2004; Meeker et al., 2008), existen pocos estudios en los que se analice el impacto del molibdeno sobre la reproducción femenina. Ingle et al. también incorporó el molibdeno como uno de los elementos traza que evaluó en líquido folicular y orina procedentes de mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida. En este trabajo, los autores no observaron ninguna asociación entre las concentraciones de molibdeno con otros parámetros reproductivos más allá que un incremento significativo del número total de oocitos recuperados asociados con mayores concentraciones de molibdeno en orina (Ingle et al., 2017). Sin embargo, datos basados en un modelo murino sugieren que la exposición oral a molibdeno afecta la actividad estral y empeora la embriogénesis, posiblemente por afectación de las enzimas en las que el cobre actúa como cofactor (Fungwe et al., 1990).

En nuestro estudio, en el que evaluamos un modelo de transferencia embrionaria de un único embrión euploide en diferido, hemos observado que mayores concentraciones de molibdeno en orina obtenida el día de la punción oocitaria se asociaron con un descenso significativo de las probabilidades de implantación, embarazo clínico y recién nacido vivo. El hecho de que observemos tendencias similares para el molibdeno medido en líquido folicular refuerza nuestra idea de que el exceso de molibdeno presenta un potencial efecto perjudicial sobre la fertilidad femenina.

El manganeso es, junto con el cobre y el zinc, uno de los elementos traza esenciales más importantes en relación con la reproducción, ya que es un cofactor de numerosas enzimas, entre las que se incluyen algunas relacionadas con la modulación de la síntesis de hormonas esteroideas y como un componente de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa de manganeso (Carvalho et al., 2015; Studer et al., 2022). El manganeso está presente en la comida, especialmente en vegetales verdes, frutos secos, cereales y té (Carvalho et al., 2015). Se ha informado que el consumo de manganeso inferior a 1.8 mg al día se asocia con un incremento del riesgo de anovulación (Kim et al., 2018). Estos hallazgos son consistentes con nuestras observaciones, en las que hemos observado mejores resultados de la punción ovárica y variables embrionarias del tratamiento de FIV asociados con mayores concentraciones de manganeso en plasma. Por el contrario, Ingle et al. han informado que una mayor concentración de manganeso en líquido folicular se asocia con menor número de oocitos

maduros, mientras que mayores concentraciones de manganeso en orina se asocian con un mayor número de oocitos maduros (Ingle et al., 2017). Lamentablemente, en nuestra población la concentración de manganeso estaba por debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras de orina y líquido folicular, por lo que no podemos contextualizar estas observaciones.

El litio es un elemento natural que, aunque ampliamente empleado en psicofarmacología, también se encuentra presente de forma natural en todos los órganos y tejidos humanos (Enderle et al., 2020; Schrauzer, 2002; Szklarska and Rzymiski, 2019). La principal fuente no farmacológica de exposición al litio es la dieta, ya que se han descrito cantidades variables en alimentos, principalmente cereales y verduras, y en el agua de diferentes zonas (Enderle et al., 2020; Szklarska and Rzymiski, 2019). El litio es absorbido en el tracto intestinal, distribuido por los fluidos biológicos y excretado a través de los riñones (Szklarska and Rzymiski, 2019). Aunque la inclusión del litio como un elemento traza esencial es controvertida (Szklarska and Rzymiski, 2019), lo hemos introducido en esta sección debido a la ausencia de investigaciones que evalúen su impacto en la reproducción femenina, ya que se ha informado de resultados que sugieren que el aumento de la exposición al litio tiene efectos secundarios indeseables en la reproducción femenina (Acevedo et al., 2007; Bai et al., 2018; Li et al., 2014; Mirakhori et al., 2013; Uzbekova et al., 2009). Concretamente, en modelos animales se ha descrito que el cloruro de litio puede inhibir la foliculogénesis ovárica, promover la atresia folicular y perjudicar el desarrollo embrionario (Acevedo et al., 2007; Mirakhori et al., 2013; Uzbekova et al., 2009). Además, tanto en modelos animales como en modelos in vitro se ha demostrado que parte del mecanismo de daño deriva de su capacidad para interferir en la producción de hormonas esteroideas (Bai et al., 2018; Li et al., 2014; Uzbekova et al., 2009). En consonancia con estos hallazgos anteriores, nuestros datos también sugieren un efecto deletéreo del aumento de los niveles de litio sobre la foliculogénesis y la competencia embrionaria en poblaciones humanas, a concentraciones alcanzables por la población general. A la vista de estos datos, consideramos la importancia de una gestión adecuada del litio (Neri et al., 2018), tanto farmacológica como ambiental, para identificar posibles fuentes ocultas de exposición y establecer límites mínimos de seguridad reproductiva para su uso.

3.5. Impacto de las concentraciones de elementos traza no esenciales sobre los resultados de FIV

También evaluamos la relación entre las concentraciones de elementos traza no esenciales en líquido folicular, plasma y orina obtenidos el día de la punción ovárica con los resultados del tratamiento de FIV en las sesenta participantes. En este caso hemos incorporado algunos elementos traza no esenciales que generalmente no han sido evaluados en relación con resultados reproductivos, como estroncio, bario, rubidio, estaño, cesio o antimonio.

De forma general, no hemos observado asociaciones para los elementos traza no esenciales habitualmente relacionados con peores parámetros reproductivos (comúnmente denominados metales pesados o metales tóxicos) (cadmio, plomo, mercurio) con los resultados clínicos de nuestra población. Respecto al cadmio, desafortunadamente los valores en nuestra población se encontraban por debajo de nuestro límite de detección. Sí hemos hallado asociaciones significativamente negativas entre la concentración de bario en líquido folicular y la respuesta a la estimulación ovárica y los resultados embriológicos del tratamiento de FIV y entre la concentración de bario en orina y menor probabilidad de recién nacido vivo y éxito reproductivo. También destacamos las asociaciones negativas entre la concentración de estroncio en líquido folicular con la concentración de AMH, la frecuencia relativa de oocitos maduros, la frecuencia relativa de embriones fecundados y la frecuencia relativa de llegada a blastocisto. Además, la concentración de estroncio en plasma también se asocia negativamente con la frecuencia relativa de llegada a blastocisto y la frecuencia relativa de embriones euploides. También hemos observado que mayores concentraciones de arsénico en plasma se asocian con menor número de oocitos recuperados, menor frecuencia relativa de oocitos maduros y menor frecuencia relativa de embriones fecundados. Por último, hemos observado que un incremento en la concentración de estaño en orina se asocia significativamente con menor probabilidad de éxito reproductivo.

El bario es un metal alcalino que por su gran reactividad química nunca se encuentra como un elemento libre, sino que se encuentra en forma de sales como sulfatos y carbonatos (Kravchenko et al., 2014; Peana et al., 2021). El bario se emplea en numerosas aplicaciones industriales. Las sales de bario (nitratos y sulfatos), son empleados en la producción de

plásticos, cerámicas, adhesivos, en los fluidos de perforación de pozos de petróleo y gas, como colorante verde en los fuegos artificiales mediante la combustión de nitrato y clorato de bario, como pigmento blanco en las pinturas o para conservar frescos antiguos. Los tintes para el cabello que contienen bario se utilizan en algunos países, y el sulfato de bario (BaSO_4) está permitido por la Directiva de Cosméticos de la Unión Europea y puede utilizarse como colorante en cosméticos y productos de cuidado personal (Kravchenko et al., 2014; Peana et al., 2021). Además, el estudio de nuevos materiales para aplicaciones médicas, industriales y tecnológicas ha conducido al desarrollo de nanopartículas basadas en BaSO_4 o compuestos de bario, lo que aumenta la posibilidad de contaminación ambiental (Kravchenko et al., 2014; Peana et al., 2021). Sin embargo, debería ser poco probable que la contribución total de fuentes no naturales de bario, como los cosméticos o la industria local, pueda ser lo suficientemente significativa como para explicar las altas concentraciones de este elemento encontradas en el cabello de la población durante varios cribados poblacionales. Es mucho más probable que la mayor parte provenga de la dieta o del agua potable, o de una combinación de ambas (Kravchenko et al., 2014; Peana et al., 2021).

La ingesta humana está relacionada con la absorción principalmente a través de los alimentos, y del agua potable en menor medida. Se ha evaluado que los alimentos, en general, contienen menos de 3 mg/100 g, excepto las nueces de Brasil (150-300 mg/100 g), mientras que el contenido en el agua potable es variable, dependiendo de la zona geográfica, pero se sitúa principalmente en el orden de decenas de microgramos por litro. Solo el pan contribuye a la ingesta diaria de bario en la dieta con un 20%. Los niveles medios de bario en los tejidos corporales se estiman en unos 20 mg (Kravchenko et al., 2014; Peana et al., 2021).

La absorción de los compuestos de bario en el torrente sanguíneo depende de la solubilidad del compuesto, ya que los compuestos altamente solubles (BaCl_2 y BaNO_3) son más fácilmente solubles en sangre que los compuestos insolubles (BaCO_3 y BaSO_4) (Al osman et al., 2019). El impacto de la presencia de bario en matrices biológicas femeninas ha sido evaluado en otros dos trabajos recientes (Jiang et al., 2022; Zhou et al., 2021). En concordancia con nuestros resultados, Jiang et al. ha informado que una mayor concentración de bario en sangre total se asocia con menor número de oocitos, tasa de fecundación y mayor tasa de arresto embrionario (Jiang et al., 2022). Por el contrario, en el estudio de Zhou et al. se informa de mayor cantidad de oocitos maduros y mayor tasa de llegada a blastocisto en las mujeres

más expuestas a bario, aunque desde nuestro punto de vista estos resultados deberían ser tomados con cautela, ya que también observan mejores resultados en las mujeres más expuestas a elementos tóxicos conocidos como plomo y mercurio (Zhou et al., 2021). Por último, en consonancia con nuestros hallazgos, en modelos animales se ha observado que la exposición a altas concentraciones de bario puede inducir alteraciones en la morfología ovárica, abortos espontáneos, restricción del crecimiento fetal, defectos neonatales y muerte neonatal (Kravchenko et al., 2014; Wang, Pi, et al., 2021).

El estroncio también es un metal alcalino que se encuentra de forma natural en el organismo a niveles traza. Aproximadamente el 99% del estroncio presente en el organismo es secuestrado en los huesos, ya que al formar cationes divalentes compite con el calcio (ATSDR, 2004). El estroncio puede exacerbar la enfermedad renal (Cohen-Solal, 2002), aunque en modelos animales no se han descrito síntomas de toxicidad causados por el consumo de estroncio a través de la dieta (ATSDR, 2004). Hay poca información disponible sobre la seguridad del estroncio respecto a los efectos sobre la reproducción y el desarrollo en humanos. Dado que el cloruro de estroncio generalmente se emplea *in vitro* en protocolos de activación oocitaria artificial, tanto para generar partenogenotas o para facilitar la fecundación embrionaria en casos de fallo de fecundación (Anifandis et al., 2019; Kaufman, 2018), ya que mimetiza los picos de calcio necesarios para la activación oocitaria, podemos hipotetizar que una mayor exposición a estroncio pueda competir con la señalización del calcio y afectar la función ovárica por una activación prematura de los folículos que conduzca a un proceso de agotamiento ovárico similar al descrito para algunos tóxicos ováricos.

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido que se encuentra de forma natural en la naturaleza y se encuentra en forma tanto orgánica como inorgánica (ATSDR, 2007). Las formas inorgánicas del arsénico son dañinas, mientras que la mayor parte de sus formas orgánicas son esencialmente inocuas (ATSDR, 2007). Sin embargo, hay pocos estudios que exploren los efectos del arsénico sobre la fertilidad humana, especialmente con los resultados de FIV. En nuestra población hemos observado que mayor concentración de arsénico en plasma se asocia con menor cantidad de oocitos totales y menor frecuencia relativa de oocitos maduros y de embriones fecundados. En los estudios previos en los que se ha explorado la asociación entre la exposición femenina a arsénico y los resultados del tratamiento de FIV no

se han observado asociaciones (Butts et al., 2021; García-Forteza et al., 2018; Jiang et al., 2022; Tolunay et al., 2016; Zhou et al., 2021), excepto en el estudio de Wu et al. en el que observaron menor calidad embrionaria en las mujeres más expuestas (Wu et al., 2020). Además, se ha informado que las mujeres embarazadas tienen una concentración media de arsénico en sangre significativamente menor que las pacientes no embarazadas (Tulić et al., 2019). Es necesario tener en cuenta que las concentraciones de arsénico medidas en nuestro estudio representan el contenido total de arsénico (en el que se incluyen tanto las formas inorgánicas, con mayor toxicidad, como las formas orgánicas, principalmente inocuas), lo que implica que podemos estar infraestimando o sobreestimando el impacto del arsénico. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la concentración de arsénico en sangre, el fluido en el que hemos observado las asociaciones, reflejaría mejor la exposición al arsénico inorgánico que su concentración en orina (Domingo-Relloso et al., 2022). Aun así, deberían conducirse nuevos estudios evaluando las distintas formas de arsénico.

El estaño es un metal blando que puede encontrarse en forma metálica, solo o en aleación como en el latón, el bronce o algunos materiales de soldadura, o formando compuestos con otros elementos químicos, tanto orgánicos como inorgánicos (ATSDR, 2005). El estaño metálico se emplea en el revestimiento de latas de alimentos, bebidas y aerosoles (ATSDR, 2005). Los compuestos inorgánicos del estaño se encuentran en pastas de dientes, perfumes, jabones, aditivos alimentarios y tintes; mientras que sus compuestos orgánicos, denominados organoestánicos, que se emplean para fabricar plásticos, envases de alimentos, tuberías de plástico, pesticidas, pinturas y repelentes de plagas (ATSDR, 2005; Graceli et al., 2013). Dado que exclusivamente hemos evaluado la presencia de iones de estaño, en este estudio no podemos distinguir entre las distintas formas en las que puede encontrarse el estaño en las distintas matrices biológicas. Nuestros hallazgos indican que mayores niveles de estaño se asocian con menores probabilidades de éxito reproductivo en las participantes, es decir menores probabilidades de tener un recién nacido vivo respecto al total de mujeres que comenzaron el tratamiento de FIV, sin afectar significativamente ninguna de las variables intermedias. Por lo tanto, podemos suponer que la exposición a estaño tiene pequeños efectos en varios hitos a lo largo del proceso de reproducción asistida que en su conjunto afectan los resultados reproductivos. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, el papel del estaño no ha sido evaluado en ninguna de sus formas en relación con los resultados de los

tratamientos de FIV. Sin embargo, el papel de compuestos organoestánicos sobre la implantación embrionaria ha sido evaluada en modelos animales conducidos por la División de Evaluación de Riesgos de Osaka (Japón). Sus resultados sugieren que la exposición a diferentes compuestos organoestánicos tiene efectos anti-fertilidad similares. Estos estudios concluyeron que la exposición a los compuestos organoestánicos durante las primeras etapas del embarazo afecta negativamente a la iniciación y el mantenimiento del mismo, caracterizándose por el aumento de las pérdidas tanto antes como después de la implantación (Ema, 1997; Ema et al., 1999; Ema and Harazono, 2000; Harazono et al., 1998).

Según este grupo, las anomalías reproductivas pueden deberse, al menos parcialmente, a la disminución de la capacidad de decidualización endometrial, inducida por una disminución de los niveles de progesterona circulante (Ema et al., 2003; Ema and Harazono, 2000; Ema and Miyawaki, 2002). La disminución de la decidualización podría conducir a un empeoramiento de la capacidad de iniciar y mantener un embarazo temprano, pero puede ser parcialmente revertida con la coadministración de progesterona exógena (Ema et al., 2003; Ema and Harazono, 2000; Ema and Miyawaki, 2002).

Estos resultados indican la necesidad de estudiar más en profundidad el papel de los distintos compuestos que contienen estaño sobre la fertilidad femenina, para intentar dilucidar los distintos puntos críticos que puedan estar viéndose ligeramente afectados e intentar eliminar el posible ruido de fondo derivado de otros compuestos de estaño que puedan no afectar la reproducción.

4. Fortalezas y limitaciones del estudio

Aunque ya han sido desgranadas en los apartados anteriores; a continuación, sintetizaremos las que consideramos son las principales limitaciones y fortalezas de la presente tesis doctoral.

Este trabajo presenta una serie de limitaciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar los resultados presentados. En primer lugar, es un estudio piloto en el que se ha reclutado un pequeño número de participantes, lo que limita el poder estadístico de las asociaciones identificadas. Asimismo, al haberse realizado sobre una población de mujeres subfértiles, los resultados no son extrapolables a la población general. Otra de las limitaciones

del diseño es que no se ha tenido en cuenta el impacto de las exposiciones paternas. También es necesario tener en cuenta que los resultados deben entenderse en el contexto del estilo de vida y el entorno de la población estudiada, por lo que podrían observarse resultados distintos en otras poblaciones. Finalmente, se ha tenido en cuenta de forma univariante un número limitado de compuestos en matrices biológicas obtenidas el día de la punción ovárica, por lo que la evaluación de otros compuestos, su comportamiento como mezclas, y sus concentraciones en otros periodos podría tener también relevancia a la hora de evaluar estas asociaciones.

Entre las fortalezas de este trabajo se incluye su diseño prospectivo, que minimiza la posibilidad de causación inversa. La evaluación de una población altamente seleccionada sujeta a procedimientos de laboratorio muy robustos, ha permitido reducir sesgos derivados de la heterogeneidad de los procedimientos que habitualmente se llevan a cabo en el laboratorio de reproducción asistida y ha permitido evaluar pasos críticos de la reproducción humana. Además, la realización de DGP-A ha asegurado la transferencia de un embrión euploide y la transferencia embrionaria en diferido ha suprimido el impacto de la estimulación ovárica sobre la función endometrial. Esto convierte a nuestro modelo en uno de los mejores disponibles para la evaluación del impacto de factores ambientales sobre los resultados clínicos del tratamiento de FIV. Otra de las fortalezas es la evaluación de los compuestos en distintas matrices biológicas, lo que nos ha permitido identificar el líquido folicular y plasma como aquellas que mejor reflejan las asociaciones observadas. Las observaciones de este estudio deben interpretarse con precaución, ya que no puede asegurarse causalidad en las relaciones observadas. Por este motivo, los resultados de este trabajo deberían confirmarse en una población más amplia y mediante estudios que exploren el mecanismo biológico subyacente.

5. Próximos pasos

Como hemos discutido anteriormente, en los últimos años se está produciendo una frenética evolución tanto en las metodologías, que comienzan a permitir la evaluación simultánea de una gran variedad de compuestos, como el aparato estadístico y computacional necesario para el modelado de múltiples contaminantes. Sin embargo, la cantidad de compuestos para las que se sospecha o conoce un efecto tóxico sobre la reproducción es tan

vasto y variable, tanto temporalmente como espacialmente, que la potencialidad de trasladar esta evaluación a la práctica clínica parece complicada. Por lo tanto, los efectos observados en este estudio y en el resto de los trabajos evaluados suponen la punta del iceberg en la evaluación de la influencia de los compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre la fertilidad humana y, en concreto, sobre los resultados del tratamiento de FIV en parejas subfértiles.

Existe la percepción generalizada, incluso por algunos profesionales de la salud, de que la exposición a contaminantes ambientales a dosis bajas tiene un efecto poco o nada relevante para la salud humana. En numerosas ocasiones se emplean como justificación las incongruencias observadas entre estudios. Esta ausencia de asociaciones fuertes contribuye a una actitud de permisividad gubernamental que dificulta el establecimiento de unos criterios mínimos en los que basar la regulación y el cambio legislativo, tanto local como global. Además, en ciertos casos en los que existe una respuesta gubernamental y social para prevenir la exposición a algunos de estos compuestos, como en el caso del BPA y los ftalatos, los efectos biológicos de sus sustitutos, BPS y BPF como sustitutos del BPA y DINCH como sustituto de los ftalatos, suelen estar menos estudiados y es probable que posteriormente se descubran efectos perjudiciales similares a los del compuesto prohibido (Eladak *et al.*, 2015; Mínguez-Alarcón, Souter, *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

Además, las diferencias gubernamentales a la hora de regular la exposición a estos compuestos y las dificultades en la implementación de estrategias de remediación (Aravind kumar *et al.*, 2022; Comber *et al.*, 2020; Negrete-Bolagay *et al.*, 2021), que han llevado a que en la actualidad se den procesos de amplificación de algunos contaminantes ambientales (Casas *et al.*, 2021), dificultan la solución de ese problema a corto plazo exclusivamente con este tipo de medidas (Petriello *et al.*, 2014).

Afortunadamente, aun con el gran número de compuestos exógenos que pueden estar afectando el correcto funcionamiento del organismo, han sido descritos ocho mecanismos generales de daño (Peters *et al.*, 2021), que pueden ser útiles a la hora de identificar biomarcadores de daño por causa ambiental y dianas terapéuticas que permitan revertir o paliar estos efectos. En otros campos se ha postulado el análisis de la metilación de ADN como un método factible a la hora de evaluar el impacto de contaminantes ambientales sobre el

organismo, en sustitución del estudio convencional de su concentración (Tapia-Orozco *et al.*, 2017). Además de esta marca epigenética, recientemente se han propuesto otros potenciales biomarcadores de exposición a contaminantes ambientales. Por ejemplo, se ha relacionado la exposición a metabolitos de ftalato con biomarcadores de estrés oxidativo tanto en líquido folicular como circulantes (Davalos *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2020) y la exposición a compuestos fenólicos y metabolitos de ftalato con alteraciones en la expresión de micro-ARNs presentes en las vesículas extracelulares del líquido folicular y relacionados con rutas implicadas en el desarrollo oocitario, su maduración y fecundación (Barnett-Itzhaki *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2019). De confirmarse estas relaciones con otros contaminantes ambientales, podría establecerse un panel clínico de evaluación de marcas epigenéticas, marcadores de estrés oxidativo y/o micro-ARNs que también podrían ayudar en la identificación de individuos con riesgo reproductivo de causa ambiental y a desarrollar estrategias de reversión.

Por este motivo, consideramos que el futuro de la evaluación del impacto de compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados del tratamiento de FIV debe ir acompañado por la búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas que permitan identificar mujeres o parejas con riesgo reproductivo por causa ambiental, para los que se desarrolle alguna clase de tratamiento que permita paliar o revertir estos efectos.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

De esta tesis doctoral pueden extraerse las siguientes conclusiones sobre la población evaluada de mujeres subfértiles sometidas a un tratamiento de fecundación *in vitro*:

1. La metodología aplicada en general ha permitido determinar las concentraciones de dos fitoestrógenos, dos parabenos y el metabolito de ftalato MEHP en líquido folicular y orina; y de diecinueve elementos traza en líquido folicular, plasma y orina.
2. Cada fitoestrógeno y parabeno cuantificado muestra correlaciones positivas estadísticamente significativas entre el líquido folicular y la orina. En el caso de los elementos traza, en general se observan correlaciones positivas estadísticamente significativas de sus concentraciones entre el líquido folicular y el plasma, pero no entre estas matrices biológicas y la orina.
3. Mayores concentraciones de fitoestrógenos en líquido folicular y orina se asocian significativamente con una mayor respuesta ovárica a la estimulación hormonal, mayor fecundación embrionaria y mejores resultados clínicos tras el tratamiento de fecundación *in vitro*.
4. Mayores concentraciones de elementos traza esenciales, como el cobre y la ratio cobre/zinc en líquido folicular y plasma, y el manganeso en plasma, se asocian significativamente con una mayor respuesta ovárica a la estimulación hormonal y mejores resultados embriológicos en el tratamiento de fecundación *in vitro*.
5. Mayores concentraciones de elementos traza, como el litio, el estroncio, el bario y el arsénico, en líquido folicular y/o plasma, se asocian significativamente con menor reserva ovárica, menor respuesta a la estimulación ovárica y peores resultados embriológicos en el tratamiento de fecundación *in vitro*.
6. Mayores concentraciones de molibdeno, bario y el metabolito de ftalato MEHP en orina se asocian significativamente con peores resultados clínicos tras el tratamiento de fecundación *in vitro*.
7. No se observan asociaciones entre las concentraciones de parabenos en líquido folicular u orina con las distintas variables del tratamiento de fecundación *in vitro* evaluadas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbood M, Burhan S, Ani N. Measurement of zinc concentration in serum and follicular fluid to assess its relation with oocyte and embryo quality in women undergoing intra cytoplasmic sperm injection. *Int J Adv Res* 2017;**5**:1333–1337.
- Acevedo N, Wang X, Dunn RL, Smith GD. Glycogen synthase kinase-3 regulation of chromatin segregation and cytokinesis in mouse preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2007;**74**:178–188.
- Adamczak R, Ukleja-Sokołowska N, Lis K, Dubiel M. Function of follicular cytokines: Roles played during maturation, development and implantation of embryo. *Med* 2021;**57**:1–10.
- Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* 2020;**159**:R189–R201.
- Aitken RJ. The changing tide of human fertility. *Hum Reprod* 2022;**37**:629–638.
- Al-Hussaini TK, Abdelaleem AA, Elnashar I, Shabaan OM, Mostafa R, El-Baz MAH, El-Deek SEM, Farghaly TA. The effect of follicular fluid pesticides and polychlorinated biphenyls concentrations on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryological and clinical outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;**220**:39–43.
- Al-Saleh I, Coskun S, Al-Doush I, Abduljabbar M, Al-Rouqi R, Al-Rajudi T, Al-Hassan S. Couples exposure to phthalates and its influence on in vitro fertilization outcomes. *Chemosphere* 2019;**226**:597–606.
- Al-Saleh I, Coskun S, Al-Doush I, Al-Rajudi T, Al-Rouqi R, Abduljabbar M, Al-Hassan S. Exposure to phthalates in couples undergoing in vitro fertilization treatment and its association with oxidative stress and DNA damage. *Environ Res* 2019;**169**:396–408.
- Al-Saleh I, Coskun S, El-Doush I, Billedo G, Mashhour A, Jaroudi K, Al-Shahrani A, Al-Mayman H, Mohamed G. Outcome of in-vitro fertilization treatment and DDT levels in serum and follicular fluid. *Med Sci Monit* 2009;**15**:320–333.
- Al-Saleh I, Coskun S, Mashhour A, Shinwari N, El-Doush I, Billedo G, Jaroudi K, Al-Shahrani A, Al-Kabra M, El Din Mohamed G. Exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) and its effect on the outcome of in-vitro fertilization treatment. *Int J Hyg Environ Health* 2008;**211**:560–579.
- Anagnostopoulou C, Maldonado Rosas I, Singh N, Gugnani N, Chockalingham A, Singh K, Desai D, Darbandi M, Manoharan M, Darbandi S, *et al.* Oocyte quality and embryo selection strategies: a review for the embryologists, by the embryologists. *Panminerva Med* 2022;**64**:171–184.
- Anifandis G, Michopoulos A, Daponte A, Chatzimeletiou K, Simopoulou M, Messini CI, Polyzos NP, Vassiou K, Dafopoulos K, Goulis DG. Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects. *Syst Biol Reprod Med* 2019;**65**:3–11.
- Aravind kumar J, Krithiga T, Sathish S, Renita AA, Prabu D, Lokesh S, Geetha R, Namasivayam SKR, Sillanpaa M. Persistent organic pollutants in water resources: Fate, occurrence, characterization and risk analysis. *Sci Total Environ* 2022;**831**:154808.

- Ashary N, Tiwari A, Modi D. Embryo Implantation: War in times of love. *Endocrinology* 2018;**159**:1188–1198.
- ATSDR (Agency for toxic substances and Disease). Toxicological profile for Strontium. In: Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service., 2004.
- ATSDR (Agency for toxic substances and Disease). Toxicological profile for Tin. In: Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service., 2005.
- ATSDR (Agency for toxic substances and Disease). Toxicological profile for Arsenic. In: Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service., 2007.
- ATSDR (Agency for toxic substances and Disease). Toxicological profile for Molybdenum. In: Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service., 2020.
- Awoniyi CA, Roberts D, Rao Veeramachaneni DN, Hurst BS, Tucker KE, Schlaff WD. Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil Steril* 1998;**70**:440–447.
- Azeh Engwa G, Udoka Ferdinand P, Nweke Nwalo F, N. Unachukwu M. Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. *Poisoning Mod World - New Tricks an Old Dog?* 2019.
- Bai L, Chang HM, Cheng JC, Chu G, Leung PCK, Yang G. Lithium chloride inhibits StAR and progesterone production through GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa-lutein cells. *Mol Cell Endocrinol* 2018;**461**:89–99.
- Barnett-Itzhaki Z, Knapp S, Avraham C, Racowsky C, Hauser R, Bollati V, Baccarelli AA, Machtinger R. Association between follicular fluid phthalate concentrations and extracellular vesicle microRNAs expression. *Hum Reprod* 2021;**36**:1590–1599.
- Barnier J, Briatte F, Larmarange J. questionr: Functions to Make Surveys Processing Easier. *R Packag version 077* 2022. Available at: <https://cran.r-project.org/package=questionr>.
- Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2020;**37**:89–100.
- Begum TF, Fujimoto VY, Gerona R, McGough A, Lenhart N, Wong R, Mok-Lin E, Melamed J, Butts CD, Bloom MS. A pilot investigation of couple-level phthalates exposure and in vitro fertilization (IVF) outcomes. *Reprod Toxicol* 2021;**99**:56–64.
- Bellavia A, James-Todd T, Williams PL. Approaches for incorporating environmental mixtures as mediators in mediation analysis. *Environ Int* 2019;**123**:368–374.
- Bellver J, Simón C. Implantation failure of endometrial origin: what is new? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2018;**30**:229–236.
- Bhatt SJ, Marchetto NM, Roy J, Morelli SS, McGovern PG. Pregnancy outcomes following in vitro fertilization frozen embryo transfer (IVF-FET) with or without preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) in women with recurrent pregnancy loss (RPL): a SART-CORS study. *Hum Reprod* 2021;**36**:2339–2344.

- Björvang RD, Hallberg I, Pikki A, Berglund L, Pedrelli M, Kiviranta H, Rantakokko P, Ruokojärvi P, Lindh CH, Olovsson M, *et al.* Follicular fluid and blood levels of persistent organic pollutants and reproductive outcomes among women undergoing assisted reproductive technologies. *Environ Res* 2022;**208**:112626.
- Björvang RD, Hassan J, Stefopoulou M, Gemzell-Danielsson K, Pedrelli M, Kiviranta H, Rantakokko P, Ruokojärvi P, Lindh CH, Acharya G, *et al.* Persistent organic pollutants and the size of ovarian reserve in reproductive-aged women. *Environ Int* 2021;**155**:106589.
- Bloom MS, Fujimoto VY, Steuerwald AJ, Cheng G, Browne RW, Parsons PJ. Background exposure to toxic metals in women adversely influences pregnancy during in vitro fertilization (IVF). *Reprod Toxicol* 2012;**34**:471–481.
- Bloom MS, Fujimoto VY, Storm R, Zhang L, Butts CD, Sollohub D, Jansing RL. Persistent organic pollutants (POPs) in human follicular fluid and in vitro fertilization outcomes, a pilot study. *Reprod Toxicol* 2017;**67**:165–173.
- Bloom MS, Kim D, Vom Saal FS, Taylor JA, Cheng G, Lamb JD, Fujimoto VY. Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2011;**96**:672-677.e2.
- Bloom MS, Parsons PJ, Steuerwald AJ, Schisterman EF, Browne RW, Kim K, Cocco GA, Conti GC, Narayan N, Fujimoto VY. Toxic trace metals and human oocytes during in vitro fertilization (IVF). *Reprod Toxicol* 2010;**29**:298–305.
- Bosch E, Broer S, Griesinger G, Grynberg M, Humaidan P, Kolibianakis E, Kunicki M, La Marca A, Lainas G, Le Clef N, *et al.* ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. *Hum Reprod Open* 2020;**2020**:1–13.
- Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: Analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod* 2010;**25**:2092–2100.
- Bracewell-Milnes T, Saso S, Abdalla H, Nikolau D, Norman-Taylor J, Johnson M, Holmes E, Thum MY. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: A systematic review. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:723–736.
- Brown J, Daya S, Matson P. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;**2017**.
- Butts CD, Bloom MS, McGough A, Lenhart N, Wong R, Mok-Lin E, Parsons PJ, Galusha AL, Browne RW, Yucel RM, *et al.* Toxic elements in follicular fluid adversely influence the likelihood of pregnancy and live birth in women undergoing IVF. *Hum Reprod Open* 2021;**2021**:1–14.
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, Bishop AM, Needham LL. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. *Environ Health Perspect* 2010;**118**:679–685.
- Cano-Sancho G, Casas M. Interactions between environmental pollutants and dietary nutrients: current evidence and implications in epidemiological research. *J Epidemiol Community Health* 2021;**75**:108-113.
- Carbonel AAF, Simões RS, Girão JHC, Da Silva Sasso GR, Bertoncini CRA, Sorpreso ICE, Soares JM, Simões MJ, Baracat EC. Isoflavones in gynecology. *Rev Assoc Med Bras* 2018;**64**:560–564.

- Carignan CC, Mínguez-Alarcón L, Butt CM, Williams PL, Meeker JD, Stapleton HM, Toth TL, Ford JB, Hauser R. Urinary Concentrations of Organophosphate Flame Retardant Metabolites and Pregnancy Outcomes among Women Undergoing in Vitro Fertilization. *Environ Health Perspect* 2017;**125**:087018.
- Carvalho DC, Coelho LM, Acevedo MSMSF, Coelho NMM. The oligoelements. *Handb Miner Elem Food* 2015:109–122.
- Carvalho F, Coonen E, Goossens V, Kokkali G, Rubio C, Meijer-Hoogeveen M, Moutou C, Vermeulen N, De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT⁺. *Hum Reprod Open* 2020;**2020**:1–12.
- Casas G, Martinez-Varela A, Vila-Costa M, Jiménez B, Dachs J. Rain Amplification of Persistent Organic Pollutants. *Environ Sci Technol* 2021; **55**:12961–12972.
- Chambers GM, Dyer S, Zegers-Hochschild F, de Mouzon J, Ishihara O, Banker M, Mansour R, Kupka MS, Adamson GD. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014. *Hum Reprod* 2021;**36**:2921–2934.
- Chavarro JE, Mínguez-Alarcón L, Chiu YH, Gaskins AJ, Souter I, Williams PL, Calafat AM, Hauser R. Soy intake modifies the relation between urinary bisphenol A concentrations and pregnancy outcomes among women undergoing assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:1082–1090.
- Chen HF, Chen M, Ho HN. An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2020;**59**:489–495.
- Choi H, Lee J, Yoon JD, Hwang SU, Cai L, Kim M, Kim G, Oh D, Kim E, Hyun SH. The effect of copper supplementation on in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation. *Theriogenology* 2021;**164**:84–92.
- Chung MK, Buck Louis GM, Kannan K, Patel CJ. Exposome-wide association study of semen quality: Systematic discovery of endocrine disrupting chemical biomarkers in fertility require large sample sizes. *Environ Int* 2019;**125**:505–514.
- Clift D, Schuh M. Restarting life: Fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;**14**:549–562.
- Cohen-Solal M. Strontium overload and toxicity: impact on renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2002;**17**:30–34.
- Comber SDW, Gardner MJ, Constantino C, Firth S, Hargreaves A, Davies R. Modelling scenarios of environmental recovery after implementation of controls on emissions of persistent organic pollutants. *Environ Sci Process Impacts* 2020;**22**:1865–1876.
- Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. In: StatPearls; Treasure Island (FL), 2022.
- Cummins JM. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum Reprod* 2000;**15**:92–101.

- Czubacka E, Wielgomas B, Klimowska A, Radwan M, Radwan P, Karwacka A, Kałużny P, Jurewicz J. Urinary bisphenol a concentrations and parameters of ovarian reserve among women from a fertility clinic. *Int J Environ Res Public Health* 2021;**18**:8041.
- D'Angelo A, Panayotidis C, Amso N, Marci R, Matorras R, Onofriescu M, Turp AB, Vandekerckhove F, Veleva Z, Vermeulen N, *et al.* Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up†. *Hum Reprod Open* 2019;**2019**:1–25.
- Davalos AD, Mínguez-Alarcón L, van t' Erve TJ, Keil AP, Williams PL, Meeker JD, Milne GL, Zhao S, Hauser R, Ferguson KK. Associations between mixtures of urinary phthalate metabolite concentrations and oxidative stress biomarkers among couples undergoing fertility treatment. *Environ Res* 2022;**212**:113342.
- Deng T, Du Y, Wang Y, Teng X, Hua X, Yuan X, Yao Y, Guo N, Li Y. The associations of urinary phthalate metabolites with the intermediate and pregnancy outcomes of women receiving IVF/ICSI treatments: A prospective single-center study. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020;**188**:109884.
- Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod* 2011;**26**:2593–2597.
- Dickerson EH, Sathyapalan T, Knight R, Maguiness SM, Killick SR, Robinson J, Atkin SL. Endocrine disruptor & nutritional effects of heavy metals in ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:1223–1228.
- Domingo-Relloso A, Bozack A, Kiihl S, Rodriguez-Hernandez Z, Rentero-Garrido P, Casasnovas JA, Leon-Latre M, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL, Moreno B, *et al.* Arsenic exposure and human blood DNA methylation and hydroxymethylation profiles in two diverse populations from Bangladesh and Spain. *Environ Res* 2022;**204**:112021.
- Doody KJ. Cryopreservation and delayed embryo transfer-Assisted reproductive technology registry and reporting implications. *Fertil Steril* 2014;**102**:27–31.
- Du Y, Guo N, Wang Y, Teng X, Hua X, Deng T, Yao Y, Yuan X, Li Y. Follicular fluid concentrations of phthalate metabolites are associated with altered intrafollicular reproductive hormones in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2019;**111**:953–961.
- Du YY, Fang YL, Wang YX, Zeng Q, Guo N, Zhao H, Li YF. Follicular fluid and urinary concentrations of phthalate metabolites among infertile women and associations with in vitro fertilization parameters. *Reprod Toxicol* 2016;**61**:142–150.
- Duffus JH. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2002;**74**:793–807.
- Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015;**103**:303–316.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009;**30**:624–712.
- Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Berry KF, Calafat AM, Ye X, Petrozza JC, Wright D, Hauser R. Urinary Bisphenol A Concentrations and Implantation Failure among Women Undergoing in Vitro Fertilization. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:978–983.

- Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Ye X, Calafat AM, Petrozza JC, Wright D, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2012;**27**:3583–3592.
- Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin M-J, N'Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V, Habert R. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril* 2015;**103**:11–21.
- Ema M. Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats. *Reprod Toxicol* 1997;**11**:201–206.
- Ema M, Harazono A. Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. *Reprod Toxicol* 2000;**14**:451–456.
- Ema M, Harazono A, Hirose A, Kamata E. Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. *Toxicol Lett* 2003;**143**:233–238.
- Ema M, Miyawaki E. Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. *Reprod Toxicol* 2002;**16**:309–317.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. *Toxicol Lett* 1999;**108**:17–25.
- Enderle J, Klink U, Di Giuseppe R, Koch M, Seidel U, Weber K, Birringer M, Ratjen I, Rimbach G, Lieb W. Plasma lithium levels in a general population: A cross-sectional analysis of metabolic and dietary correlates. *Nutrients* 2020;**12**:1–15.
- Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 2001;**16**:221–225.
- Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, Haahr T, Humaidan P. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol* 2018;**15**:535–562.
- Evans J, Hannan NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, Osianlis T, Salamonsen LA, Rombauts LJF. Fresh versus frozen embryo transfer: Backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:808–821.
- Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszky A. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2005;**1706**:158–164.
- Farquhar CM, Bhattacharya S, Repping S, Mastenbroek S, Kamath MS, Marjoribanks J, Boivin J. Female subfertility. *Nat Rev Dis Prim* 2019;**5**:7.
- Fauser BCJM. Predictors of ovarian response to ovarian stimulation: Progress towards individualized treatment in ovulation induction. *Curr Manag Polycystic Ovary Syndr* 2010;**14**:153–164.
- Franasiak JM, Alecsandru D, Forman EJ, Gemmell LC, Goldberg JM, Llarena N, Margolis C, Laven J, Schoenmakers S, Seli E. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2021;**116**:1436–1448.

- Frejka T, Jones GW, Sardon J-P. East Asian childbearing patterns and policy developments. *Popul Dev Rev* 2010;**36**:579–606.
- Fujimoto VY, Kim D, Vom Saal FS, Lamb JD, Taylor JA, Bloom MS. Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2011;**95**:1816–1819.
- Fungwe T V., Buddingh F, Demick DS, Lox CD, Yang MT, Yang SP. The role of dietary molybdenum on estrous activity, fertility, reproduction and molybdenum and copper enzyme activities of female rats. *Nutr Res* 1990;**10**:515–524.
- Gao G, Yi J, Zhang M, Xiong J, Geng L, Mu C, Yang L. Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, and apoptosis of blastocysts in vitro. *J Reprod Dev* 2007;**53**:777–784.
- García-Forteza P, Cohen-Corcía I, Córdoba-Doña JA, Reche-Rosado A, González-Mesa E. Toxic elements in hair and in vitro fertilization outcomes: A prospective cohort study. *Reprod Toxicol* 2018;**77**:43–52.
- Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. (Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds)). CRC Press, 2017.
- Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990;**110**:521–528.
- Glujovsky D, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Ciapponi A, Cornelisse S, Blake D. Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2022;**2022**.
- Goutam Mukherjee A, Ramesh Wanjari U, Renu K, Vellingiri B, Valsala Gopalakrishnan A. Heavy metal and metalloids - induced reproductive toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2022;**92**:103859.
- Governini L, Orvieto R, Guerranti C, Gambera L, De Leo V, Piomboni P. The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:415–418.
- Graceli JB, Sena GC, Lopes PFI, Zamprogno GC, da Costa MB, Godoi AFL, dos Santos DM, de Marchi MRR, dos Santos Fernandez MA. Organotin: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. *Reprod Toxicol* 2013;**36**:40–52.
- Green MP, Harvey AJ, Finger BJ, Tarulli GA. Endocrine disrupting chemicals: Impacts on human fertility and fecundity during the peri-conception period. *Environ Res* 2021;**194**:110694.
- Grieger JA, Grzeskowiak LE, Wilson RL, Bianco-Miotto T, Leemaqz SY, Jankovic-Karasoulos T, Perkin A V., Jankovic-Karasoulos T, Dekker GA, Roberts CT. Maternal selenium, copper and zinc concentrations in early pregnancy, and the association with fertility. *Nutrients* 2019;**11**:1–12.
- Guo Y, Kannan K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 2013;**47**:14442–14449.
- Haddad YH, Said RS, Kamel R, Morsy EME, El-Demerdash E. Phytoestrogen genistein hinders ovarian oxidative damage and apoptotic cell death-induced by ionizing radiation: co-operative role of ER- β , TGF- β , and FOXL-2. *Sci Rep* 2020;**10**:1–13.

- Harazono A, Ema M, Ogawa Y. Evaluation of Early Embryonic Loss Induced by Tributyltin Chloride in Rats: Phase- and Dose-Dependent Antifertility Effects. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998;**34**:94–99.
- Harper JC. Preimplantation genetic screening. *J Med Screen* 2018;**25**:1–5.
- Hart RJ. Physiological aspects of female fertility: Role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiol Rev* 2016;**96**:873–909.
- Hartwig A. Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function. *Antioxid Redox Signal* 2001;**3**:625–634.
- Hauser R, Gaskins AJ, Souter I, Smith KW, Dodge LE, Ehrlich S, Meeker JD, Calafat AM, Williams PL. Urinary phthalate metabolite concentrations and reproductive outcomes among women undergoing in vitro fertilization: Results from the EARTH study. *Environ Health Perspect* 2016;**124**:831–839.
- Hawkins SM, Matzuk MM. The menstrual cycle: Basic biology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1135**:10–18.
- Healy MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, DeCherney AH, Levy MJ, Hill MJ. Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles? *Fertil Steril* 2016;**105**:93-99.e1.
- Hirota Y. Progesterone governs endometrial proliferation/differentiation switching and blastocyst implantation. *Endocr J* 2019;**66**:199–206.
- Hliseníková H, Petrovičová I, Kolena B, Šidlovská M, Sirotkin A. Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *Int J Environ Res Public Health* 2020;**17**:6811.
- Hong A, Zhuang L, Cui W, Lu Q, Yang P, Su S, Wang B, Zhang G, Chen D. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) exposure in women seeking in vitro fertilization-embryo transfer treatment (IVF-ET) in China: Blood-follicular transfer and associations with IVF-ET outcomes. *Sci Total Environ* 2022;**838**:156323.
- Howie R, Kay V. Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Br J Hosp Med* 2018;**79**:194–199.
- Hu P, Vinturache A, Li H, Tian Y, Yuan L, Cai C, Lu M, Zhao J, Zhang Q, Gao Y, et al. Urinary organophosphate metabolite concentrations and pregnancy outcomes among women conceiving through in vitro fertilization in Shanghai, China. *Environ Health Perspect* 2020;**128**:097007-1-097007–13.
- Hua R, Zhou Y, Wu B, Huang Z, Zhu Y, Song Y, Yu Y, Li H, Quan S. Urinary triclosan concentrations and early outcomes of in vitro fertilization-embryo transfer. *Reproduction* 2017;**153**:319–325.
- Humphries LA, Chang O, Humm K, Sakkas D, Hacker MR. Influence of race and ethnicity on in vitro fertilization outcomes: systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2016;**214**:212.e1-212.e17.
- Iliodromiti S, Anderson RA, Nelson SM. Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:698–710.

- Ingle ME, Bloom MS, Parsons PJ, Steuerwald AJ, Kruger P, Fujimoto VY. Associations between IVF outcomes and essential trace elements measured in follicular fluid and urine: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:253–261.
- Ingle ME, Mínguez-Alarcón L, Carignan CC, Stapleton HM, Williams PL, Ford JB, Moravek MB, Hauser R, Meeker JD. Exploring reproductive associations of serum polybrominated diphenyl ether and hydroxylated brominated diphenyl ether concentrations among women undergoing in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2020;**35**:1199–1210.
- Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, Itakura A, Saito H, Adamson GD. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: An analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril* 2014;**101**:128–133.
- James-Todd TM, Chiu Y-H, Zota AR. Racial/Ethnic Disparities in Environmental Endocrine Disrupting Chemicals and Women’s Reproductive Health Outcomes: Epidemiological Examples Across the Life Course. *Curr Epidemiol Reports* 2016;**3**:161–180.
- Jameson SA, Natarajan A, Cool J, DeFalco T, Maatouk DM, Mork L, Munger SC, Capel B. Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genet* 2012;**8**:e1002575.
- Jiang T, Hu Y, He S, Jiang R, Yao Y, Jin Z, Shen J, Tao F, Ji Y, Liang C. Exposure to multiple toxic metals and the risk of early embryonic arrest among women undergoing assisted reproductive techniques. *Environ Res* 2022;**211**:113072.
- Jirsová S, Mašata J, Jech L, Zvárová J. Effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 1,1,1-trichloro-2,2,-bis (4-chlorophenyl)-ethane (DDT) in follicular fluid on the results of in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) programs. *Fertil Steril* 2010;**93**:1831–1836.
- Johnson MT, Gardner DK. Embryo culture in the twenty-first century. In: *Human Assisted Reproductive Technology*. Cambridge University Press, 2011, 232–247.
- Johnson PI, Altshul L, Cramer DW, Missmer SA, Hauser R, Meeker JD. Serum and follicular fluid concentrations of polybrominated diphenyl ethers and in-vitro fertilization outcome. *Environ Int* 2012;**45**:9–14.
- Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B, Karwacka A, Klimowska A, Kałużny P, Radwan P, Hanke W. Parameters of ovarian reserve in relation to urinary concentrations of parabens. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* 2020;**19**:1–8.
- Jurewicz J, Radwan P, Wielgomas B, Radwan M, Karwacka A, Kałużny P, Piskunowicz M, Dziewirska E, Hanke W. Exposure to pyrethroid pesticides and ovarian reserve. *Environ Int* 2020;**144**:106028.
- Jurewicz J, Wielgomas B, Radwan M, Karwacka A, Klimowska A, Dziewirska E, Korczak K, Zajdel R, Radwan P, Hanke W. Triclosan exposure and ovarian reserve. *Reprod Toxicol* 2019;**89**:168–172.
- Kamel RM. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil* 2013;**14**:96–109.
- Kaufman MH. Parthenogenetic Activation of Oocytes. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;**2018**:pdb.prot094409.

- Khan HM, Bhakat M, Mohanty TK, Pathbanda TK. Influence of vitamin E, macro and micro minerals on reproductive performance of cattle and buffalo-A review. *Agric Rev* 2014;**35**:113.
- Kim HK, Ko DH, Lee W, Kim KR, Chun S, Song J, Min WK. Body fluid concentrations of bisphenol A and their association with in vitro fertilization outcomes. *Hum Fertil* 2021;**24**:199–207.
- Kim IS. Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites on plants. *Food Sci Biotechnol* 2022;**31**:515–526.
- Kim K, Wactawski-Wende J, Michels KA, Schliep KC, Plowden TC, Chaljub EN, Mumford SL. Dietary minerals, reproductive hormone levels and sporadic anovulation: Associations in healthy women with regular menstrual cycles. *Br J Nutr* 2018;**120**:81–89.
- Kim YR, Pacella RE, Harden FA, White N, Toms LML. A systematic review: Impact of endocrine disrupting chemicals exposure on fecundity as measured by time to pregnancy. *Environ Res* 2019;**171**:119–133.
- Kim YR, White N, Bräunig J, Vijayasarathy S, Mueller JF, Knox CL, Harden FA, Pacella R, Toms LML. Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) in follicular fluid from women experiencing infertility in Australia. *Environ Res* 2020;**190**:109963.
- Knight PG, Satchell L, Glister C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol* 2012;**359**:53–65.
- Kohama T, Kobayashi H, Inoue M. The effect of soybeans on the anovulatory cycle. *J Med Food* 2005;**8**:550–551.
- Kravchenko J, Darrah TH, Miller RK, Lyerly HK, Vengosh A. A review of the health impacts of barium from natural and anthropogenic exposure. *Environ Geochem Health* 2014;**36**:797–814.
- Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules* 2019;**24**:1076.
- Krzastek SC, Farhi J, Gray M, Smith RP. Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Transl Androl Urol* 2020;**9**:2797–2813.
- Lambert-Messerlian G, Plante B, Eklund EE, Raker C, Moore RG. Levels of antimüllerian hormone in serum during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 2016;**105**:208-213.e1.
- Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adevi O, Arnold R, Basu N (Nil), Baldé AB, Bertollini R, Bose-O'Reilly S, Boufford JI, *et al*. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet* 2018;**391**:462–512.
- Lass A, Belluzzi A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and IVF treatment. *Reprod Biomed Online* 2019;**38**:95–99.
- Lawrenz B, Coughlan C, Melado L, Fatemi HM. The ART of frozen embryo transfer: back to nature! *Gynecol Endocrinol* 2020;**36**:479–483.
- Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol* 2008;**8**:23–42.
- Lee S, Min JY, Min KB, Bozhinova R, Ujueta F, Arenas IA, Escolar E, Diaz D, Boineau R, Mark DB, *et al*. Continued decline in blood lead levels among adults in the United States: The national health and nutrition examination surveys. *Environ Res* 2020;**58**:30–37.

- Lefebvre T, Fréour T, Duval G, Ploteau S, Marchand P, Le Bizec B, Antignac J-P, Cano-Sancho G. Associations between internal concentrations of fluorinated and organochlorinated chemicals in women and in vitro fertilization outcomes: A multi-pollutant study. *Environ Pollut* 2022;**313**:120087.
- Li D, Liang C, Cao Y, Zhu D, Shen L, Zhang Z, Jiang T, Zhang Z, Zong K, Liu Y, *et al.* The associations of serum metals concentrations with the intermediate and pregnancy outcomes in women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol Environ Saf* 2022;**233**:113309.
- Li L, Ji SY, Yang JL, Li XX, Zhang J, Zhang Y, Hu ZY, Liu YX. Wnt/ β -catenin signaling regulates follicular development by modulating the expression of Foxo3a signaling components. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**382**:915–925.
- Lim S. The associations between personal care products use and urinary concentrations of phthalates, parabens, and triclosan in various age groups: The Korean National Environmental Health Survey Cycle 3 2015–2017. *Sci Total Environ* 2020;**742**:140640.
- Liu C, Peng J, Matzuk MM, Yao HHC. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nat Commun* 2015;**6**:1–11.
- Luke B, Brown MB, Wantman E, Lederman A, Gibbons W, Schattman GL, Lobo RA, Leach RE, Stern JE. Cumulative Birth Rates with Linked Assisted Reproductive Technology Cycles. *N Engl J Med* 2012;**366**:2483–2491.
- Lyubimov A V., Smith JA, Rousselle SD, Mercieca MD, Tomaszewski JE, Smith AC, Levine BS. The effects of tetrathiomolybdate (TTM, NSC-714598) and copper supplementation on fertility and early embryonic development in rats. *Reprod Toxicol* 2004;**19**:223–233.
- Ma X, Cui L, Chen L, Zhang J, Zhang X, Kang Q, Jin F, Ye Y. Parental plasma concentrations of perfluoroalkyl substances and In Vitro fertilization outcomes. *Environ Pollut* 2021;**269**:116159.
- Machtinger R, Gaskins AJ, Racowsky C, Mansur A, Adir M, Baccarelli AA, Calafat AM, Hauser R. Urinary concentrations of biomarkers of phthalates and phthalate alternatives and IVF outcomes. *Environ Int* 2018;**111**:23–31.
- Machtinger R, Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reprod Biomed Online* 2013;**26**:210–221.
- Mahalingaiah S, Missmer SA, Maity A, Williams PL, Meeker JD, Berry K, Ehrlich S, Perry MJ, Cramer DW, Hauser R. Association of Hexachlorobenzene (HCB), Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) with in Vitro Fertilization (IVF) Outcomes. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:316–320.
- Makieva S, Reschini M, Ferrari S, Bonesi F, Polledri E, Fustinoni S, Restelli L, Sarais V, Somigliana E, Viganò P. Oral Vitamin D supplementation impacts gene expression in granulosa cells in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2020;**36**:130-144.
- Malathi A, Balakrishnan S, B. S L. Correlation between estradiol levels on day of HCG trigger and the number of mature follicles, number of oocytes retrieved, and the number of mature oocytes (M2) after oocyte aspiration in ICSI cycles. *Middle East Fertil Soc J* 2021;**26**:34.
- Malavolta M, Piacenza F, Basso A, Giacconi R, Costarelli L, Mocchegiani E. Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mech Ageing Dev* 2015;**151**:93–100.

- Martinez RM, Hauser R, Liang L, Mansur A, Adir M, Dioni L, Racowsky C, Bollati V, Baccarelli AA, Machtinger R. Urinary concentrations of phenols and phthalate metabolites reflect extracellular vesicle microRNA expression in follicular fluid. *Environ Int* 2019;**123**:20–28.
- Martino-Andrade AJ, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res* 2010;**54**:148–157.
- Martins WP, Nastri CO, Rienzi L, van der Poel SZ, Gracia C, Racowsky C. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;**49**:583–591.
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev* 2012;**58**:44–50.
- McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod* 2007;**22**:778–785.
- McQueen DB, Schufreider A, Lee SM, Feinberg EC, Uhler ML. Racial disparities in in vitro fertilization outcomes. *Fertil Steril* 2015;**104**:398-402.e1.
- Md Zin SR, Omar SZ, Ali Khan NL, Musameh NI, Das S, Kassim NM. Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats. *Clinics* 2013;**68**:253–262.
- Meeker JD, Maity A, Missmer SA, Williams PL, Mahalingaiah S, Ehrlich S, Berry KF, Altshul L, Perry MJ, Cramer DW, et al. Serum concentrations of polychlorinated biphenyls in relation to in vitro fertilization outcomes. *Environ Health Perspect* 2011;**119**:1010–6.
- Meeker JD, Rossano MG, Protas B, Diamond MP, Puscheck E, Daly D, Paneth N, Wirth JJ. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: Human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 2008;**116**:1473–1479.
- Messerlian C, Gaskins AJ. Epidemiologic Approaches for Studying Assisted Reproductive Technologies: Design, Methods, Analysis, and Interpretation. *Curr Epidemiol Reports* 2017;**4**:124–132.
- Messerlian C, Souter I, Gaskins AJ, Williams PL, Ford JB, Chiu YH, Calafat AM, Hauser R. Urinary phthalate metabolites and ovarian reserve among women seeking infertility care. *Hum Reprod* 2016;**31**:75–83.
- Metcalfe CD, Bayen S, Desrosiers M, Muñoz G, Sauvé S, Yargeau V. Methods for the analysis of endocrine disrupting chemicals in selected environmental matrixes. *Environ Res* 2022;**206**:112616.
- Michaluk A, Kochman K. Involvement of copper in female reproduction. *Reprod Biol* 2007;**7**:193–205.
- Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 2011;**124**:229–236.
- Mínguez-Alarcón L, Chiu YH, Messerlian C, Williams PL, Sabatini ME, Toth TL, Ford JB, Calafat AM, Hauser R. Urinary paraben concentrations and in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Fertil Steril* 2016;**105**:714–721.

- Mínguez-Alarcón L, Gaskins AJ, Chiu YH, Williams PL, Ehrlich S, Chavarro JE, Petrozza JC, Ford JB, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations and association with in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Hum Reprod* 2015;**30**:2120–2128.
- Mínguez-Alarcón L, Messerlian C, Bellavia A, Gaskins AJ, Chiu YH, Ford JB, Azevedo AR, Petrozza JC, Calafat AM, Hauser R, *et al.* Urinary concentrations of bisphenol A, parabens and phthalate metabolite mixtures in relation to reproductive success among women undergoing in vitro fertilization. *Environ Int* 2019;**126**:355–362.
- Mínguez-Alarcón L, Souter I, Chiu YH, Williams PL, Ford JB, Ye X, Calafat AM, Hauser R. Urinary concentrations of cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monohydroxy isononyl ester, a metabolite of the non-phthalate plasticizer di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), and markers of ovarian response among women attending a fertility cent. *Environ Res* 2016;**151**:595–600.
- Mirakhori F, Zeynali B, Tafreshi AP, Shirmohammadian A. Lithium induces follicular atresia in rat ovary through a GSK-3 β / β -catenin dependent mechanism. *Mol Reprod Dev* 2013;**80**:286–296.
- Mok-Lin E, Ehrlich S, Williams PL, Petrozza J, Wright DL, Calafat AM, Ye X, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int J Androl* 2010;**33**:385–393.
- Montenegro IS, Kuhl CP, Schneider R de A, Zachia S de A, Durli ICL de O, Terraciano PB, Rivero RC, Passos EP. Use of clomiphene citrate protocol for controlled ovarian stimulation impairs endometrial maturity. *J Bras Reprod Assist* 2021;**25**:90–96.
- Muhlhauser A, Susiarjo M, Rubio C, Griswold J, Gorence G, Hassold T, Hunt PA. Bisphenol A effects on the growing mouse oocyte are influenced by diet. *Biol Reprod* 2009;**80**:1066–1071.
- Mumford SL, Sundaram R, Schisterman EF, Sweeney AM, Barr DB, Rybak ME, Maisog JM, Parker DL, Pfeiffer CM, Buck Louis GM. Higher urinary lignan concentrations in women but not men are positively associated with shorter time to pregnancy. *J Nutr* 2014;**144**:352–358.
- Negrete-Bolagay D, Zamora-Ledezma C, Chuya-Sumba C, De Sousa FB, Whitehead D, Alexis F, Guerrero VH. Persistent organic pollutants: The trade-off between potential risks and sustainable remediation methods. *J Environ Manage* 2021;**300**:113737.
- Neri C, De Luca C, D'oria L, Licameli A, Nucci M, Pellegrino M, Caruso A, De Santis M. Managing fertile women under lithium treatment: the challenge of a Teratology Information Service. *Minerva Ginecol* 2018;**70**:261–267.
- Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górská M, Jabłońska E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol* 2018;**474**:238–251.
- Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Dev* 2013;**140**:4471–4479.
- Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 2010;**25**:2944–2954.
- Al osman M, Yang F, Massey IY. Exposure routes and health effects of heavy metals on children. *BioMetals* 2019;**32**:563–573.
- Osredkar J. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol* 2011;**s3**.

- Özkaya MO, Nazıroğlu M, Barak C, Berkkanoglu M. Effects of multivitamin/mineral supplementation on trace element levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Biol Trace Elem Res* 2011;**139**:1–9.
- Park SY, Jeon JH, Jeong K, Chung HW, Lee H, Sung YA, Ye S, Ha EH. The Association of Ovarian Reserve with Exposure to Bisphenol A and Phthalate in Reproductive-aged Women. *J Korean Med Sci* 2021;**36**:1–9.
- Peacey L, Elphick MR, Jones CE. Roles of copper in neurokinin B and gonadotropin-releasing hormone structure and function and the endocrinology of reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 2020;**287**:113342.
- Peana M, Medici S, Dadar M, Zoroddu MA, Pelucelli A, Chasapis CT, Bjørklund G. Environmental barium: potential exposure and health-hazards. *Arch Toxicol* 2021;**95**:2605–2612.
- Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 2001;**234**:339–351.
- Pereira N, Rosenwaks Z. A fresh(er) perspective on frozen embryo transfers. *Fertil Steril* 2016;**106**:257–258.
- Peters A, Nawrot TS, Baccarelli AA. Hallmarks of environmental insults. *Cell* 2021;**184**:1455–1468.
- Petriello MC, Newsome BJ, Dziubla TD, Hilt JZ, Bhattacharyya D, Hennig B. Modulation of persistent organic pollutant toxicity through nutritional intervention: Emerging opportunities in biomedicine and environmental remediation. *Sci Total Environ* 2014;**491–492**:11–16.
- Petro EML, Leroy JLMR, Covaci A, Fransén E, De Neubourg D, Dirtu AC, De Pauw I, Bols PEJ. Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence. *Hum Reprod* 2012;**27**:1025–1033.
- Pirtea P, De Ziegler D, Tao X, Sun L, Zhan Y, Ayoubi JM, Seli E, Franasiak JM, Scott RT. Rate of true recurrent implantation failure is low: results of three successive frozen euploid single embryo transfers. *Fertil Steril* 2021;**115**:45–53.
- De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002;**17**:2402–2409.
- Plasschaert RN, Bartolomei MS. Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Dev* 2014;**141**:1805–1813.
- Pool KR, Chazal F, Smith JT, Blache D. Estrogenic Pastures: A Source of Endocrine Disruption in Sheep Reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;**13**:1–16.
- Poormoosavi SM, Behmanesh MA, Janati S, Najafzadehvarzi H. Level of Bisphenol A in Follicular Fluid and Serum and Oocyte Morphology in Patients Undergoing IVF Treatment. *J Fam Reprod Heal* 2019;**13**:154–159.
- Racowsky C, Combelles CMH, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, Gale S, O’Leary T, Jackson K V. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online* 2003;**6**:323–331.

- Radwan P, Wielgomas B, Radwan M, Krasieński R, Kilanowicz-Sapota A, Banaszczyk R, Jurewicz J. Synthetic Pyrethroids Exposure and Embryological Outcomes: A Cohort Study in Women from Fertility Clinic. *Int J Environ Res Public Health* 2022;**19**:1–10.
- Radwan P, Wielgomas B, Radwan M, Krasieński R, Klimowska A, Kaleta D, Jurewicz J. Urinary bisphenol A concentrations and in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Reprod Toxicol* 2020;**96**:216–220.
- Radwan P, Wielgomas B, Radwan M, Krasieński R, Klimowska A, Zajdel R, Kaleta D, Jurewicz J. Triclosan exposure and in vitro fertilization treatment outcomes in women undergoing in vitro fertilization. *Environ Sci Pollut Res* 2021;**28**:12993–12999.
- Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: An update and review of practice. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:591–602.
- Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem* 2018;**119**:157–184.
- Richards JAS, Ren YA, Candelaria N, Adams JE, Rajkovic A. Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation, and impact on fertility: 2017 update. *Endocr Rev* 2018;**39**:1–20.
- Richards JS. The Ovarian Cycle. *Vitam Horm* 2018;**107**:1–25.
- Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, Labarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in art: Systematic review and meta-Analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:139–155.
- Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ* 2016;**58**:167–190.
- Rizzo G, Feraco A, Storz MA, Lombardo M. The role of soy and soy isoflavones on women's fertility and related outcomes: An update. *J Nutr Sci* 2022;**11**:1–17.
- Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, Checa MA. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;**99**:156–162.
- Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: Fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril* 2015;**103**:1190–1193.
- Rumph JT, Stephens VR, Martin JL, Brown LK, Thomas PL, Cooley A, Osteen KG, Bruner-Tran KL. Uncovering Evidence: Associations between Environmental Contaminants and Disparities in Women's Health. *Int J Environ Res Public Health* 2022;**19**:1257.
- Sacha CR, Souter I, Williams PL, Chavarro JE, Ford J, Mahalingaiah S, Donahoe PK, Hauser R, Pépin D, Mínguez-Alarcón L. Urinary phthalate metabolite concentrations are negatively associated with follicular fluid anti-müllerian hormone concentrations in women undergoing fertility treatment. *Environ Int* 2021;**157**:106809
- Sallam HN. The evidence-based practice of assisted reproduction. In: *Human Assisted Reproductive Technology*. Cambridge University Press, 2011, 152–166.

- Salsano S, Pérez-Deben S, Quiñonero A, González-Martín R, Domínguez F. Phytoestrogen exposure alters endometrial stromal cells and interferes with decidualization signaling. *Fertil Steril* 2019;**112**:947-958.e3.
- Schatten H, Sun QY. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:531–538.
- Schrauzer GN. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *J Am Coll Nutr* 2002;**21**:14–21.
- Sermon K. Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;**17**:71–82.
- Sermondade N, Huberlant S, Bourhis-Lefebvre V, Arbo E, Gallot V, Colombani M, Fréour T. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;**25**:439–451.
- Setchell KDR, Gosselin SJ, Welsh MB, Johnston JO, Balistreri WF, Kramer LW, Dresser BL, Tarr MJ. Dietary estrogens-A probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology* 1987;**93**:225–233.
- Shahin AY, Ismail AM, Shaaban OM. Supplementation of clomiphene citrate cycles with *Cimicifuga racemosa* or ethinyl oestradiol - A randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:501–507.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: A prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011;**96**:344–348.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril* 2008;**89**:20–26.
- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: Taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;**11**:1–15.
- Shaw JLV, Dey SK, Critchley HOD, Horne AW. Current knowledge of the aetiology of human tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:432–444.
- Shen J, Kang Q, Mao Y, Yuan M, Le F, Yang X, Xu X, Jin F. Urinary bisphenol A concentration is correlated with poorer oocyte retrieval and embryo implantation outcomes in patients with tubal factor infertility undergoing in vitro fertilisation. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020;**187**:109816.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, Brock JW, Needham LL, Calafat AM. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:331–338.
- Siu KK, Serrão VHB, Ziyat A, Lee JE. The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *J Cell Biol* 2021;**220**:1–15.

- Skakkebaek NE, Lindahl-Jacobsen R, Levine H, Andersson A-M, Jørgensen N, Main KM, Lidegaard Ø, Priskorn L, Holmboe SA, Bräuner E V, *et al.* Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol* 2022;**18**:139–157.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson AM, Eisenberg ML, Jensen TK, Jørgensen N, Swan SH, Sapra KJ, *et al.* Male reproductive disorders and fertility trends: Influences of environment and genetic susceptibility. *Physiol Rev* 2015;**96**:55–97.
- Skalnaya MG, Tinkov AA, Lobanova YN, Chang JS, Skalny A V. Serum levels of copper, iron, and manganese in women with pregnancy, miscarriage, and primary infertility. *J Trace Elem Med Biol* 2019;**56**:124–130.
- Skalny A V., Tinkov AA, Voronina I, Terekhina O, Skalnaya MG, Kovas Y. Hair Trace Element and Electrolyte Content in Women with Natural and In Vitro Fertilization-Induced Pregnancy. *Biol Trace Elem Res* 2018;**181**:1–9.
- Smith KW, Braun JM, Williams PL, Ehrlich S, Correia KF, Calafat AM, Ye X, Ford J, Keller M, Meeker JD, *et al.* Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:1538–1543.
- Smith KW, Souter I, Dimitriadis I, Ehrlich S, Williams PL, Calafat AM, Hauser R. Urinary Paraben Concentrations and Ovarian Aging among Women from a Fertility Center. *Environ Health Perspect* 2013;**121**:1299–1305.
- Souter I, Smith KW, Dimitriadis I, Ehrlich S, Williams PL, Calafat AM, Hauser R. The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reprod Toxicol* 2013;**42**:224–231.
- van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, van Dessel HJHM, Bossuyt PMM, van der Veen F, Mol BWJ. Pregnancy is predictable: A large-scale prospective external validation of the prediction of spontaneous pregnancy in subfertile couples. *Hum Reprod* 2007;**22**:536–542.
- Stern H. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J Clin Med* 2014;**3**:280–309.
- Studer JM, Schweer WP, Gabler NK, Ross JW. Functions of manganese in reproduction. *Anim Reprod Sci* 2022;**238**:106924.
- Sun J, Jiang H, Wang W, Dong X, Zhang D. Associations of Urinary Phytoestrogen Concentrations with Sleep Disorders and Sleep Duration among Adults. *Nutrients* 2020;**12**:2103.
- Sun Y, Lin Y, Niu M, Kang Y, Du S, Zheng B. Follicular fluid concentrations of zinc and copper are positively associated with in vitro fertilization outcomes. *Int J Clin Exp Med* 2017;**10**:3547–3553.
- Syrkasheva A, Frankevich V, Kindysheva S, Starodubtseva N, Donnikov A, Dolgushina N. The Effect of Bisphenol A on the IVF Outcomes Depending on the Polymorphism of the Detoxification System Genes. *J Pers Med* 2021;**11**:1091.
- Szklarska D, Rzymiski P. Is Lithium a Micronutrient? From Biological Activity and Epidemiological Observation to Food Fortification. *Biol Trace Elem Res* 2019;**189**:18–27.

- Tan S, Ge W, Wang J, Liu W, Zhao Y, Shen W, Li L. Zearalenone-induced aberration in the composition of the gut microbiome and function impacts the ovary reserve. *Chemosphere* 2020;**244**:125493.
- Tapia-Orozco N, Santiago-Toledo G, Barrón V, Espinosa-García AM, García-García JA, García-Arrazola R. Environmental epigenomics: Current approaches to assess epigenetic effects of endocrine disrupting compounds (EDC's) on human health. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;**51**:94–99.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology. *Mol Clin Environ Toxicol* 2012;**101**:133–164.
- Tellez-Plaza M, Navas-Acien A, Caldwell KL, Menke A, Muntner P, Guallar E. Reduction in cadmium exposure in the United States population, 1988-2008: The contribution of declining smoking rates. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:204–209.
- Thaker R, Oza H, Shaikh I, Kumar S. Correlation copper and zinc in spontaneous abortions? *Int J Fertil Steril* 2019;**13**:97–101.
- Toktay E, Selli J, Gurbuz MA, Tastan TB, Ugan RA, Un H, Halici Z. Effects of soy isoflavonoids (genistein and daidzein) on endometrial receptivity. *Iran J Basic Med Sci* 2020;**23**:1603–1609.
- Tolunay HE, Şükür YE, Ozkavukcu S, Seval MM, Ateş C, Türksoy VA, Ecemiş T, Atabekoğlu CS, Özmen B, Berker B, *et al.* Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;**198**:73–77.
- Tulić L, Vidaković S, Tulić I, Ćurčić M, Bulat Z. Toxic Metal and Trace Element Concentrations in Blood and Outcome of In Vitro Fertilization in Women. *Biol Trace Elem Res* 2019;**188**:284–294.
- Unfer V, Casini ML, Gerli S, Costabile L, Mignosa M, Di Renzo GC. Phytoestrogens may improve the pregnancy rate in in vitro fertilization-embryo transfer cycles: A prospective, controlled, randomized trial. *Fertil Steril* 2004;**82**:1509–1513.
- Uzbekova S, Salhab M, Perreau C, Mermillod P, Dupont J. Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: Possible involvement in meiosis during in vitro maturation. *Reproduction* 2009;**138**:235–246.
- Vabre P, Gatimel N, Moreau J, Gayrard V, Picard-Hagen N, Parinaud J, Leandri RD. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: A narrative review of animal and human data. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* 2017;**16**:1–18.
- Vanegas JC, Afeiche MC, Gaskins AJ, Mínguez-Alarcón L, Williams PL, Wright DL, Toth TL, Hauser R, Chavarro JE. Soy food intake and treatment outcomes of women undergoing assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2015;**103**:749-755.e2.
- Veleva Z, Karinen P, Tomás C, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer with cryopreservation improves the outcome and diminishes the costs of IVF/ICSI. *Hum Reprod* 2009;**24**:1632–1639.
- Vyskočil A, Viau C. Assessment of molybdenum toxicity in humans. *J Appl Toxicol* 1999;**19**:185–192.
- Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update* 2016;**22**:2–22.

- Wang C, Pi X, Chen Y, Wang D, Yin S, Jin L, Li Z, Ren A, Wang L, Yin C. Prenatal exposure to barium and the occurrence of neural tube defects in offspring. *Sci Total Environ* 2021;**764**:144245.
- Wang L, Liang R, Zhang G, Ren M, Long M, Na J, Li Z, Wang B, Zhuang L, Lu Q. Serum zinc concentration and risk of adverse outcomes to in vitro fertilization and embryo transfer: A prospective cohort study in northern China. *Sci Total Environ* 2021;**792**:148405.
- Wang SS, Sun HX. Blastocyst transfer ameliorates live birth rate compared with cleavage-stage embryos transfer in fresh in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycles: Reviews and meta-analysis. *Yonsei Med J* 2014;**55**:815–825.
- Wang Y-X, Liu C, Shen Y, Wang Q, Pan A, Yang P, Chen Y-J, Deng Y-L, Lu Q, Cheng L-M, *et al.* Urinary levels of bisphenol A, F and S and markers of oxidative stress among healthy adult men: Variability and association analysis. *Environ Int* 2019;**123**:301–309.
- Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I. Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Ann Agric Environ Med* 2018;**25**:213–218.
- Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, Cifkova R, De Muinck Keizer-Schrama S, Hogervorst E, Janse F, *et al.* ESHRE Guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2016;**31**:926–937.
- Wei T, Simko V. R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix. (*Version 092*) 2021. Available at: <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- Weinerman R, Mainigi M. Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: The translational rationale. *Fertil Steril* 2014;**102**:10–18.
- Wesselink AK, Hatch EE, Mikkelsen EM, Trolle E, Willis SK, McCann SE, Valsta L, Lundqvist A, Tucker KL, Rothman KJ, *et al.* Dietary phytoestrogen intakes of adult women are not strongly related to fecundability in 2 preconception cohort studies. *J Nutr* 2020;**150**:1240–1251.
- WHO (World Health Organization). *International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11)*. Geneva: WHO, 2018.
- Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Brüning T. Assessing exposure to phthalates - The human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res* 2011;**55**:7–31.
- Wittassek M, Wiesmüller GA, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Müller J, Angerer J, Schlüter C. Internal phthalate exposure over the last two decades - A retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* 2007;**210**:319–333.
- Wright DL, Afeiche MC, Ehrlich S, Smith K, Williams PL, Chavarro JE, Batsis M, Toth TL, Hauser R. Hair mercury concentrations and in vitro fertilization (IVF) outcomes among women from a fertility clinic. *Reprod Toxicol* 2015;**51**:125–132.
- Wu S, Wang M, Deng Y, Qiu J, Zhang X, Tan J. Associations of toxic and essential trace elements in serum, follicular fluid, and seminal plasma with In vitro fertilization outcomes. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020;**204**:110965.
- Wu Z, Yang Y, Chen Y, Xia G, Zhang R. Effects of subcutaneous administration of daidzein on blastocyst implantation in rats. *Food Chem Toxicol* 2005;**43**:167–172.

- Yoshida K, Bartel A. tableone: Create “Table 1” to Describe Baseline Characteristics with or without Propensity Score Weights. *R Packag version 0130* 2021. Available at: <https://cran.r-project.org/package=tableone>.
- Younglai E V., Foster WG, Hughes EG, Trim K, Jarrell JF. Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. *Arch Environ Contam Toxicol* 2002;**43**:121–126.
- Yuan XQ, Du YY, Liu C, Guo N, Teng XM, Hua X, Yao YC, Deng YL, Zeng Q, Deng TR, *et al.* Phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Sci Total Environ* 2020;**738**:139834.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, *et al.* The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Hum Reprod* 2017;**32**:1786–1801.
- Zeleznik AJ. Follicle Selection in Primates : ‘Many Are Called but Few Are Chosen’. *Biology of Reproduction* 2001;**65**:655–659.
- Zeng Y, Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development. *Genes (Basel)* 2019;**10**:257.
- Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med* 2013;**34**:939–80.
- Zhou L, Liang K, Li M, Rong C, Zheng J, Li J. Metal elements associate with in vitro fertilization (IVF) outcomes in 195 couples. *J Trace Elem Med Biol* 2021;**68**:126810.

IX. ANEXOS

IX. ANEXOS

Anexo 1. Material suplementario

Tabla S1	Estudios que evalúan el impacto de compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre variables de reserva ovárica en mujeres sometidas a tratamientos de FIV
Tabla S2	Estudios que evalúan el impacto de compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre variables de respuesta a la estimulación ovárica en mujeres sometidas a tratamientos de FIV
Tabla S3	Estudios que evalúan el impacto de compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre variables de fecundación y desarrollo embrionario pre-implantacional en mujeres sometidas a tratamientos de FIV
Tabla S4	Estudios que evalúan el impacto de compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados clínicos en mujeres sometidas a tratamientos de FIV
Tabla S5	Características demográficas y reproductivas basales de las participantes según la concentración de fitoestrógenos
Tabla S6	Diferencias de medias y frecuencias relativas para las variables de reserva ovárica, respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de fitoestrógenos
Tabla S7	Probabilidades para las variables clínicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de fitoestrógenos
Tabla S8	Características demográficas y reproductivas basales de las participantes según la concentración de parabenos
Tabla S9	Diferencias de medias y frecuencias relativas para las variables de reserva ovárica, respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de parabenos
Tabla S10	Probabilidades para las variables clínicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de parabenos
Tabla S11	Características demográficas y reproductivas basales de las participantes según la concentración del metabolito de ftalato MEHP
Tabla S12	Diferencias de medias y frecuencias relativas para las variables de reserva ovárica, respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP
Tabla S13	Probabilidades para las variables clínicas del tratamiento de FIV según las concentraciones del metabolito de ftalato MEHP

Tabla S14	Características demográficas y reproductivas basales de las participantes según la concentración de elementos traza esenciales
Tabla S15	Diferencias de medias y frecuencias relativas para las variables de reserva ovárica, respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de elementos traza esenciales
Tabla S16	Probabilidades para las variables clínicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de elementos traza esenciales
Tabla S17	Características demográficas y reproductivas basales de las participantes según la concentración de elementos traza no esenciales
Tabla S18	Diferencias de medias y frecuencias relativas para las variables de reserva ovárica, respuesta ovárica y embriológicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de elementos traza no esenciales
Tabla S19	Probabilidades para las variables clínicas del tratamiento de FIV según las concentraciones de elementos traza no esenciales

El material suplementario puede encontrarse en el siguiente enlace:

Gonzalez-Martin, Roberto (2022), "Influencia de la exposición femenina a compuestos ambientales y procedentes de la dieta sobre los resultados del tratamiento de fecundación *in vitro* - Anexo 1.", Mendeley Data, V1, [doi: 10.17632/58pg9tp7mh.1](https://doi.org/10.17632/58pg9tp7mh.1)

Anexo 2. Producción científica del doctorando

Producción científica relacionada con la temática de la tesis doctoral

- Publicaciones científicas internacionales

Artículos científicos

Endometrial Cells Acutely Exposed to Phthalates In Vitro Do Not Phenocopy Endometriosis. **González-Martín R**, Palomar A, Medina-Laver Y, Quiñonero A, Domínguez F. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 20;23(19):11041. doi: 10.3390/ijms231911041. PMID: 36232341

Mercury impairs human primary endometrial stromal cell function. Palomar A, **González-Martín R**, Pérez-Debén S, Medina-Laver Y, Quiñonero A, Domínguez F. *Biol Reprod.* 2022 May 17;106(5):1022-1032. doi: 10.1093/biolre/ioc016. PMID: 35084015.

Copper and lead exposures disturb reproductive features of primary endometrial stromal and epithelial cells. Pérez-Debén S, **González-Martín R**, Palomar A, Quiñonero A, Salsano S, Domínguez F. *Reprod Toxicol.* 2020 Apr;93:106-117. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.01.008. Epub 2020 Jan 28. PMID: 32004626

Phytoestrogen exposure alters endometrial stromal cells and interferes with decidualization signaling. Salsano S, Pérez-Debén S, Quiñonero A, **González-Martín R**, Domínguez F. *Fertil Steril.* 2019 Nov;112(5):947-958.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.06.014. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31371049.

Capítulos de libro

Environmental pollutants, embryonic implantation and embryonic development. **González-Martín R**, Domínguez F. *Reproductive and Developmental Toxicology*, February 11, 2022, pp. 845–866

- Trabajos presentados en congresos internacionales

Phytoestrogen concentration in women's urine and follicular fluid are associated with better IVF outcomes in euploid single embryo transfer cycles. **González-Martín R**, Palomar A, Zuckerman C, Whitehead CV, Quiñonero A, Scott RT, Domínguez F. Poster presentation. ESHRE 38th Annual Meeting. Milan (Italy), 03-06 July 2012.

Urine MEHP Concentrations Affects Ovarian Response but No Clinical Outcomes in Women Undergoing Euploid Single Embryo Transfer (SET). **González-Martín R**, Palomar A, Perez-Deben S, Salsano S, Quiñonero A, Giles J, Vidal C, Bellver J, Garrido N, Domínguez F. Poster presentation. SRI 69th Annual Scientific Meeting. Denver (Colorado, USA). 15-19 March 2022.

Impact of Endocrine Disruptor Levels Found in Urine and Follicular Fluid on Clinical Parameters of IVF Patients in a Euploid SET/FET cycle. Palomar A, **González-Martín R**, Zuckerman C, Whitehead CV, Scott RT, Domínguez F. Poster presentation. ASRM 76th Annual Scientific Meeting. Poster Presentation. Virtual congress. 17-21 October 2021.

Antioxidant Treatment Ameliorates Mercury-Induced Damage on Viability and Function of Human Endometrial Epithelial Cells. Palomar A, **González-Martín R**, Quiñonero A, Medina-Laver Y, Pérez-Debén S, Domínguez F. Poster presentation. SRI 69th Annual Scientific Meeting. Denver (Colorado, USA). 15-19 March 2022.

Mercury Disturb Reproductive Functions of Primary Endometrial Stromal Cells (ESC). **González-Martín R**, Palomar A, Pérez-Debén S, Quiñonero A, Domínguez F. Poster presentation. SRI 68th Annual Scientific Meeting. Boston (Massachusetts, USA). 6-9 July 2021.

Acute DEHP exposure in Endometrial Epithelial Cells Does Not Phenocopy the Alterations Described in Endometriosis. **González-Martín R**, Quiñonero A, Pérez-Deben S, Salsano S, Domínguez F. Oral presentation. SRI 66th Annual Scientific Meeting. Paris (France), 12-16 March 2019.

Endometrial Stromal Cells Acutely Exposed to DEHP do not Recapitulate Alterations Observed in Endometriosis. **González-Martín R**, Quiñonero A, Pérez-Deben S, Salsano S, Domínguez F. Poster presentation. SRI 66th Annual Scientific Meeting. Paris (France), 12-16 March 2019.

Copper and Lead, Two Inorganic Metalloestrogens, Disturb Reproductive Features of Primary Endometrial Stromal (ESC) and Epithelial Cells (EEC). Pérez-Deben S, **González-Martín R**, Quiñonero A, Salsano S, Domínguez F. Poster presentation. SRI 66th Annual Scientific Meeting. Paris (France), 12-16 March 2019.

Broad Trace Metals Screening in Blood and Urine Reveals Different Associations in Patients with Endometriosis. **González-Martín -Martín R**, Palomar A, Quiñonero A, Muñoz E, González S, Quejido AJ, Domínguez F. Poster presentation. SRI 69th Annual Scientific Meeting. Denver (Colorado, USA). 15-19 March 2022.

Association of Blood Cadmium and Lead Levels With Reproductive Lifespan Among Postmenopausal Women: NHANES 2005-2014. **González-Martín R**, Tellez-Plaza M, Domínguez F. Poster presentation. SRI 66th Annual Scientific Meeting. Paris (France), 12-16 March 2019.

Producción científica no relacionada con la temática de la tesis doctoral

- Publicaciones científicas internacionales

Artículos científicos

Deciphering the Role of PGRMC1 During Human Decidualization Using an In Vitro Approach. Salsano S, **González-Martín R**, Quiñonero A, Pérez-Deben S, Domínguez F. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Jul 13;106(8):2313-2327. doi: 10.1210/clinem/dgab303. PMID: 33955452.

Novel nonclassic progesterone receptor PGRMC1 pulldown-precipitated proteins reveal a key role during human decidualization. Salsano S, **González-Martín R**, Quiñonero A, López-Martín S, Gómez-Escribano AP, Pérez-Deben S, Yañez-Mo M, Domínguez F. *Fertil Steril.* 2020 May;113(5):1050-1066.e7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.01.008. PMID: 32386616.

Differential sperm proteomic profiles according to pregnancy achievement in intracytoplasmic sperm injection cycles: a pilot study. Rivera-Egea R, Sota N, **González-Martín R**, Meseguer M, Remohí J, Garrido N, Domínguez F. *J Assist Reprod Genet.* 2021 Jun;38(6):1507-1521. doi: 10.1007/s10815-021-02098-0. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33835370; PMCID: PMC8266945.

- Trabajos presentados en congresos internacionales

Proteomic analysis of endometrial fluid before and after hydrosalpinx surgery reveals candidate non-invasive markers. **González-Martín R**, Fernandez C, Quintana F, Quiñonero A, Ferrando M, Domínguez F. Poster presentation. SRI 68th Annual Scientific Meeting. Boston (Massachusetts, USA). 6-9 July 2021.

Single cell transcriptome description of early development haploid androgenotes and parthenotes. de Castro P, Escrich L, Grau N, Soler N, Quiñonero A, **González-Martín R**, Escribá MJ, Domínguez F. Oral presentation. SRI 69th Annual Scientific Meeting. Denver (Colorado, USA). 15-19 March 2022.

Deciphering the Role of PGRMC2 in Decidualization and Trophoblast Invasion Using Primary In Vitro Models. Medina-Laver Y, Palomar A, de Castro P, **González-Martín R**, Quiñonero A, Domínguez F. Oral presentation. SRI 69th Annual Scientific Meeting. Denver (Colorado, USA). 15-19 March 2022.

Characterization of the non-classic progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) during the human menstrual cycle and in vitro decidualization. Medina-Laver Y, Diaz-Hernández I, Alama P, **González-Martín R**, Palomar A, Quiñonero A, Domínguez F. Oral presentation. SRI 68th Annual Scientific Meeting. Boston (Massachusetts, USA). 6-9 July 2021.

Non-classical progesterone signaling may be sufficient to induce decidualization in Human Endometrial Stromal Cells (ESC). Salsano S, Quiñonero A, Perez-Deben S, **González-Martín R**, Domínguez F. Oral presentation. ESHRE 34th Annual Meeting. Barcelona (Spain), 01-04 July 2018.

Entosis Act Through the Rho-ROCK Signalling Pathway During Human Embryo Implantation. Palomar A, Quiñonero A, Medina-Laver Y, **González-Martín R**, Salsano S, Domínguez F. Oral presentation. SRI 69th Annual Scientific Meeting. Denver (Colorado, USA). 15-19 March 2022.

Entosis Occurs in Human Embryo Implantation. Palomar A, **González-Martín R**, Salsano S, Pérez-Deben S, Quiñonero A, Domínguez F. Poster presentation. SRI 68th Annual Scientific Meeting. Boston (Massachusetts, USA). 6-9 July 2021.