



X Jornadas SAB-SAMeR-SAEC 2017

Sociedad Argentina de Biología – Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva – Sociedad Argentina de Embriología Clínica

Organizan y coordinan:

Dra. Fernanda Parborell (SAB), Lic. Iván Anduaga Marchetti (SAMeR),
Biol. Ignacio Moreno (SAEC).

Reproducción 2017;32:25-30

El jueves 17 de agosto de 2017 se realizó la X Jornada SAB-SAMeR-SAEC; Dicha reunión de llevó a cabo en el Americas Towers hotel, Libertad 1070. El tema abordado fue “Activación de la reserva ovárica, nuevas perspectivas en el manejo de pacientes bajas respondedoras”.

Las pacientes bajas respondedoras bajo la mirada clínica: ¿alguna novedad?

E Guillermo Terrado Gil

PREGNA Medicina Reproductiva

Las pacientes bajas respondedoras a la estimulación ovulatoria constituyen una situación que debemos enfrentar todos los días en la práctica clínica. Todos los tratamientos de alta complejidad en fertilidad comienzan con una hiperestimulación ovárica controlada, que nos permita la recuperación de un adecuado número de ovocitos maduros para poder fertilizar.

En la literatura se estima que la incidencia de este problema oscila entre el 9 y el 24% (Surrey, FS 2011), y la principal dificultad para su correcto

abordaje consiste en la **falta de uniformidad en el diagnóstico**. Distintos papers suelen catalogar como pacientes bajas respondedoras a aquellas con un determinado número de ovocitos recuperados en la aspiración folicular (de 3 a 6), a las que tienen menos de 3 folículos al día de la descarga con hCG, las que fallan en 2 o más ciclos de FIV previos, las que tienen bajos niveles de estradiol sérico al final del estímulo, o las que tienen un bajo número de embriones para transferir (Kyro, FS 2008). Los cientos de publicaciones referidas al tema tienen diversos criterios de inclusión para definir este grupo de pacientes, lo que imposibilita hacer una comparación válida de los resultados.

Esto motivó una reunión de consenso de expertos de ESHRE, en la ciudad de Bologna en 2011, con la intención de definir qué significa que una paciente sea una pobre o baja respondedora a la estimulación ovárica (HumRep Vol.26, No.7, pp 1616-1624, 2011).

Para establecer que una paciente es una pobre respondedora, de acuerdo con los **criterios de Bologna**, se deben constatar al menos 2 de los siguientes 3 criterios:

1. Edad materna avanzada (≥ 40 años) u otro factor de riesgo en la historia clínica (por ejemplo una cirugía ovárica previa).

2. Un ciclo previo para FIV con ≤ 3 ovocitos captados.

3. Un test de reserva ovárica anormal (por ejemplo, un bajo recuento de folículos antrales o un bajo nivel de hormona antimulleriana sérica).

Unificar criterios diagnósticos permite establecer comparaciones entre los distintos estudios que abordan este tema.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que difícilmente podamos comparar los resultados de 2 pacientes bajas respondedoras de diferente grupo etario. Sabemos que a los 40 años la mayoría de las mujeres tienen aproximadamente entre un 70 y 80% de ovocitos aneuploides. Las mujeres más jóvenes, en cambio, presentarán alteraciones cuantitativas, pero no cualitativas en la producción de ovocitos, aun aquellas con FSH elevada o un bajo número de folículos antrales.

En 2009 presentamos en el Congreso Argentino de SAMeR los resultados de **PREGNA Medicina Reproductiva** donde comparábamos la performance en pacientes jóvenes con ≤ 5 o > 5 ovocitos recuperados para FIV. Si bien el número de los mismos fue diferente, no hubo diferencias significativas en la tasa de embarazo.

En la literatura existen también reportes que postulan que las pacientes bajas respondedoras no constituyen un grupo uniforme, y que los resultados en pacientes con una baja respuesta “inesperada” son mejores que los que aquellas con una baja respuesta predecible por los estudios previos (HumRep Update, Vol.18, No.1, pp 1-11, 2012).

Al momento no existe en la literatura un metanálisis que permita comparar diferentes ensayos clínicos controlados que determinen la mejoría de un esquema de estimulación sobre otro (FertStert 2009; 91: 749-766) (HumRep Update 2016; 22 (3): 306-319).

Si bien pueden plantearse diferentes estrategias, las más comunes consisten en:

1. Cambiar el **tipo de inductor**:
 - a. Agonistas vs. Antagonistas de GnRH.
 - b. Utilización de rFSH sola vs. combinada con rLH.
 - c. rFSH vs hMG.
 - d. Uso de hMG sola.
 - e. Clomifeno vs. Gonadotrofinas.
 - f. Inhibidores de la aromatasas.

2. Cambiar el **esquema de inducción**:

- a. Supresión larga vs. Flare Up.
- b. Microflare.
- c. Antagonistas en Fase Lútea.

3. Utilización de **medicación adyuvante**:

- a. Estrógenos en Fase lútea previa (“priming”).
- b. DHEA.
- c. Hormona de crecimiento.

4. Cambiar la **estrategia**:

- a. Ciclo “natural”.
- b. “Acumulación” de ovocitos.

La mayoría de los metanálisis publicados a la fecha no tienen el poder suficiente para determinar la superioridad de una sobre otra estrategia, y casi todos coinciden en la necesidad de realizar más ensayos clínicos aleatorizados para establecer conclusiones válidas.

Como conclusión de la presentación podríamos decir que:

1. No existe protocolo ni droga “mágica” que funcione en todas las bajas respondedoras.
2. La mayoría de los estudios retrospectivos publicados que comparan un protocolo nuevo vs. uno viejo concluye que el nuevo es mejor.
3. La mayoría de los ensayos clínicos aleatorizados comparando 2 protocolos no muestran diferencias significativas.
4. La mayoría de las pacientes terminarán probando metas de un protocolo antes de pasar a un programa de ovodonación.
5. Debemos destacar la necesidad de hacer medicina preventiva, enfatizando en la importancia de la edad en la reserva ovárica.
6. En la práctica diaria deberíamos ser capaces de reconocer una insuficiencia ovárica antes de que sea tarde (acortamiento de los ciclos, disminución del recuento de folículos antrales, elevación de los niveles de FSH basales, edad > 37 años, etcétera).
7. Los médicos debemos familiarizarnos con las distintas opciones de tratamiento para estas pacientes tan difíciles que constituyen todo un desafío.

El desafío frente a las pacientes con pobre respuesta ovárica: qué podemos hacer desde el laboratorio de FIV cuando no contamos con el número ideal de ovocitos

Claudio Bisioli

PREGNA Medicina Reproductiva

La disfunción reproductiva debido a una pobre respuesta a la estimulación ovárica controlada plantea a los embriólogos clínicos un desafío distinto en cada uno de sus posibles escenarios: edad avanzada, mala calidad ovocítica asociada y paciente joven con mala respuesta.

El uso del ICSI cuando hay pocos ovocitos, una indicación no considerada originalmente, ha sido propuesto como una manera de obtener mejores chances de fecundación, con el fin de no disminuir aún más la ya exigua dote de material biológico disponible.

Otra manera de aumentar las escasas herramientas con las que cuenta un laboratorio de reproducción asistida en estos difíciles casos es la estrategia definida como acumulación de ovocitos, es decir, repetir ciclos de estímulo ovárico para criopreservar reiteradamente ovocitos o embriones, con el propósito de aumentar su número y emplearlos luego de una sola vez, en lugar de repetir cada vez ciclos y transferencias con pocos ovocitos y embriones.

Finalmente, en aquellos casos en los que la poca cantidad va unida a una pobre calidad ovocítica, la transferencia de citoplasma donado o el trasplante de pronúcleos a ovocitos donados son alternativas aún experimentales con importantes aristas de bioseguridad que es imprescindible discutir y evaluar.

La presente disertación se propone abordar cada una de estas alternativas, con el objetivo de contar con más y mejores elementos para juzgar adecuadamente su utilidad o su futilidad para los pacientes cuyo cuidado y seguridad dependen también de nosotros.

Disfunción vascular en casos de baja respuesta ovárica: un estudio preclínico

Leopoldina Scotti

Laboratorio de Estudios Fisiopatológicos del Ovario

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

La baja respuesta ovárica a las gonadotropinas indica disminución en la respuesta folicular y, por consiguiente, un bajo número de ovocitos recuperados. Se considera que una paciente es baja respondedora (BR) cuando presenta dos de las tres características: i) edad reproductiva avanzada (ERA) o algún otro factor de riesgo que provoca baja respuesta ovárica (tratamientos quimioterapéuticos, exposición a agentes ovotóxicos, etc. ii) un ciclo previo de baja respuesta (< 3 ovocitos recuperados) y iii) test de reserva ovárica anormal.¹

La angiogénesis ovárica juega un papel importante en el crecimiento folicular y la selección del folículo dominante, al permitir la entrega de nutrientes, hormonas y oxígeno desde los vasos sanguíneos del estroma al folículo, para lograr ovocitos de alta calidad.²⁻⁵ Durante la ERA se producen severos daños nucleares y citoplasmáticos en el ovocito, como consecuencia en parte a una inadecuada angiogénesis ovárica.⁶ En pacientes bajas respondedoras de ERA existe una disminución del flujo sanguíneo en el estroma ovárico, lo que sugiere que es necesario un suministro activo de sangre para la inducción de ovocitos de buena calidad.⁷ Asimismo, estudios de la vasculatura perifolicular antes de la aspiración ovocitaria durante los tratamientos de fertilización asistida revelaron que existe una correlación positiva entre un alto grado de vascularización y un mejor resultado de la fecundación *in vitro*.⁸⁻⁹

En casos de pacientes bajas respondedoras jóvenes se sabe que existe un aumento de los niveles de VEGF en fluidos foliculares (FF), y que a su vez están inversamente correlacionados con el número de ovocitos recuperados. Además, se observó alta resistencia sanguínea en las arterias perifoliculares, lo que indica un incremento en la angiogénesis ovárica.¹⁰

Previamente, en nuestro laboratorio, demostramos que la incubación de células endoteliales en presencia de FF de pacientes BR jóvenes aumentó la migración y la capacidad de formar túbulos respecto de células endoteliales incubadas con FF de pacientes normo respondedoras. Sin embargo, la incubación de células endoteliales en presencia de FF de pacientes ERA disminuyó la migración y la expresión de VEGF. Estos resultados indican que la angiogénesis ovárica en estas pacientes se encuentra alterada. Por lo tanto, la regulación de la angiogénesis ovárica podría representar una buena estrategia para mejorar la respuesta ovárica a gonadotropinas en pacientes BR.

En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto local de un esfingolípido bioactivo, la ceramida 1 fosfato (C1P) sobre la reserva folicular, la esteroidogénesis y la angiogénesis ovárica. Cabe mencionar que en los últimos años se ha observado un aumento en la literatura sobre las implicancias de los esfingolípidos en la salud y en la enfermedad.

Se utilizaron ratones hembra entre 26 y 31 semanas (ratones ERA) que recibieron C1P (10 μ l/ovario; 50 μ M) bajo la bursa de uno de los ovarios y el vehículo en el ovario contralateral. Ratones hembras entre 6 y 9 semanas se utilizaron como control de animales jóvenes. Los animales se sacrificaron 48 h luego de la cirugía y se les extrajeron los ovarios. Se realizaron cortes histológicos y extractos proteicos. Se obtuvo suero para medir los niveles de E2 y P4. En cortes teñidos con H&E, se cuantificó el porcentaje de folículos cprimordiales (FPri), primarios (FP), preantrales (FPr), antrales (FA) y atrésicos (FAtrés). Se evaluó la vasculatura ovárica inmunohistoquímica. Se midieron marcadores de reserva ovárica por western blot.

Este modelo de ratones ERA fue validado midiendo el número de ovocitos ovulados, el porcentaje de fertilización y el desarrollo embrionario. En animales ERA, estos parámetros disminuyeron respecto de animales jóvenes.

El porcentaje de FPri, FP, FPr y FA en animales ERA fue significativamente menor que en animales jóvenes ($p < 0,05$). El tratamiento con C1P aumentó el porcentaje de FPri, FP y FA en ratones ERA ($p < 0,05$). El porcentaje de FAtrés

en animales ERA fue significativamente mayor respecto de animales jóvenes, mientras que el tratamiento con C1P disminuyó el porcentaje de FAtrés. en animales ERA ($p < 0,05$). C1P fue capaz de aumentar la concentración sérica de E2 y P4 en animales ERA respecto de animales sin tratar ($p < 0,05$). Los niveles ováricos de AMH en ratones ERA tratados con C1P fueron significativamente más altos que en animales sin tratar ($p < 0,05$). Otro marcador de reserva ovárica evaluado fue Foxo3a. C1P disminuyó la relación pFoxo3a/Foxo3a (forma fosforilada/total) respecto de animales sin tratar ($p < 0,05$). El área de células endoteliales y periendoteliales aumentó en animales tratados con C1P respecto del grupo sin tratar ($p < 0,05$).

Como conclusión, la administración de C1P en ratones ERA mejoró ampliamente la respuesta ovárica, preservando la reserva ovárica y aumentando la vasculatura. Estos resultados podrían tener importantes implicancias clínicas en los tratamientos de la infertilidad asociada a la edad.

Referencias

1. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction* 2011; 26 (7): 1616-1624.
2. Geva E and Jaffe RB. *FertilSteril* 2000; 74: 429-438.
3. Fraser HM. *Reprod. Biol. Endocrinol* 2006; 4: 18.
4. Robinson RS et al. *Reproduction* 2009; 138: 869-881.
5. Araujo VR, Duarte AB, Bruno JB, Pinho Lopes CA, de Figueiredo JR. *Zygote* 2013; 21: 295-304.
6. Tatone C et al. *Hum. Reprod. Update* 2008; 14: 131-142.
7. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. *Fertil. Steril.* 2003; 79: 190-197.
8. Bhal PS et al. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 939-945.
9. Bhal PS, Pugh ND, Gregory L, O'Brien S, Shaw RW. *Hum.Reprod.* 2001; 16: 1682-1689.
10. Battaglia C, Genazzani AD, Regnani G, Primavera MR, Petraglia F, Volpe A. Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders. *Fertil Steril.* 2000; 74 (4): 809-812.

Efectos de la exposición perinatal a xenoestrógenos sobre la respuesta superovulatoria

Horacio Rodríguez

Una gran diversidad de sustancias presentes en el medio ambiente son capaces de alterar la homeostasis del sistema endocrino de los organismos, por lo que han sido denominadas perturbadores endocrinos (PEs) (NRC, 1999). Un porcentaje de los PEs son clasificados como estrógenos ambientales o xenoestrógenos: compuestos antropogénicos que se unen a los receptores de estrógenos y desencadenan una respuesta agonista o antagonista de la acción de los estrógenos endógenos (Safe SH, 1999).

Algunos de estos estrógenos ambientales pueden alterar la morfogénesis y diferenciación funcional gonadal, especialmente si la exposición ocurre durante períodos críticos del desarrollo (Colborn y col, 1993). Uno de estos compuestos es el Bisfenol A (BPA), un PE con actividad estrogénica y antiandrogénica (Lee y col, 2003), y uno de los químicos de mayor volumen de producción a nivel mundial, utilizado en la manufactura de policarbonatos plásticos y resinas epoxi, pesticidas, productos antioxidantes, selladores dentales y barnices. El BPA, por exposición al calor (ej: autoclavado, horno de microondas), se libera de los envases plásticos de bebidas y alimentos, de mamaderas y de la pintura que recubre el interior de las latas de conserva (Richter y col., 2007, Vandenberg y col., 2009). Algunos selladores odontológicos también liberan BPA en la saliva durante el proceso de polimerización (Krishnan y col., 1993; Pulgar y col., 2000). Como consecuencia de esta amplia exposición, se ha encontrado BPA en el 95% de la población estadounidense (Calafat y col., 2008), en el suero de fetos humanos de 15 a 18 semanas de gestación en concentraciones de 1-2 ng/ml y en el fluido amniótico en concentraciones 5 veces superiores a las séricas (10 ng/ml) (Ikezuki y col 2002).

El ovario es uno de los órganos reproductivos sensibles a la acción del BPA. Si bien su efecto

depende tanto de la dosis como del período de exposición, la ruta de entrada al organismo y la especie examinada, las poblaciones foliculares son un blanco de acción del BPA. En este sentido, se ha descrito que mujeres con altas concentraciones de BPA en suero y orina muestran una respuesta deficitaria a tratamientos de estimulación exógena en protocolos de fertilización in vitro (Caserta y col., 2011; Caserta y col., 2013; Mok-Lin y col., 2010; Rochester, 2013). En nuestro grupo, en los últimos años, hemos realizado algunos trabajos que muestran una serie de disfunciones ováricas causadas por la exposición a BPA, mostrando impactos negativos sobre los procesos de formación de las reservas de células germinales, que ocurren en etapas tempranas de la vida, sobre la activación de estas reservas en etapas posteriores, y sobre su respuesta al tratamiento con gonadotrofinas (Rodríguez y col., 2010; Rivera y col., 2011; Rivera y col., 2015; Santamaría y col., 2016; Santamaría y col., 2017).

La presente disertación se propone presentar los resultados obtenidos en algunos de estos trabajos, referidos tanto a BPA como también a otros xenoestrógenos a los que estamos expuestos cotidianamente.

Referencias

1. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. Population to bisphenol A and 4-tertiaryOctylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 39-44.
2. Caserta D, Bordi G, Ciardo F, Marci R, La Rocca C, Tait S, Bergamasco B, Stecca L, Mantovani A, Guerranti C, Fanello EL, Perra G, Borghini F, Focardi SE, Moscarini M. The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women, *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2013; 29: 444-447.
3. Caserta D, Mantovani A, Marci R, Fazi A, Ciardo F, La Rocca C, Maranghi F, Moscarini M. Environment and women's reproductive health. *Human reproduction update* 2011; 17: 418-433.
4. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environmental health perspectives* 1993; 101: 378-384.

5. Ikezuki, Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y and Take-tani Y. Determination of bisphenol-A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum. Reprod.* 2002; 17 (11): 2839-2841.
6. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L and Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993; 132 (6): 2279-2286.
7. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol-A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2003; 75: 40-46.
8. 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. *International journal of andrology* 2010; 33: 385-393.
9. National Research Council, USA. *Hormonally Active agents in the Environment*. National Academy Press, New York, 1999.
10. Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM and Olea N. Determination of bisphenol-A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* 2000; 108 (1): 21-27.
11. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walsler-Kuntz DR, vom Saal FS. In vivo effects of bisphenol-A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology* 2007; 24: 199-224.
12. Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez HA, Muñoz de Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to bisphenol-A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reproductive Toxicology* 2011; 32: 304-312.
13. Rivera O, Varayoud J, Rodríguez HA, Santamaría CG, Bosquiaz VL, Belmonte NM, Muñoz de Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction* 2015; 149: 645-655.
14. Rochester JR. Bisphenol-A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* 2013; 42: 132-155.
15. Rodríguez HA, Santambrosio N, Santamaría CG, Muñoz de Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to bisphenol-A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reproductive Toxicology* 2010; 30 (4): 550-557.
16. Safe SH. Environmental Estrogens. En: *Encyclopedia of Reproduction*, (Eds.), Academic Press 1999: 1100.
17. Santamaría CG, Durando M, Muñoz de Toro M, Luque EHL, Rodríguez HA. Ovarian dysfunctions in adult female offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol-A. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016; 158: 220-230.
18. Santamaría CG, Rodríguez HA, Abud JE, Rivera OE, Muñoz de Toro M, Luque EH. Perinatal exposure to bisphenol-A (BPA) impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in immature rats. *Reproductive Toxicology* 2017. In press (<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.050>).
19. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009; 30 (1): 75-95.