

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

“Ensayo clínico piloto de intervención nutricional para la inducción de cetosis y corrección de la glucotoxicidad en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico: efectos reproductivos y metabólicos”

T E S I S

Que presenta:

M. en C. Ana Cecilia Palafox Gómez

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en la Especialidad de Toxicología

Directora de Tesis:

Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño

Ciudad de México

Septiembre, 2023

Comité tutorial:

Dra. Esther López-Bayghen Patiño

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. Arturo Ortega Soto

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dra. Martha Elba González Mejía

Facultad de Medicina, BUAP

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño.

Este trabajo contó con el apoyo económico del programa PEI-CONACyT, proyecto 250768 otorgado a la Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño.

Agradecimientos

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
(CINVESTAV-IPN)

Departamento de Toxicología

Directora de Tesis:

Dra. Esther I. López-Bayghen Patiño

Comité evaluador:

Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. Arturo Ortega Soto

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dra. Martha Elba González Mejía

Facultad de Medicina, BUAP

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN

A la asistencia técnica de:

Dra. Leticia Ramírez Martínez, Auxiliar de Investigación, Departamento de Toxicología

Ing. Lucero Cervantes Pozos, Departamento de Toxicología

IBT Dinorah Hernández Melchor, Departamento de Toxicología/INGENES

Dra. Ginna Milena Ortiz Olivera, INGENES

Dr. Iván Madrazo Rodríguez, INGENES

Biól. Mol. Andrea Rodríguez Ruiz, INGENES

Biól. Abril Romero Jarillo, INGENES

Agradecimientos

Un enorme agradecimiento a mis dos pilares en la vida, a mis papás, Margarita y Serafín, por brindarme en cada momento todo su amor y por apoyarme en cada decisión que tomo, por sus consejos, por consentirme y esperarme siempre con los brazos abiertos... ustedes son mi motor, muchas gracias por todo.

A mi directora de tesis, la Dra. Esther López-Bayghen, le agradezco inmensamente por abrirme las puertas de su laboratorio y por toda la confianza que puso en mí para llevar a cabo este proyecto; gracias por su guía, tiempo y por siempre estar al pendiente. He aprendido mucho de usted durante todo este tiempo.

Agradezco a mi comité evaluador por su tiempo y dedicación en la revisión de la tesis, por sus observaciones y sugerencias, a la Dra. María Isabel Hernández, al Dr. Arturo Ortega, a la Dra. Martha Elba González y al Dr. Jesús Alberto Olivares.

Un agradecimiento muy especial y con mucho cariño a la Dra. Leticia Ramírez Martínez, gracias por toda la enseñanza, por todo el apoyo en el laboratorio, por escucharme cuando lo necesitaba...ha sido un gran honor haber trabajado juntas en estos últimos años, aprendí bastante a tu lado, y también fue muy divertido.

No pueden faltar Lucero y Dinorah, muchas gracias por sus consejos, por compartir sus conocimientos, por todo su apoyo y motivación, hicieron que mi estancia fuera realmente amena, un lindo ambiente de trabajo. Le quiero agradecer a Ger, por sus consejos y compañía en este trayecto. También agradezco a July y Luz por todo el ánimo que me han dado desde el momento en que llegaron al laboratorio.

Le quiero agradecer a una personita muy especial, alguien que se cruzó en mi camino para hacerlo aún más bonito. Gus de mi corazón, gracias por acompañarme, cuidarme, por darme todo tu cariño, por subirme el ánimo y motivarme en este trayecto, por escucharme y aconsejarme. Gracias por todo tu apoyo, te amo.

Gracias a mis compañeros del Departamento de Toxicología, por los buenos momentos que compartimos en este recorrido. En especial a Andrea Cázares, mi amiga y roomie, fue lindo haberla conocido y compartir el tiempo a su lado, gracias por las tardes de té, películas, pláticas, etc.

Por último, pero no menos importante, un agradecimiento inmenso a todas las pacientes que confiaron en nosotras, en nuestro conocimiento y guía para apoyarlas en su camino en la búsqueda de lograr tener un bebito.

“No basta con querer: debes preguntarte a ti mismo qué vas a hacer para conseguir lo que quieres”

Franklin D. Roosevelt

Índice

Índice	7
Índice de figuras	10
Índice de tablas	10
Resumen	13
Abstract.....	14
1 Introducción.....	16
1.1. Alteraciones en la foliculogénesis	16
1.2. Síndrome de Ovario Poliquístico	16
1.2.1. Diagnóstico	17
1.2.2. Epidemiología	18
1.2.3. Alteraciones neuroendócrinas	19
1.3. Manifestaciones clínicas del Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP).....	20
1.3.1. Glucotoxicidad e hiperinsulinemia	21
1.4. Síndrome metabólico y Síndrome de Ovario Poliquístico.....	23
1.4.1 Síndrome de Ovario Poliquístico y resistencia a la insulina.....	25
1.5. Atención y tratamiento para la mujer con SOP	28
1.5.1. Farmacológico para control endócrino y metabólico.....	28
1.5.2. Control de la glucotoxicidad e inducción de cetosis.....	30
1.5.3. Tratamiento de la infertilidad	33
2. Justificación.....	37
3. Hipótesis.....	38
4. Objetivos.....	38
4.1 Objetivo general.....	38
4.2 Objetivos particulares	38
5. Métodos.....	39
5.1 Estrategia experimental.....	39
5.2 Diseño de estudio	40
5.3 Criterios de selección	41
5.3.1 Criterios de inclusión	41
5.3.2 Criterios de exclusión	41
5.3.3 Criterios de eliminación	41
5.4 Diagnóstico de Síndrome de Ovario Poliquístico	42
5.4.1 Principio	42
5.4.2 Procedimiento.....	42

5.5	Presencia de indicadores de Síndrome Metabólico	43
5.5.1	Principio	43
5.5.2	Procedimiento.....	43
5.6	Resultados de análisis clínicos.....	43
5.6.1	Principio	43
5.6.2	Procedimiento.....	44
5.7	Cuantificación de insulina.....	44
5.7.1	Principio	44
5.7.2	Procedimiento.....	44
5.8	Cálculo de biomarcadores para el diagnóstico de RI.....	46
5.8.1	Principio	46
5.8.2	Procedimiento.....	46
5.9	Inducción de cetosis	47
5.9.1	Principio	47
5.9.2	Procedimiento.....	47
5.10	Determinación de presencia de cetonas en orina.....	47
5.10.1	Principio	47
5.10.2	Procedimiento.....	48
5.11	Evaluación de indicadores reproductivos y obstétricos en un ciclo de FIV.....	48
5.11.1	Principio.....	48
5.11.2	Procedimiento	48
5.12	Cuantificación de estradiol	49
5.12.1	Principio.....	49
5.12.2	Procedimiento	50
5.13	Análisis de los efectos de la exposición a insulina en las células de la cúmula	50
5.13.1	Principio	50
5.13.2	Procedimiento.....	51
5.14	Ensayo de captura de glucosa	51
5.14.1	Principio	51
5.14.2	Procedimiento.....	52
2	Resultados	54
6.1	Diseño de una intervención nutricional para inducir cetosis y corregir la RI.....	54
6.1.1	Intervención nutricional.....	56
6.1.2	Detección de cetosis.....	57
6.2	Corrección de la de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina después de la intervención nutricional.....	58

6.3	Efecto de la intervención nutricional sobre los parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos	61
6.4	Resultados reproductivos después de la intervención nutricional	63
6.4.1	Efecto de la IN sobre los parámetros reproductivos	63
6.4.2	Efecto de la intervención sobre el grosor del endometrio	65
6.4.3	Resultados obstétricos después de lograr la cetosis nutricional.....	66
6.4.4	Recién nacidos vivos.....	68
6.5	Respuesta metabólica funcional en las células de la cúmula	68
6.5.1	Ensayo de captura de glucosa en respuesta a insulina	68
6.5.2	Respuesta funcional al reto con insulina en las células de la cúmula en paciente individual.....	71
6.6	HOMA-IR, IMC y respuesta de la estimulación ovárica controlada (EOC) en las pacientes con SOP	73
7.	Discusión.....	76
8.	Conclusiones	84
9.	Perspectivas	84
10.	Referencias.....	85
11.	Anexos.....	92
	Anexo 1: Artículos publicados.....	92
	Anexo 2: Consentimiento Informado para la Intervención Nutricional dirigido a las pacientes con síndrome de ovario poliquístico	113
	Anexo 3: Consentimiento Informado para análisis de células de la cúmula.	116
	Anexo 4: Presentación en foros internacionales	118

Índice de figuras

Figura 1. Fisiopatología del Síndrome de Ovario Poliquístico: mecanismo neuroendócrino propuesto	20
Figura 2. Señalización inducida por la insulina en células de la teca ováricas y mecanismo propuesto de la respuesta a la insulina.	27
Figura 3. Proceso de la Fertilización in vitro (FIV).	33
Figura 4. Diseño experimental del ensayo clínico piloto de intervención nutricional	39
Figura 5. Estructura organizacional del proyecto	40
Figura 6. Reporte detallado para estudios observacionales en epidemiología.	55
Figura 7. Cambio en el consumo de macronutrientes totales (A) y proporción de macronutrientes antes y durante la intervención nutricional (B).	57
Figura 8. Tiempo y generación de un estado de cetosis.	58
Figura 9. Concentración de insulina de cada una de las pacientes antes y después de la intervención nutricional.	59
Figura 10. Modificación del índice HOMA-IR después de seguir la intervención nutricional.	60
Figura 11. Número de signos o síntomas del Síndrome metabólico (SM) de cada paciente antes y después de la intervención.	63
Figura 12. Estandarización de la captura de glucosa en células de la cúmula.	70

Índice de tablas

Tabla 1. Evolución de los criterios de diagnóstico de Síndrome de Ovario Poliquístico	18
Tabla 2. Definiciones de Síndrome Metabólico	24
Tabla 3. Unificación de criterios para el diagnóstico de Síndrome Metabólico	25
Tabla 4. Promedio de insulina y biomarcadores asociados a RI de las pacientes antes y después de la intervención nutricional.	59
Tabla 5. Porcentaje de pacientes que normalizaron o disminuyeron su valor HOMA-IR después de la intervención nutricional.	61
Tabla 6. Valores antropométricos antes y después de seguir la intervención nutricional.	61
Tabla 7. Valor promedio de cada signo de síndrome metabólico antes y después de seguir la intervención nutricional.	62
Tabla 8. Parámetros reproductivos antes y después de seguir la intervención nutricional.	64
Tabla 9. Calidad de los embriones antes y después de seguir la intervención nutricional.	65
Tabla 10. Cambio en el grosor del endometrio antes y después de seguir la intervención nutricional.	66
Tabla 11. Logro de embarazo después de seguir la intervención nutricional.	67
Tabla 12. Características de recién nacidos vivos	68
Tabla 13. Respuesta funcional de las células de la cúmula y datos obstétricos de las pacientes con factor SOP.	72
Tabla 14. Respuesta funcional de las células de la cúmula y datos obstétricos de las pacientes con infertilidad por factor edad	73
Tabla 15. Impacto de la RI e IMC en la respuesta a la EOC y los resultados obstétricos en pacientes con SOP	75

Abreviaturas

SOP	Síndrome de ovario poliquístico
SM	Síndrome metabólico
CH	Carbohidratos
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
HDL-C	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
RI	Resistencia a la Insulina
EOC	Estimulación ovárica controlada
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
AMH	Hormona anti-Mülleriana
FSH	Hormona foliculoestimulante
MOP	Morfología del ovario poliquístico
NIH	Institutos Nacionales de Salud
OA	Oligoanovulación
HA	Hiperandrogenismo
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana
ASRM	Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
DO	Disfunción ovulatoria
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
ER	Receptor de estrógenos
AGES	Productos finales de glicación avanzada
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
DM	Diabetes mellitus
ECV	Enfermedad cardiovascular
OMS	Organización Mundial de la Salud
EGIR	Estudio de la Resistencia la Insulina
NCEP-ATP III	Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol y el Panel III de Tratamiento del Adulto

NHLBI	Asociación Estadounidense del Corazón y el Instituto Nacional del Corazón, Sangre y Pulmón
IDF	Federación Internacional de Diabetes
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
StAR	Proteína de la regulación esteroideogénica aguda
SGLT2	Cotransportador sodio-glucosa tipo 2
HMG-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA
AcAc	Acetoacetato
BDH1	D-hidroxiacetato deshidrogenasa
MCT	Proteínas transportadoras de monocarboxilato
BHB	Betahidroxiacetato
SCOT	3-oxoácido-CoA transferasa
2DG6P	2-deoxiglucosa-6-fosfato
2DG	2-deoxiglucosa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
PKC	Proteína cinasa C
LCAT	Lecitin-colesterol transferasa
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
IGFBP-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden endócrino-reproductivo que afecta al 15% de mujeres en edad reproductiva. Las mujeres con SOP presentan hiperandrogenismo, oligo/anovulación y ovario poliquístico que contribuyen al desarrollo de problemas de infertilidad. La fisiopatología del SOP incluye la alteración del eje hipotálamo-pituitaria y la disfunción metabólica asociada con la glucotoxicidad y con la hiperinsulinemia. El exceso de insulina contribuye al hiperandrogenismo actuando directamente sobre el hipotálamo y la pituitaria, provocando niveles anormales de gonadotropinas actuando sinérgicamente con la Hormona Luteinizante para aumentar la producción de andrógenos a nivel ovárico (altera la esteroidogénesis en las células de la teca). De los varios desórdenes hormonales que presentan estas pacientes, la hiperinsulinemia y la insensibilidad a la insulina son aspectos regulables si se controla la exposición ambiental a los carbohidratos (CH). La glucotoxicidad (exposición persistente a más de 150g de CH totales/día) genera hiperinsulinemia constante, resistencia a la insulina (RI) y contribuye al desarrollo de los signos clásicos del síndrome metabólico (SM). El control de la ingesta de CH puede contribuir a evitar la hiperinsulinemia, mejorar la salud metabólica y con ello generar una mejor respuesta ovulatoria, endometrial con la mejora de los indicadores reproductivos y el logro de un embarazo mediante Fertilización *in vitro* (FIV).

El objetivo de este estudio fue inducir cetosis nutricional en pacientes con SOP con RI, signos de SM, y con ciclo fallido de FIV, controlando la glucotoxicidad y la hiperinsulinemia por medio de una intervención nutricional que corrija la exposición excesiva a CH y analizar su efecto sobre los parámetros metabólicos y reproductivos.

Este fue un estudio piloto con 12 pacientes SOP atendidas en el Instituto Ingenes con un ciclo de FIV sin lograr el embarazo, que aceptaron participar en el estudio, y mostraron signos/síntomas de SM (definición Harmonized) y RI (HOMA-IR>1.96). Se modificó la dieta disminuyendo el consumo de CH (máximo 50g/día), moderando proteínas (máx. 25%) y ajustando consumo calórico con grasas saludables, para inducir cetosis nutricional definida por la presencia de acetoacetato en orina = 40mg/dl). La intervención tuvo una duración variable (mínima de 6 semanas); al final de la intervención y antes de iniciar la estimulación ovárica controlada, se evaluaron nuevamente los parámetros metabólicos, y las pacientes se sometieron a un nuevo ciclo de FIV. Tras la estimulación ovárica controlada, se hizo la captura ovular y la FIV, y se evaluaron los indicadores reproductivos (número de ovocitos colectados, tasa de fertilización, embriones viables en estado de blastocistos de buena calidad en el día 5, embriones transferidos, grosor endometrial) y obstétricos (porcentaje de implantación, logro de embarazo bioquímico y clínico, embarazo en curso y recién nacido vivo).

De las 37 pacientes candidatas a participar en este estudio, se valoró el efecto combinado de la disminución de la RI y los signos del SM 12 pacientes SOP con un ciclo previo de FIV que fue fallido y con RI (HOMA-IR > 1.96). La intervención nutricional tuvo una duración de 14 ± 11 semanas y la cetosis nutricional se logró en 13.4 ± 8.1 días. El consumo de CH disminuyó de 208 ± 50.5 g/día a 41.71 ± 10.1 g/día, resultando en disminución significativa en el peso corporal (-7.9 ± 1.1 kg) y en la glucosa en ayuno (-11.4 ± 3.5 mg/dl), los triglicéridos (-43.8 ± 11.6 mg/dl), la insulina en ayuno (-11.6 ± 3.6 μ U/ml) y en

el índice HOMA-IR (-3.28 ± 1.27). Al haber logrado la cetosis y con la disminución en la RI, las pacientes iniciaron un siguiente ciclo FIV. Al comparar los parámetros reproductivos entre ambos ciclos, no hubo diferencia significativa en número de ovocitos, tasa de fertilización y embriones viables producidos. Sin embargo, si hubo una mejora significativa en la tasa de implantación embrionaria (83.3 vs 8.3%), embarazo clínico (66.7 vs 0%), y en embarazo en curso/tasa de nacido vivo (66.7% vs 0%). Interesantemente, el crecimiento endometrial si mostró una tendencia hacia la mejora en el grosor al momento de la transferencia, lo que puede explicar la mejor tasa de embarazo exitoso. En conclusión, la restricción en el consumo de CH en pacientes SOP indujo cetosis nutricional, mejoró los parámetros metabólicos y disminuyó la RI, permitiendo que, en el nuevo ciclo de FIV, las tasas embarazo y recién nacido vivo mejoraran significativamente.

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine-reproductive disorder that affects 15% of women of reproductive age. Women with PCOS have hyperandrogenism, oligo/anovulation, and polycystic ovary that contribute to the development of infertility problems. The pathophysiology includes alteration of the hypothalamic-pituitary axis and metabolic dysfunction associated with glucotoxicity and hyperinsulinemia. Excess insulin contributes to hyperandrogenism by acting directly on the hypothalamus and/or pituitary, causing abnormal levels of gonadotropins or by acting synergistically with Luteinizing Hormone to increase androgen production at the ovarian level (it alters steroidogenesis in theca cells). Of the various hormonal disorders presented by these patients, hyperinsulinemia and insulin insensitivity are regulable aspects if environmental exposure to carbohydrates (CH) is controlled. Glucotoxicity (persistent exposure to more than 150g total CH/day) generates constant hyperinsulinemia and insulin resistance (IR) and contributes to the development of the classic signs of metabolic syndrome (MS). We hypothesized that controlling CH intake can help avoid hyperinsulinemia, improve metabolic health, generate a better ovulatory and endometrial response, and improve reproductive indicators and pregnancy achievement through *In Vitro* Fertilization (IVF).

The objective of this study was to induce nutritional ketosis in patients with PCOS, signs of MS, and a previous failed IVF cycle, controlling glucotoxicity and hyperinsulinemia through a nutritional intervention that corrects excessive exposure to carbohydrates and analyzing its effect on metabolic and reproductive parameters through a prospective study with patients treated at the Ingenes Institute with PCOS who have already gone through an IVF cycle without achieving during pregnancy, agreed to participate in the study, with signs/symptoms of MS (Harmonized definition) and presenting insulin resistance (HOMA-IR > 1.96). The diet was modified by decreasing HC intake (maximum 50g/day), moderating protein (max. 25%), and adjusting healthy fat intake to induce nutritional ketosis defined by the presence of acetoacetate in urine = 40mg/dl). The intervention had a variable duration (minimum of 6 weeks); at the end of the intervention and to initiate controlled ovarian stimulation, metabolic parameters were reassessed, and patients underwent a new IVF cycle. After controlled ovarian stimulation, ova were collected and

in vitro fertilization was performed. Reproductive indicators such as the number of oocytes collected, fertilization rate, viable embryos in blastocyst state of good quality on day 5, embryos transferred, endometrial thickness), and obstetric (percentage of implantation, achievement of biochemical and clinical pregnancy, ongoing pregnancy, and live newborn) were evaluated.

This study assessed the combined effect of decreased IR and signs of MS on obstetric outcomes in PCOS patients whose infertility problem is treated by IVF. We evaluated 12 PCOS patients with a previous cycle of IVF that failed and with RI (HOMA-IR > 1.96). Patients followed a ketogenic diet (50 g carbohydrate/1800-2000 calories/day); The development of nutritional ketosis was monitored by the presence of ketone bodies in urine (>40 mg/dl), changes in biochemical and anthropometric parameters, as well as in reproductive and obstetric indicators. The nutritional intervention lasted 14 ± 11 weeks, and nutritional ketosis was achieved in 13.4 ± 8.1 days. Carbohydrate consumption decreased from 208 ± 50.5 g/day to 41.71 ± 10.1 g/day, resulting in significantly decreased body weight (-7.9 ± 1.1 kg), and fasting glucose (-11.4 ± 3.5 mg/dl), triglycerides (-43.8 ± 11.6 mg/dl), fasting insulin (-11.6 ± 3.6 μ U/ml) and HOMA-IR index (-3.28 ± 1.27). Upon ketosis achievement and decreased in IR, the patients started another IVF cycle. When comparing reproductive parameters between both cycles, there was no significant difference in the number of oocytes, fertilization rate, and viable embryos produced. However, there was a significant improvement in embryo implantation rate (83.3% vs. 8.3%), clinical pregnancy (66.7 vs. 0%), and ongoing pregnancy/live birth rate (66.7% vs. 0%). Interestingly, endometrial growth did show a trend toward improvement in thickness at the time of transfer, which may explain the better rate of successful pregnancy. In conclusion, restriction in carbohydrate consumption in PCOS patients induced nutritional ketosis, improved metabolic parameters, and decreased IR, allowing pregnancy and live newborn rates to improve significantly in the new IVF cycle.

1 Introducción

1.1. Alteraciones en la foliculogénesis

En humanos, los factores que tienen influencia en el crecimiento folicular se coordinan de tal manera que solo se seleccione, de forma secuencial, un folículo terminal para su maduración y ovulación. De esta forma, existe un balance dinámico entre folículos en crecimiento e inactivos. Hay condiciones que conducen a la pérdida en el balance entre los andrógenos, la hormona anti-Mülleriana (AMH) y la hormona foliculoestimulante (FSH), resultando en arresto folicular. El exceso de hormona luteinizante (LH) impulsa a las células de la teca a producir andrógenos, lo que resulta en que la concentración de FSH y la conversión de andrógenos a estradiol es insuficiente. En consecuencia, falla la selección de un folículo dominante, resultando en anovulación crónica. Además, la AMH secretada por las células de la granulosa también participa en este desbalance, ya que inhibe la transición de folículos primordiales a primarios. Una patología asociada a esta alteración es el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que se caracteriza por un mayor crecimiento de los folículos pequeños, pero subsecuentemente conduce al arresto del crecimiento, y a la morfología poliquística típica [1-4].

1.2. Síndrome de Ovario Poliquístico

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es la endocrinopatía más común en mujeres en edad reproductiva, su etiología es compleja y heterogénea [5, 6]. El SOP fue descrito por primera vez por Stein y Leventhal en 1935 cuando mostraron una asociación entre la presencia de ovarios bilaterales poliquísticos y signos de amenorrea (ausencia de menstruación), oligomenorrea (alteración del ciclo menstrual), hirsutismo (crecimiento excesivo de vello) y obesidad [7, 8].

En 1982, un estudio histológico mostró la apariencia poliquística de los ovarios como un aumento en el número de folículos en crecimiento que miden <10 mm de diámetro. Debido a que el folículo ovárico puede parecerse visualmente a un "quiste", la presencia de imágenes "quísticas" en el ovario puede considerarse como un evento normal. Un número excesivo se debe considerar patológico, y el SOP es la causa

principal. Con la llegada de la ecografía, el exceso de folículos se convirtió en el aspecto principal de la morfología del ovario poliquístico (MOP), asimismo también se consideraron marcadores de esta patología al aumento del área y volumen ováricos, siempre que las mediciones se realicen en una sección mediana de los ovarios [9, 10].

1.2.1. Diagnóstico

En las últimas tres décadas se han propuesto tres diferentes sistemas con criterios de diagnóstico semejantes y variaciones entre ellos (Tabla 1). El primer criterio formal para clasificar el SOP resultó de la conferencia del Instituto Nacional de la Salud del Niño y Desarrollo Humano de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos en abril de 1990, considerando el hiperandrogenismo (HA) y la oligoanovulación crónica (OA) como características clave del diagnóstico de SOP [11, 12].

La segunda definición fue basada en la opinión consensuada de 27 expertos sobre el SOP, que se reunieron en Rotterdam, Países Bajos, en mayo de 2003. La conferencia fue parcialmente patrocinada por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM). Como resultado de este encuentro, las características vistas en ultrasonido para la morfología ovárica poliquística se añadieron a la definición del NIH de 1990, haciéndolo más completo. Para definir el SOP, de acuerdo con el criterio de ESHRE/ASRM de 2003, se requiere la presencia de dos de los tres parámetros siguientes: 1) signos clínicos o bioquímicos de HA; 2) disfunción ovulatoria crónica (DO); y 3) MOP [11, 13, 14].

En el 2006, se reunió el grupo de trabajo formado por la Sociedad de Exceso de Andrógenos y SOP (AE-SOP), compuesto por cinco investigadores de los Estados Unidos y seis de Europa y Australia, quienes hicieron una revisión sistemática de la literatura publicada, concluyendo que el SOP es un trastorno en el que predomina el exceso de andrógenos y que el diagnóstico conciso de SOP debería basarse en la presencia clínica o bioquímica de HA en combinación con la disfunción ovárica (por ejemplo, DO o MOP), excluyendo otros casos [11, 15, 16].

En el 2012, el NIH llevó a cabo un taller de SOP con Metodología Basada en Evidencia, para analizar Beneficio e Inconvenientes de los criterios de diagnóstico existentes. Como resultado, el panel recomendó el uso de los criterios más amplios a los recomendados por ESHRE/ASRM del 2003, acompañados con una descripción más detallada del fenotipo SOP incluido. El panel consenso NIH recomendó el uso de la siguiente clasificación del fenotipo [11, 17]: Fenotipo A: HA + DO + MOP; Fenotipo B: HA + DO; Fenotipo C: HA + MOP; y Fenotipo D: DO + MOP. Sin embargo, en la clínica, el diagnóstico se hace con los criterios de Róterdam.

Tabla 1. Evolución de los criterios de diagnóstico de Síndrome de Ovario Poliquístico

Parámetro	NIH 1990	ESHRE/ASRM 2003	AE-SOP 2006	NIH 2012 extensión de ESHRE/ASRM 2003
Criterio	HA OA	HA DO MOP	1. HA 2. Disfunción ovárica (DO y/o MOP)	1. HA 2. DO 3. MOP
Limitaciones	1. Se requieren dos de dos criterios	1. Se requieren dos de tres criterios	1. Se requieren dos de dos criterios	1. Se requieren dos de tres criterios y, 2. Identificación de fenotipos específicos incluidos A: HA + DO + MOP B: HA + DO C: HA + MOP D: DO + MOP
Exclusión de etiologías relacionadas o imitadas				
<small>AE-SOP= Sociedad de Exceso de Andrógenos y SOP; ASRM= Sociedad Americana de Medicina Reproductiva; ESHRE= Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología; HA= Hiperandrogenismo; NIH= Institutos Nacionales de Salud; OA= Oligo-anovulación; DO= Disfunción ovárica; MOP= Morfología del ovario poliquístico.</small>				

(Tomado y modificado de [11])

1.2.2. Epidemiología

El SOP es un trastorno endócrino complejo diagnosticado comúnmente en mujeres en edad reproductiva. El rango estimado de su prevalencia varía entre el 5% y el 15% [18-20]. Otro estudio publicado en el 2010, específicamente con mujeres jóvenes mexicanas, mostró un 6.6% diagnosticadas con SOP de acuerdo con los criterios de Rotterdam en un grupo con IMC entre 28.7 y 27.4 kg/m² [21].

En la epidemiología de este síndrome, se hace notar su asociación con problemas metabólicos. En un estudio publicado en el 2005 se reportó una alta prevalencia de SOP en mujeres Hispanoamericanas (13%) quienes tienen a un miembro de la familia con enfermedad coronaria. Estas mujeres obesas, comparadas con mujeres sin SOP (Índice

de Masa Corporal -IMC- de 34.2 y 29.1 kg/m², respectivamente), mostraron mayor resistencia a la insulina. Estos resultados fueron consistentes con estudios de pacientes SOP previos donde encontraron mayor resistencia a la insulina y síndrome metabólico en mujeres Hispanoamericanas normoglucémicas comparadas con mujeres americanas blancas y negras [19, 22, 23].

1.2.3. Alteraciones neuroendócrinas

En el SOP interactúan factores endócrinos, metabólicos, genéticos y ambientales intrínsecos [8]. Una de las numerosas teorías propuestas explica que la fisiopatología del síndrome se da por la alteración en el eje hipotalámico-pituitaria, resultando en un desajuste en la secreción de las gonadotropinas por el hipotálamo con la consiguiente elevación en los niveles de la hormona luteinizante (LH) y niveles normales o bajos de la hormona foliculoestimulante (FSH) [24, 25].

Se ha reportado un aumento en la frecuencia del pulso de LH y en la proporción LH:FSH en mujeres con SOP [25, 26], lo que genera hiperplasia de las células de la teca y la producción elevada de andrógenos [27]. Este patrón de secreción de gonadotropinas sugiere un aumento en el pulso de estimulación de la frecuencia por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y un aumento en la actividad de las neuronas secretoras de GnRH río arriba en el hipotálamo. La actividad de las neuronas secretoras de GnRH y el patrón de secreción pulsátil de GnRH, desde sus terminales en la eminencia media, dependen en gran medida de la retroalimentación homeostática de la señalización de la hormona esteroidea gonadal en el cerebro. Las neuronas secretoras de GnRH expresan al receptor de estrógenos (ER) β [25, 27, 28].

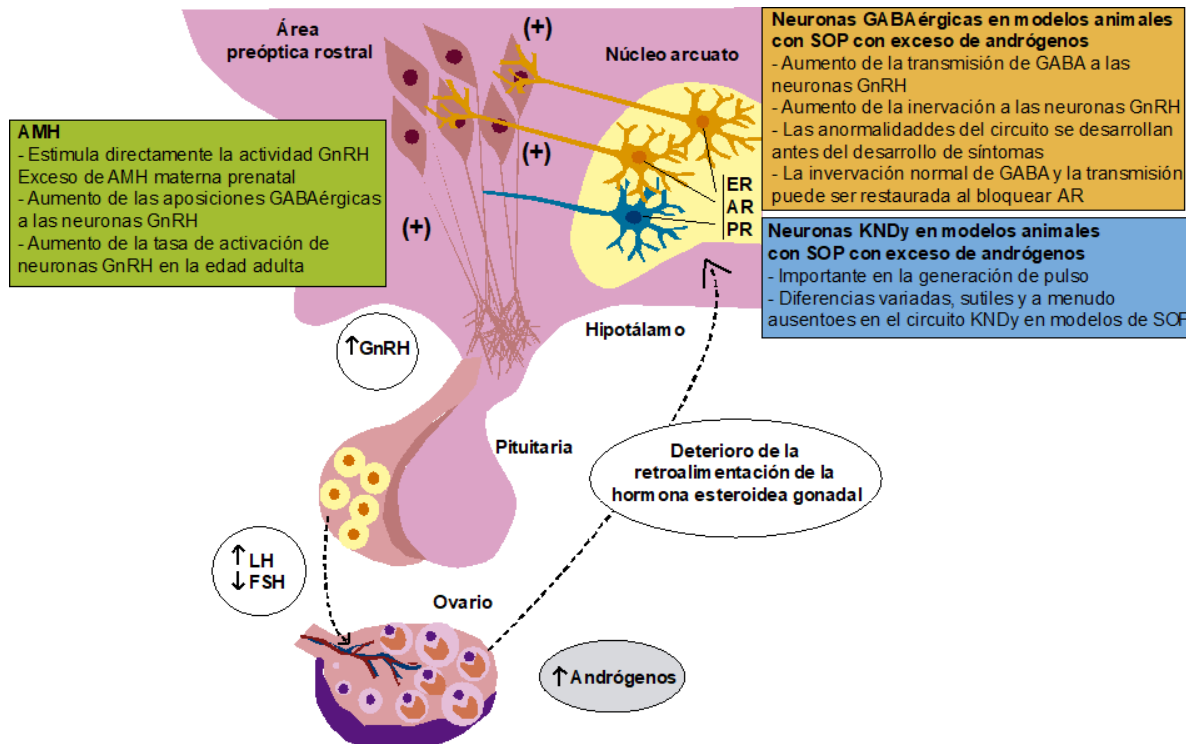


Figura 1. Fisiopatología del Síndrome de Ovario Poliquístico: mecanismo neuroendócrino propuesto

AMH= Hormona anti-Mülleriana; AR= Receptor de andrógenos; ER= Receptor de estrógenos; FSH= Hormona foliculoestimulante; GABA= Ácido γ -aminobutírico; GnRH= Hormona de gonadotropinas; LH= Hormona luteinizante; KNDy= Neuronas Kisspeptina, Neuroquinina B y Dinorfina; PR= Receptor de progesterona; SOP= Síndrome de ovario poliquístico.

(Tomado y modificado de [27])

1.3. Manifestaciones clínicas del Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)

La hiperandrogenemia es una de las características bioquímicas del SOP. Entre el 80 y el 90% de las mujeres con oligomenorrea presentan niveles elevados de andrógenos circulantes. En el examen de laboratorio, los niveles de testosterona libre son anormales. Por otro lado, los niveles de estradiol se encuentran constantemente en el rango folicular temprano sin el aumento normal del ciclo medio. Los niveles de estrona son elevados debido a la aromatización extra glandular de la androstenediona circulante. En cuanto a la LH, las concentraciones séricas de LH y la proporción LH:FSH con frecuencia se encuentran elevadas en las mujeres afectadas [29].

La disfunción menstrual es común y se caracteriza por oligomenorrea y, con menos frecuencia, amenorrea. El inicio de los ciclos anovulatorios con frecuencia se encuentra precedido por el aumento de peso y la obesidad abdominal, las cuales son características que suelen presentar las mujeres con SOP, así como la presencia de RI con SOP [29, 30]. Las mujeres con SOP suelen descuidar los problemas menstruales y, la razón principal por la que la paciente busca asesoramiento es debido a la infertilidad anovulatoria. Las mujeres con SOP tienen un mayor riesgo de aborto espontáneo, diabetes gestacional, preeclampsia y parto prematuro [8, 30].

1.3.1. Glucotoxicidad e hiperinsulinemia

Paracelso, Padre de la Toxicología (1493-1541), acuñó la frase “la dosis hace al veneno”. Esta expresión puede aplicarse también los carbohidratos cuyo consumo excesivo en la dieta estándar americana puede ligarse a las epidemias de obesidad y diabetes tipo 2 que se manifiestan claramente en las sociedades occidentales [31]. Hay una alta prevalencia de diabetes en adultos mexicanos, y los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de diagnóstico para diabetes son la edad y la obesidad. Para cerca de la mitad de estos mexicanos han implementado estrategias para el control glucémico y la prevención de complicaciones, sugiriendo principalmente modificaciones en el estilo de vida, como la dieta [32]. Con respecto a los carbohidratos, se ha demostrado que los azúcares, incluyendo la glucosa y la fructosa, son capaces de inducir síndrome metabólico [33]. Actualmente, la sacarosa y el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa son los principales edulcorantes en la dieta occidental, su ingesta aporta del 15 al 20% de la energía total en el adulto promedio y es frecuente que las personas ingieren el 25% de las calorías diarias o más en forma de azúcares añadidos [34].

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en individuos normales se regula por la producción y el uso, asegurando que sólo se produzcan modestas fluctuaciones de la concentración de glucosa. Tras la ingesta de carbohidratos, el monosacárido principal, la glucosa induce la estimulación de la secreción de insulina. La mayoría de la glucosa es utilizada por los tejidos dependientes de insulina (músculo,

tejido adiposo e hígado). Las células- β del páncreas se encuentran exquisitamente diseñadas para liberar insulina particularmente por la presencia de glucosa [35]. La insulina, es una hormona hipoglucemiante, esencial en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa por varios mecanismos, incluyendo la incorporación de la glucosa dentro de las células a través de la traslocación del transportador de glucosa a la membrana plasmática y fomentando la glucólisis a través del aumento de la actividad de enzimas glucolíticas [36].

La pérdida en la homeostasis de la glucosa conduce al aumento crónico en la concentración de glucosa sanguínea (hiperglicemia). A diferencia de la concentración fisiológica, una concentración superfisiológica crónica de glucosa resulta en efectos negativos a un gran número de órganos y tejidos [37], generando glucotoxicidad. La raíz de esta palabra, “toxicidad”, implica daño y lleva a la consideración de que los niveles de glucosa que ingresan por consumo o se sintetizan en riñón e hígado pueden ser tan altos que causan efectos patológicos [38]. Particularmente relevantes son los daños causados en los endotelios de los vasos de menor diámetro y la acumulación de productos glicosilados (AGES) [39-41].

La elevación crónica de glucosa en plasma provoca el deterioro en la acción y en la secreción de insulina [42]. Las células sanas se encuentran sujetas a hiperglucemia aguda que ocasiona la liberación adicional de insulina desde las células pancreáticas para intentar la incorporación de glucosa en los tejidos. Si la hiperglucemia persiste, el páncreas mantiene la secreción de insulina, resultando en un estado de hiperinsulinemia compensatoria [43].

La hiperinsulinemia ha sido claramente vinculada al desarrollo de síndrome metabólico, y derivado de éste, las enfermedades crónico-degenerativas más prevalentes en las mujeres SOP: diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y gestacional, así como enfermedades cardiovasculares [44-46]. También es un factor de riesgo independiente para otras condiciones diversas en las que se incluyen la obesidad inducida por la dieta, osteoartritis, algunos tipos de cáncer como de colon/recto y de mama, Alzheimer y otras demencias [47-49]. Hay cinco mecanismos de daño asociados a la hiperinsulinemia: 1) el aumento

de las especies reactivas de oxígeno y productos finales de glicación avanzada; 2) aumento del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1); 3) hiperglucemia; 4) aumento en la producción de ácidos grasos/triglicéridos; 5) inflamación crónica al aumentar la producción de citocinas [43].

1.4. Síndrome metabólico y Síndrome de Ovario Poliquístico

El SM se refiere a la concurrencia de varios factores de riesgo para enfermedades crónico-degenerativas que incluyen la resistencia a la insulina (RI), obesidad, dislipidemia aterogénica e hipertensión. Estas condiciones están relacionadas y comparten mediadores, mecanismos y vías [50]. Los signos de síndrome metabólico (SM) como obesidad abdominal, dislipidemia, hiperglucemia e hipertensión, se observan frecuentemente en las mujeres con SOP; la presencia de SM predispone a estas pacientes a desarrollar DM2 y enfermedad cardiovascular (ECV) [51] con más frecuencia.

Son cuatro las definiciones más comunes de SM. La primera definición de SM fue desarrollada en 1998 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo la primera en vincular los componentes clave, la RI, obesidad, dislipidemia e hipertensión. Esta definición exige que la RI se encuentre presente, incluso si se cumplieran los demás criterios, en ausencia de RI, el paciente no tendría SM [50, 52].

En 1999, el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR) propuso una modificación de la definición de la OMS. El EGIR también consideró fundamental a la RI dentro de la fisiopatología del SM, por lo que también formó parte de la definición. El criterio de la obesidad se simplificó a la circunferencia de la cintura, mientras que en la definición de la OMS se elige entre la proporción cintura:cadera o el IMC. También se eliminó la Microalbuminuria de los criterios de diagnóstico [50, 53].

En el 2001, el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol y el Panel III de Tratamiento del Adulto (NCEP-ATP III) diseñó una definición para el SM, actualizada en el 2005 por la Asociación Estadounidense del Corazón y el Instituto Nacional del Corazón, Sangre y Pulmón (NHLBI). Esta definición es una de las más utilizadas e incorpora las siguientes características: hiperglucemia/RI, obesidad visceral, dislipidemia aterogénica

e hipertensión. En este mismo año, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) publicó nuevos criterios para el SM, incluyendo los mismos criterios generales empleados en las otras definiciones, pero no necesariamente debe estar presente la RI [50, 54-56].

Tabla 2. Definiciones de Síndrome Metabólico

	NCEP ATP III (revisión 2005)	WHO (1998)	EGIR (1999)	IDF (2005)
Absolutamente requerido	Ninguno	Resistencia a la Insulina* (IG, GAA, DM2 u otra evidencia de RI)	Hiperinsulinemia [‡] (insulina plasmática percentil >75)	Obesidad central (circunferencia de cintura [§]): ≥94 cm (M), ≥80 cm (F)
Criterio	Tres de los cinco criterios	RI o diabetes, más dos de los cinco criterios	Hiperinsulinemia, más dos de cuatro criterios	Obesidad, más dos de los cuatro criterios
Obesidad	Circunferencia de cintura: >40 in (M), >35 in (F)	Proporción cintura/cadera: >0.90 (M), >0.85 (F); o IMC >30 kg/m ²	Circunferencia de cintura: ≥94 cm (M), ≥80 cm (F)	Obesidad central ya mostrada
Hiperglucemia	Glucosa en ayuno ≥ 100 mg/dl o Rx	RI ya mostrada	RI ya mostrada	Glucosa en ayuno ≥100 mg/dl
Dislipidemia	TG ≥150 mg/dl o Rx	TG ≥150 mg/dl o HDL-C: <35 mg/dl (M), <39 mg/dl (F)	TG ≥177 mg/dl o HDL-C <39 mg/dl	TG ≥150 mg/dl o Rx
Dislipidemia (segundo, criterio separado)	HDL-C: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F); o Rx			HDL-C: <40 mg/dl (M), <50 mg/dl (F); o Rx
Hipertensión	>130 mmHg sistólica o >85 mmHg diastólica o Rx	≥140/90 mmHg	≥140/90 mmHg o Rx	>130 mmHg sistólica o >85 mmHg diastólica o Rx
Otro criterio		Microalbuminuria [†]		

*IG= Intolerancia a la glucosa; GAA= Glucosa en ayunas alterada; RI= Resistencia a la insulina; DM2= Diabetes mellitus tipo 2; Otra evidencia incluye estudios del clamp euglicémico
† Excreción de albúmina urinaria ≥20 µg/min o proporción albúmina/creatinina ≥30 mg/g
‡ Confiable solo en pacientes con DM2
§ Los criterios para obesidad central (circunferencia de cintura) son específicos para cada población, los valores mostrados son para mujeres y hombres Europeos
TG= Triglicéridos; HDL-C= Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; IMC= Índice de masa corporal; Rx= Tratamiento farmacológico; M= Masculino; F= Femenino

(Tomado y modificado de [50])

En el 2009, representantes de la IDF y la Asociación Americana del Corazón/Instituto Nacional del Corazón, Sangre y Pulmón (AHA/NHLBI) – Guías del ATP III discutieron resolver las diferencias entre las definiciones del SM, llegando a unificar criterios. Esta unificación de criterios fue publicada bajo el título de *Harmonizing the Metabolic Syndrome* o Armonización del Síndrome Metabólico, en la revista *Circulation* en su edición de diciembre del año 2009, donde se consideró al perímetro abdominal como uno más de los componentes diagnósticos del SM. El diagnóstico de SM se realiza con la presencia de tres de los cinco componentes propuestos (Tabla 3). Se recomiendan los puntos de corte recomendados por la IDF para la circunferencia de cintura en no-europeos, siendo en hombres ≥94cm y en mujeres ≥80cm [57, 58]. Los criterios de armonización se han popularizado y se ha generado la tendencia a su uso más frecuente y aceptado en la literatura clínica.

Tabla 3. Unificación de criterios para el diagnóstico de Síndrome Metabólico

Armonización del Síndrome Metabólico	
Medida	Puntos de corte categóricos
Circunferencia de cintura elevada*	Definiciones específicas de población y país
Triglicéridos altos (o en tratamiento farmacológico para triglicéridos elevados†)	≥150 mg/dL (1.7 mmol/L)
HDL-C bajo (un indicador alternativo es el tratamiento farmacológico para HDL-C bajo†)	<40 mg/dL (1.0 mmol/L) en hombres; <50 mg/dL (1.4 mmol/L) en mujeres
Presión sanguínea elevada (o en tratamiento con antihipertensivos)	≥130 mmHg sistólica y/o ≥85 mmHg diastólica
Glucosa elevada en ayuno‡ (o en tratamiento farmacológico para glucosa elevada)	≥100 mg/dL

HDL-C= Colesterol de lipoproteínas de alta densidad.
 * Se recomienda que los puntos corte IDF sean usados para no Europeos y los puntos corte de IDF o AHA/NHLBI se usen para personas de origen Europeo hasta que haya mas datos disponibles.
 † Los medicamentos más utilizados para el tratamiento de triglicéridos elevados y HDL-C disminuido son los fibratos y el ácido nicotínico. Se puede presumir que un paciente que toma uno de estos medicamentos presenta triglicéridos elevados y HDL-C disminuido
 ‡ La mayoría de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen síndrome metabólico según los criterios propuestos.

(Tomado y modificado de [57])

1.4.1 Síndrome de Ovario Poliquístico y resistencia a la insulina

La RI se ha definido como un estado (de una célula, tejido u organismo) en el cual se requiere una cantidad de insulina mayor a la normal para obtener una respuesta adecuada en el manejo de la glucosa [59]. A nivel sistémico la RI provoca un aumento en la secreción de insulina por las células-β del páncreas, resultando en una hiperinsulinemia compensatoria. Si la respuesta compensatoria de las células-β declina, se desarrolla insuficiencia relativa o absoluta de insulina, lo que puede provocar intolerancia a la glucosa [59]. Todos estos eventos patológicos se conectan directamente con el SM y se encuentran en el paciente con DM2, condición frecuentemente desarrollada por la paciente con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP).

El vínculo entre el SOP y la RI fue resaltado por primera vez en 1980, demostrando que las mujeres obesas con SOP tenían una respuesta alterada a los efectos de la insulina en la prueba de tolerancia oral a la glucosa en comparación con las mujeres

obesas consideradas como controles en el estudio. Las tasas de prevalencia de IR se encuentran entre el 44 y el 85%, aunque esta variación se da entre otras cosas, porque los métodos empleados para determinar la sensibilidad a la insulina no resultan fácilmente comparables: la técnica del *clamp* euglucémico-hiperinsulinémico, la sola medición de insulina en ayuno y el modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) [29, 51, 60, 61] no son necesariamente comparables.

Las acciones de señalización generadas por la unión de la insulina a su receptor pueden tener enorme influencia en el sistema hormonal femenino. La concentración de insulina en sangre periférica para mujeres adultas es de aproximadamente de 10 $\mu\text{U/ml}$ en estado de ayuno y aumenta a más de 50 $\mu\text{U/ml}$ después de 1 h tras una carga oral de glucosa de 75g. En mujeres obesas, estos valores suelen ser más altos, aproximadamente 15 $\mu\text{U/ml}$ en estado de ayuno y arriba de 60 $\mu\text{U/ml}$ después de la misma carga oral de glucosa. En estado hiperinsulinémico y resistente a la insulina como sucede en mujeres con en SOP o en las etapas tempranas de DM2, el rango de concentración de insulina se encuentra de 20 a 35 $\mu\text{U/ml}$ ayuno, y de 120 a 180 $\mu\text{U/ml}$ después de la carga oral de glucosa [62, 63]. Es decir, las mujeres con SOP presentan estados de hiperinsulinemia claramente más altos. Si consideramos que la concentración de insulina en líquido folicular va desde valores no detectables ($<2 \mu\text{U/ml}$) hasta 65.4 $\mu\text{U/ml}$, con un promedio de aproximadamente 16 $\mu\text{U/ml}$ [64], la señalización mediada por la insulina podría actuar de manera sinérgica con la LH para elevar las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que activa a la proteína de la regulación esteroideogénica aguda (StAR), resultando en la potenciación de la actividad esteroideogénica en células de la teca [65]. La insulina también puede aumentar la síntesis de esteroides al regular de manera positiva a la aromatasa en células de la granulosa, que funcionarían como sustrato para las células de la teca para generar una mayor conversión de andrógenos [66]. Por otro lado, en fibroblastos de mujeres con SOP, hay una disminución de la actividad general de tirosina-cinasas (Figura 2) pero con un aumento en la actividad cinasas que fosforilan en serina [67]. En células de la teca, el aumento en la fosforilación en serina resulta en la activación de CYP17A1, y el aumento

en la producción de andrógenos. Otros mediadores esteroidogénico de las acciones de la insulina, son los inositolfosfoglicanos que pueden potenciar la esteroidogénesis al estimular la actividad de las enzimas CYP11A1, CYP17A1 y CYP19A1 [67-69].

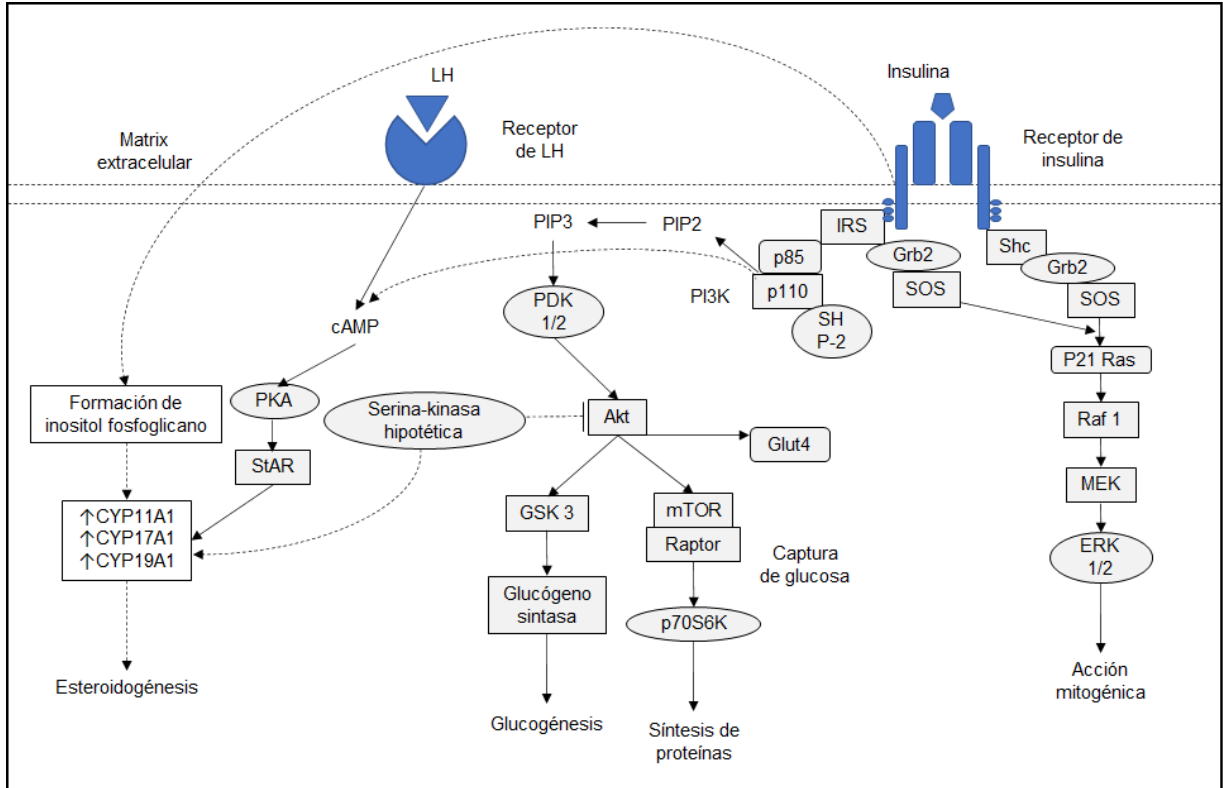


Figura 2. Señalización inducida por la insulina en células de la teca ovárica y mecanismo propuesto de la respuesta a la insulina.

Akt= Proteína quinasa de serina/treonina; cAMP= Adenosín monofosfato cíclico; CYP11A1= Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol; CYP17A1= 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa; CYP19A1= Aromatasa; ERK 1/2= Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2; Glut4= Transportador de glucosa tipo 4; Grb2= Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento; GSK 3= Glucógeno sintasa quinasa 3; IRS= Sustrato del receptor de insulina; LH= Hormona luteinizante; MEK= Proteína quinasa activada por mitógenos; mTOR= Proteína diana de la rapamicina en mamíferos; PDK= Proteína quinasa D; PIP2= Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; PIP3= Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato; PI3K= Vía fosfatidil inositol 3 quinasa; PKA= Proteína quinasa A; p110= Subunidad catalítica de la PI3K; P21 Ras= Proteína proto-oncogénica p21; p70S6K= Proteína ribosomal S6 quinasa P70; p85= Subunidad reguladora de la PI3K; Raf 1= Proto-oncogen serina/treonina proteína quinasa; Shc= Proteína con dominio de homología Src 2; SHP-2= Proteína tirosina fosfatasa con homología a Src; SOS= Factor intercambiador de nucleótidos de guanina; StAR= Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda. (Tomado y modificado de [69])

1.5. Atención y tratamiento para la mujer con SOP

1.5.1. Farmacológico para control endócrino y metabólico

Para la mejora de la calidad de vida, se usan tratamientos farmacológicos antiandrogénicos con bloqueadores de los receptores de andrógenos (espirolactona, flutamida y la progestina de tercera generación) y los inhibidores de la 5 α reductasa (finasterida) que impiden la conversión de testosterona a dihidrotestosterona [2, 70]. Para tratar el hirsutismo se recurre a los métodos cosméticos de depilación que incluyen blanqueamiento, depilación química, depilación con cera, afeitado, electrólisis y depilación láser. [2].

Para el tratamiento de las alteraciones metabólicas, la reducción en el peso corporal en mujeres con SOP, el control del sobrepeso y la obesidad, con mejora del perfil metabólico es uno de los objetivos principales. El tratamiento de primera línea para pacientes con SOP es la intervención en el estilo de vida que pueden mejorar la disfunción metabólica, lo que frecuentemente resulta en mejoras en la ovulación, la fertilidad y el estado de ánimo [70] y también mejora la fertilidad [5]. Otra opción es la cirugía bariátrica para aquellas mujeres que no pueden controlar su peso con la dieta, pero solamente se reserva para mujeres con SOP con obesidad severa (IMC >40) o con obesidad moderada (IMC >35), quienes también tiene problemas de salud adicionales [71].

Es interesante mencionar que cuando se usa una intervención farmacológica para el manejo en la disfunción metabólica y la dislipidemia en mujeres con SOP hay efectos benéficos indirectos sobre el hiperandrogenismo y la disfunción ovulatoria [72]. La metformina, que permite sensibilizar diferentes tipos celulares a los efectos de la insulina, es un miembro de la familia de las biguanidas con eficacia y seguridad comprobadas. Este fármaco se ha utilizado durante mucho tiempo en el tratamiento de la DM2 y es uno de los agentes comúnmente utilizado en el tratamiento del SOP [73]. Los mecanismos de acción de la metformina van desde la inhibición de la producción de glucosa en hígado, aumento en la captura de glucosa en músculo y aumento en la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos [59]. Al comprar la intervención en el estilo de vida y el tratamiento

con metformina en mujeres con SOP, hubo una reducción significativa en el índice de masa corporal en ambos grupos; sin embargo, la reducción en los niveles de andrógenos fue observada solamente en el grupo tratado con el fármaco [74]. En otro estudio, se investigó el efecto de la terapia con metformina sobre la respuesta de las pacientes SOP en la inducción de la ovulación con clomifeno. Sesenta y un pacientes SOP obesas fueron pretratadas por cinco semanas con metformina o con placebo y después se les administró citrato de clomifeno (50 mg por 5 días) para inducir ovulación. En comparación con el placebo, la terapia con metformina resultó en un aumento de más de diez veces en la ovulación inducida por clomifeno [75]. Lo interesante de los resultados de la acción sensibilizante a la insulina de la metformina, es acción coadyuvante en la mejora del problema reproductivo.

Otros medicamentos de elección para mejora de las alteraciones metabólicas son los isómeros de inositol, las tiazolidinedionas y las estatinas [76]. La pioglitazona, es una tiazolidinediona (agonista del receptor activador de peroxisomas- λ) que actúa principalmente aumentando la captura de glucosa a nivel periférico, regula la adipogénesis y la acción de la insulina [76]. En un metaanálisis compararon el efecto de la metformina y la pioglitazona como tratamiento en pacientes SOP, reportando una mejora en la ovulación y ciclo menstrual en las pacientes tratadas con pioglitazona, sin embargo, tuvieron un aumento en el índice de masa corporal comparado con el grupo tratado con metformina [77]. Entre estos medicamentos también destaca el uso de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2), como la empagliflozina y la dapagliflozina; su modo de acción es la inhibición de SGLT2 en túbulo contorneado proximal del riñón, reduciendo la reabsorción de glucosa y aumentando su excreción en orina, contribuyendo a una disminución de la concentración plasmática de glucosa, permitiendo una mejora en los parámetros glucémicos [76, 78, 79]. Javed y colaboradores en el 2019, compararon los efectos de la empagliflozina y la metformina en pacientes SOP con obesidad, mostrando que después de 12 semanas de tratamiento, las pacientes tratadas con empagliflozina mejoraron significativamente en los parámetros antropométricos y composición corporal pero no mostraron cambios en los parámetros

hormonales y metabólicos, en comparación con las pacientes tratadas sólo con metformina [80].

Los resultados mostrados con el control farmacológico de la hiperglucemia mediante fármacos muestran que hay algunas mejoras en la fertilidad y en los parámetros hormonales. Encarrilar a una paciente SOP en el control de la glucosa con fármacos o con dieta necesariamente implica controlar el nivel de glucosa en sangre y disminuir la hiperinsulinemia. A esta idea, agregamos un antecedente directo en nuestro laboratorio: en un cultivo primario de células de la granulosa de origen humano, obtenidas tras la recuperación de ovocitos de pacientes sometidas a estimulación ovárica como parte del proceso de fertilización *in vitro*, se puede evaluar el efecto de la hiperinsulinemia. El cultivo de células murales fue expuesto a 50 nM de insulina y se evaluó su función esteroidogénica al cuantificar la producción de progesterona a diferentes tiempos, y se mostró que su producción disminuyó con el tiempo (hasta las 96h de tiempo de cultivo evaluado). A esta misma concentración de insulina se expuso el cultivo de células de la cúmula por 4h, mostrando una disminución en la expresión del mensajero de PTGS2, el cual es de relevancia en el proceso de la ruptura del folículo para el proceso de la ovulación. Las células de la granulosa tienen un papel importante en la fertilidad humana, ya que participan en la correcta maduración del ovocito.

1.5.2. Control de la glucotoxicidad e inducción de cetosis

La pérdida de peso mejora la función ovulatoria y las tasas de embarazo, con una reducción de los niveles de insulina y testosterona libre en mujeres con SOP [81]. La modificación del estilo de vida basada en los principios de restricción calórica ha sido una terapia primaria para SOP, sin embargo, hay pocos datos disponibles sobre la modificación de macronutrientes de la dieta como enfoque terapéutico [82-84]. En un metaanálisis desarrollado en nuestro grupo, se analizó la asociación entre la dieta y la severidad de la resistencia a la insulina en mujeres con SOP, demostrando que las dietas bajas en carbohidratos conducen a una mejora en la resistencia a la insulina [85]. Es posible postular que es necesario intervenir en la regulación del consumo de

carbohidratos para disminuir la glucotoxicidad que contribuye al estado hiperinsulinémico y desarrollo de resistencia a la insulina, factores que participan y agravan el SOP.

Las dietas muy bajas en carbohidratos parecen ser superiores a las dietas hipocalóricas estándar en términos de mejora de la fertilidad, parámetros endócrinos/metabólicos, pérdida de peso y saciedad en mujeres con SOP [81] porque la hiperinsulinemia y los niveles de glucosa en sangre mejoran más rápidamente y son más tolerables en el largo plazo. Al restringir los carbohidratos de la dieta, la glucotoxicidad disminuye y la secreción de insulina puede estabilizarse a niveles más bajos. Cuando los niveles de insulina son bajos, se favorece el proceso de lipólisis en tejido adiposo a través de la lipasa sensible a hormonas, liberándose ácidos grasos libres. En el hepatocito comienza la beta-oxidación de los ácidos grasos, produciéndose acetil-CoA y acetoacetil-CoA. Debido a que las mitocondrias no son capaces de proporcionar una cantidad suficiente de oxalacetato para condensarse con el acetil-CoA para formar ácido cítrico y entrar en el ciclo de Krebs, se promueve la cetogénesis.

En el primer paso de la cetogénesis, la tiolasa condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, el cual es el sustrato para la enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa 2, permitiendo la síntesis de HMG-CoA. A su vez, la HMG-CoA liasa metaboliza la HMG-CoA a un cuerpo cetónico inestable: acetoacetato (AcAc). El AcAc finalmente se convierte en Betahidroxibutirato (BHB) estable por la D-hidroxibutirato deshidrogenasa (BDH1). Debido a la descarboxilación espontánea, una fracción del grupo de AcAc se somete a la descarboxilación espontánea para producir acetona, el cual es excretado del cuerpo a través de la orina y es exhalada por los pulmones, lo que produce un aliento característicamente dulce y afrutado [86, 87]. El transporte de BHB a través de la membrana plasmática se lleva a cabo por las proteínas transportadoras de monocarboxilato (MCT). Las isoformas involucradas en su transporte son MCT1, 2 y 4. El MCT1 se expresa de forma ubicua, el MCT2 se expresa específicamente en cerebro y riñones, y el MCT4 se expresa en músculo esquelético, corazón, pulmones y cerebro [88, 89]. Después de alcanzar las mitocondrias de las células objetivo, el BHB se metaboliza nuevamente en acetil-CoA. En tejidos/órganos

extrahepáticos, el BHB se convertido a AcAc por la BDH1. Después el AcAc se incorpora en AcAc-CoA en una reacción catalizada por la 3-oxoácido-CoA transferasa (SCOT). En el paso final, el AcAc-CoA es transformado por la acetoacetil-CoA tiolasa a dos moléculas de acetil-CoA, las cuales son usadas en el ciclo de Krebs o son transportadas al citosol para la síntesis de colesterol [90].

A este proceso se le conoce como cetosis, dicho de otra manera, es el cambio de un estado metabólico dependiente de glucosa-insulina hacia un estado de uso de ácidos grasos de la dieta y la reserva de tejido adiposo como combustible [91]. La cetosis nutricional puede ser generada con la restricción intencional del consumo de carbohidratos a niveles por debajo de 50 g por día, lo que induce la producción de cetonas y un efecto metabólico que estabiliza la glucosa en la sangre y minimiza la liberación de insulina. Después de varias semanas, ocurre la “ceto-adaptación”, esto quiere decir que el cuerpo readquiere la capacidad de responder al uso de cetonas como combustible principal. Una de las razones por las que ocurre es secundaria a la sobrerregulación de la transcripción de genes que codifican la maquinaria metabólica, resultando en un aumento de la densidad mitocondrial en tejidos oxidativos como el cerebro y músculo. Adicionalmente, las cetonas son capaces de inducir regulación epigenética a través de la inhibición de la desacetilación de histonas, indicativo de su papel como molécula de señalización además de una fuente de energía [91-93].

De acuerdo con lo descrito por Volek y Phinney, una dieta cetogénica “bien formulada” se compone de 5 a 10% de carbohidratos (<20-50 g/día), un consumo de proteínas moderado (1-1.5 g/kg/día) y una proporción de grasa que permita alcanzar niveles de saciedad, generando evidencia en la producción de cetonas. La característica principal que se utiliza para definir la cetosis nutricional, son 1) la aparición de acetoacetato en la orina (una o dos semanas tras el cambio nutricional) y 2) la elevación de los niveles de betahidroxibutirato en sangre, de 0.5 a 3 mM.

Una dieta cetogénica permite la disminución de la hiperinsulinemia al disminuir las elevaciones continuas y excesivas de los niveles de glucosa sanguínea (disminución controlada del estímulo); se acompaña frecuentemente por una pérdida de peso y una

disminución en los valores de resistencia a la insulina, todo lo cual puede ser benéfico para las mujeres con SOP. Un estudio piloto mostró la reducción de peso corporal, la disminución en el porcentaje de testosterona libre, y en la proporción de LH/FSH y así como la disminución de insulina sérica en ayuno en mujeres con SOP con sobrepeso y obesidad después de seis meses de seguir una dieta cetogénica [94, 95].

1.5.3. Tratamiento de la infertilidad

Es frecuente que el diagnóstico de SOP se haga en la edad reproductiva cuando una mujer enfrenta el problema de la infertilidad: no se da el embarazo tras seis meses de relaciones sexuales sin protección. También sucede que la atención médica general o endocrinológica no logre corregir el problema de infertilidad y entonces la pareja acuda a la medicina reproductiva. La medicina reproductiva utiliza técnicas de alta complejidad para el logro de un embarazo; la fertilización *in vitro* (FIV) suele ser la mejor solución para contrarrestar la infertilidad y se ha desarrollado una amplia red de servicios de atención que tienen tasas de éxito de alrededor de un 40-60% en Latinoamérica. Básicamente, la FIV consiste en la extracción de ovocitos tras una estimulación ovárica controlada (EOC) con gonadotropinas o los antagonistas de la GnRH, que mediante una punción quirúrgica de ambos ovarios guiada por ultrasonido, permite tener en el laboratorio de embriología, óvulos y espermatozoides en el mismo medio de cultivo, para favorecer la fertilización.

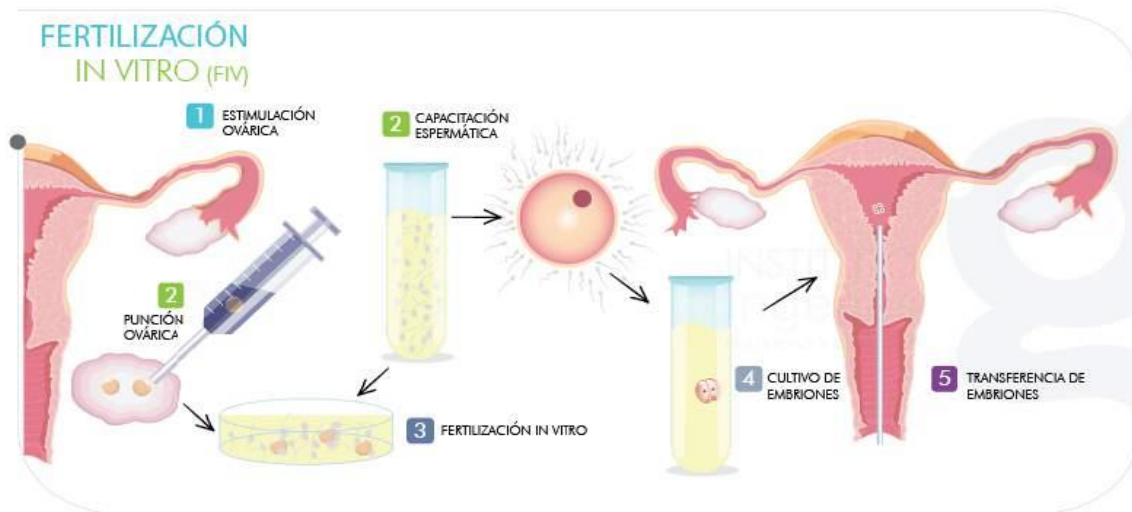


Figura 3. Proceso de la Fertilización in vitro (FIV).
(Tomado de [96])

Las técnicas de cultivo celular han permitido que los embriones logrados de esta forma puedan crecer hasta el día cinco al seis de desarrollo embrionario, generando un blastocisto que puede valorarse morfológica y genómicamente, para elegir y transferir el embrión con mayor potencial para generar un embarazo. Así mismo, la FIV incluye la preparación y valoración del endometrio, su grosor y desarrollo óptimos, como parte del proceso para fomentar la implantación del embrión cuando éste es transferido con una cánula al útero. Toda esta tecnología ha logrado resolver muchos problemas de infertilidad femenina como el factor tubárico, la infertilidad por edad o el de la baja reserva ovárica con tasas de éxito muy razonables (60 a 70%). Sin embargo, la tasa de éxito de la FIV para pacientes SOP tiende a ser mucho menor (30 a 35%).

Hay tres aspectos que obstaculizan el éxito de la FIV en la paciente con SOP: 1) la calidad ovular es mala, una mujer poliquística tiene muchos folículos en desarrollo antes de la EOC y éstos no alcanzan la madurez; 2) el desbalance hormonal, especialmente androgénico que puede exacerbar la producción esteroidogénica durante la EOC y producir el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO) que mínimamente obstaculiza el proceso pero también puede generar efectos colaterales graves; 3) la resistencia a la insulina que causa un estado generalizado de inflamación que afecta el endometrio, evitando la implantación embrionaria, y causando pérdidas tempranas o abortos que impiden el logro de un embarazo a término.

Cada uno de los parámetros reproductivos obtenidos durante el proceso de la FIV es de relevancia debido a que va mostrando cómo se va desarrollando. Uno de los parámetros de seguimiento es el número de folículos antrales el cual es una herramienta que permite medir la reserva ovárica, se sugiere que un buen pronóstico durante la FIV se muestra en un conteo mayor a 11 [97]. La obtención de los ovocitos es clave en este proceso ya que se requiere que se obtenga el mayor número posible, estudios muestran que obtener entre 6 y 15 ovocitos puede resultar en obtener resultados positivos durante la FIV [98]. Cobra relevancia que los ovocitos recuperados lleguen a su estadio maduro, es decir, ovocitos en MII, por lo que también se considera el conteo de éstos. El porcentaje de fertilización es mayor en ovocitos en MII en comparación de los ovocitos

en un estadio mejor de maduración (ovocitos en MI), además, los ovocitos en MII fertilizados tienen un mejor pronóstico para lograr la implantación [99, 100]. Un factor importante que tiene influencia sobre la tasa de embarazo es la calidad de los embriones que serán transferidos. De acuerdo a la simetría de los blastómeros y la presencia o ausencia de fragmentación en los embriones se le da una calificación a los embriones con la A, B, C o D, siendo una mejor calidad a partir de la letra A y bajando la calidad hasta llegar a la letra D, la tasa de embarazo aumenta cuando se transfieren embriones que tienen una calificación "A" [101].

Se ha mostrado en una población con SOP en un proceso de FIV tiende a pasar por una estimulación ligeramente más prolongada (1.2 días más), tienen una cantidad mayor de folículos en desarrollo, el nivel de estradiol es mayor y se recupera una mayor cantidad de complejos de cúmulo-ovocito (2.9 más) en comparación con las mujeres sin SOP [102]. Una de las características que presentan las mujeres con SOP es la acumulación de folículos antrales pequeños en la corteza ovárica, el desarrollo folicular se encuentra desregulado lo que resulta en arresto folicular y disrupción del folículo dominante, un mediador involucrado en este proceso es la presencia de hiperandrogenismo [103], además de impedir la correcta maduración y desarrollo del ovocito [3]. Se ha reportado que ovocitos inmaduros obtenidos de ovarios normales tienen una mayor tasa de maduración después de 24 horas de cultivo (69.8%) en comparación de ovocitos de pacientes con SOP (60.5%) [104].

Debido al hiperandrogenismo, las mujeres con SOP que se someten a un proceso de FIV pueden requerir dosis relativamente altas de gonadotropinas al iniciar la estimulación [102], lo que aumenta el riesgo de SHO. En las pacientes con SOP otros factores de riesgo para SHO se dan frecuentemente: un conteo >24 folículos antrales, una concentración de la hormona anti-Mulleriana ≥ 3.5 ng/ml; EOC con altos valores de estradiol >3500 pg y ≥ 24 ovocitos colectados [105]. Los síntomas del SHO van desde leves, como náuseas, vómito, distensión abdominal; a moderados como evidencia de hemoconcentración; hasta los casos graves donde se requiere hospitalización, en los que sea necesario realizar reanimación con líquidos y anticoagulación [106]. Otro factor que

se encuentra en las pacientes con SOP es la resistencia a la insulina, el cual afecta la receptividad del endometrio, se ha mostrado una menor tasa de implantación en pacientes SOP y RI [107]. La RI en estas pacientes las conduce a estado de inflamación, se ha encontrar que presentan marcadores de inflamación en suero como IL-6, IL-16, IL-18, TNF- α , y proteína C reactiva, y que, también se ve afectado a nivel endometrial [108].

2. Justificación

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) en mujeres en edad reproductiva cursa con serios problemas de infertilidad a consecuencia del hiperandrogenismo, la alteración del eje hipotálamo-pituitaria, los niveles elevados de la hormona luteinizante (LH), y bajos de la hormona folículo estimulante (FSH) además del aumento en la producción de andrógenos. La disfunción metabólica, originada por la glucotoxicidad y la hiperinsulinemia también se asocia fuertemente a la patología del SOP porque el exceso de insulina contribuye al hiperandrogenismo, debido al aumento en la producción de andrógenos a nivel ovárico.

Dentro de la estrategia para tratar los problemas de infertilidad en mujeres con SOP mediante técnicas de reproducción asistida se da poca atención a la corrección de la disfunción metabólica, consecuencia de los altos niveles de glucosa e insulina. Considerando que el síndrome metabólico agrava el SOP, y que dentro de la medicina reproductiva estas pacientes son de pronóstico menos favorable, se propone hacer una modificación de la dieta, disminuyendo el consumo de carbohidratos y aumentando grasas, con la finalidad de inducir cetosis nutricional. Al restringir los carbohidratos de la dieta, la secreción de insulina puede estabilizarse a niveles más bajos, evitando los efectos androgénicos y otros efectos ováricos.

Al contrarrestar la glucotoxicidad y la hiperinsulinemia, que consideramos el aspecto más grave del desorden metabólico en pacientes SOP, mediante la cetosis nutricional, en conjunto con la atención al problema de infertilidad a través de la fertilización *in vitro*, se puede promover el logro del embarazo a término y del recién nacido vivo, en menos intentos.

3. Hipótesis

Una intervención nutricional que controle la glucotoxicidad en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico con evidencia de Resistencia a la Insulina producirá cetosis nutricional y disminuirá la hiperinsulinemia, mejorando los parámetros metabólicos y reproductivos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Inducir cetosis en pacientes con SOP, RI y con ciclo fallido de FIV, controlando la glucotoxicidad e hiperinsulinemia por medio de una intervención nutricional que corrija la exposición excesiva a carbohidratos y analizar su efecto sobre parámetros reproductivos y metabólicos.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Seleccionar pacientes con SOP que presenten RI (HOMA-IR), indicadores de SM (Armonización de los criterios de SM) y estén dispuestas a someterse a un programa de cambio nutricional.
- 2) Inducir un estado de cetosis nutricional en las pacientes seleccionadas mediante una intervención que restrinja la glucotoxicidad disminuyendo la ingesta de carbohidratos.
- 3) Evaluar los cambios en los parámetros metabólicos en las pacientes SOP/RI que hayan concluido la intervención nutricional, que lograron la cetosis nutricional y se sometan a un nuevo ciclo de fertilización *in vitro* (FIV).
- 4) En las pacientes SOP/RI que hayan concluido la intervención nutricional, logrando la cetosis y se sometan a un nuevo ciclo de FIV, se analizarán los parámetros reproductivos (número de ovocitos colectados, porcentaje de fertilización, embriones

viables en el día dos, blastocistos de calidad en el día cinco, embriones transferidos, porcentaje de implantación, logro del embarazo bioquímico).

- 5) Caracterizar la captura de glucosa en las células de la cúmula que provengan de la punción ovárica de pacientes infértiles tras la EOC, en un esfuerzo por establecer un sistema que eventualmente permita personalizar una relación entre la respuesta a la insulina y los resultados reproductivos en un ciclo FIV.

5. Métodos

5.1 Estrategia experimental

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se propone un diseño experimental con las siguientes etapas: selección de las pacientes, inicio y seguimiento del plan nutricional, estimulación ovárica de pacientes en cetosis, captura ovular y cosecha del complejo cúmula-ovocito para su evaluación y finalmente el análisis estadístico (Figura 4).

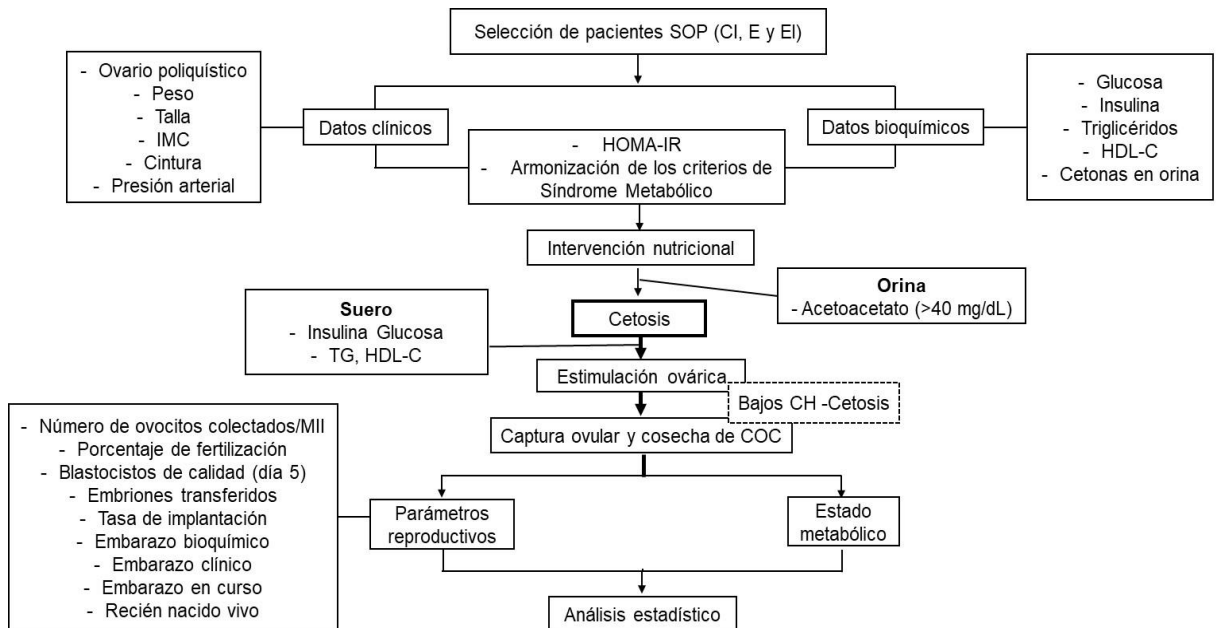


Figura 4. Diseño experimental del ensayo clínico piloto de intervención nutricional Se muestra el esquema que se seguirá para la inducción de cetosis en pacientes con SOP mediante la intervención nutricional.

5.2 Diseño de estudio

Estudio clínico piloto de intervención tipo antes-después (*pre-post*) de un solo brazo. Será un estudio prospectivo, en el que un solo grupo será evaluado antes y después de la intervención.

En virtud de ser un estudio piloto, se proponen 30 pacientes de acuerdo con el cálculo del tamaño de muestra, mediante la siguiente fórmula [109]:

$$n = \frac{\ln(1 - \gamma)}{\ln(1 - \pi)}$$

Nivel de confianza (γ)= 0.95
Probabilidad (π)= 0.1
n= 28.4

Problemas que aparezcan con una prevalencia del 10% serán identificados con un 95% de confianza en un estudio piloto que incluye 30 personas.

Se incluirán pacientes con SOP que asistieron al Instituto INGENES para recibir tratamiento de fertilización *in vitro* y fallaron en su primer ciclo de estimulación ovárica controlada.

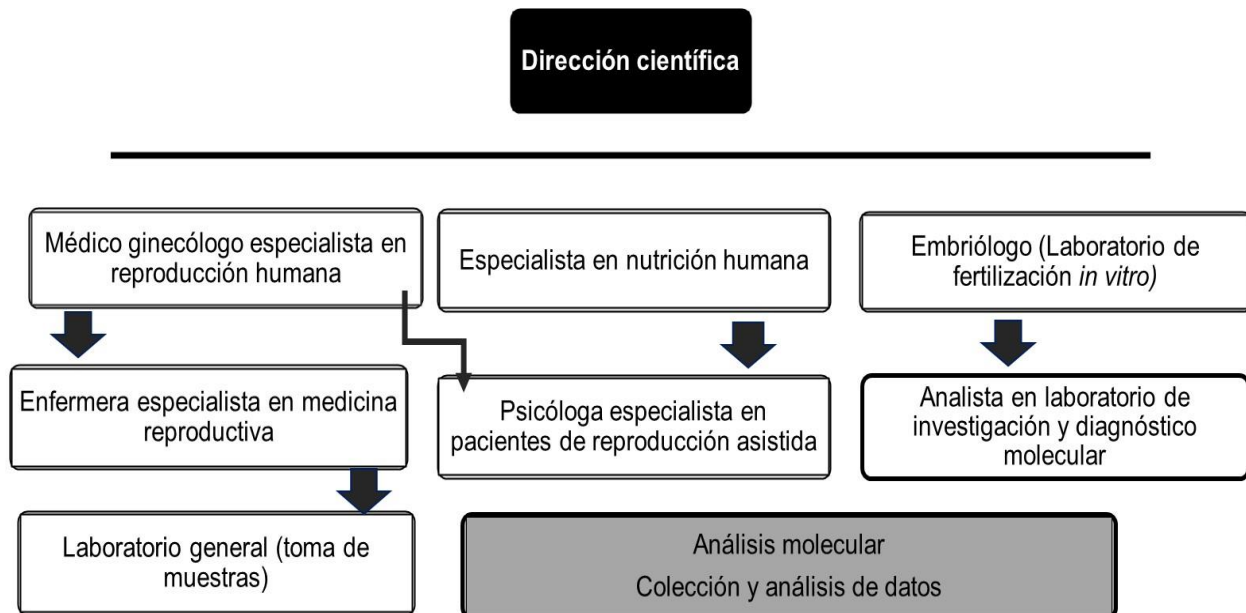


Figura 5. Estructura organizacional del proyecto

Se muestra la organización del equipo que participará en el desarrollo del proyecto.

5.3 Criterios de selección

5.3.1 Criterios de inclusión

Mujeres que asistieron a INGENES para recibir tratamiento de fertilización *in vitro*, que hayan fallado en un primer ciclo de estimulación ovárica controlada y que presenten Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), Resistencia a la Insulina (RI) e indicadores de Síndrome Metabólico (SM) de acuerdo con las siguientes definiciones:

- SOP (Rotterdam, 2003) dos criterios de tres: oligoovulación o anovulación, Signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo, ovario poliquístico (excluyendo enfermedades similares).
- Resistencia a la Insulina de acuerdo al índice HOMA-IR con un valor ≥ 1.9 .
- Síndrome Metabólico evaluado de acuerdo con los criterios *Harmonized* [57]: circunferencia de cintura elevada (≥ 80 cm), triglicéridos altos (≥ 150 mg/dl), HDL-C bajo (< 50 mg/dl), presión sanguínea elevada (≥ 130 mmHg sistólica o ≥ 85 mmHg diastólica) y glucosa elevada en ayuno (≥ 100 mg/dl); tres criterios de los cinco.

5.3.2 Criterios de exclusión

- Mujeres que no cumplan con los criterios requeridos para diagnosticar SOP y RI.
- Mujeres que aún no hayan pasado por un ciclo de estimulación ovárica controlada.
- Mujeres diagnosticadas previamente con alguna patología endócrina (enfermedad tiroidea, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing, hiperplasia suprarrenal congénita, diabetes mellitus tipo 1 y 2).

5.3.3 Criterios de eliminación

- Mujeres que no hayan pasado por un primer ciclo de estimulación ovárica controlada y que no hayan fallado en el FIV.
- Mujeres que no acepten entrar al programa de cambio nutricional.
- Mujeres que dejen el proceso del FIV.

Al término de la intervención nutricional:

- Mujeres que no pudieron apegarse al plan nutricional y no lograron entrar en estado de cetosis.

5.4 Diagnóstico de Síndrome de Ovario Poliquístico

5.4.1 Principio

El Síndrome de Ovario Poliquístico presenta diversos signos y síntomas, considerándose con mayor impacto la anovulación crónica, amenorrea, hiperandrogenismo, alteraciones cutáneas, acné, hirsutismo, resistencia a la insulina, obesidad e incluso se estima como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Se comparan los criterios de diferentes sociedades científicas para su diagnóstico, sin embargo, hay acuerdo general que indica basarse en la presencia de al menos dos de los tres criterios siguientes: hiperandrogenismo clínico (síntomas y signos del exceso de andrógenos) o bioquímico (hiperandrogenemia), anovulación crónica y morfología de ovarios poliquísticos.

5.4.2 Procedimiento

Mujeres con problemas de fertilidad que asistieron al Instituto INGENES para llevar a cabo el proceso de fertilización *in vitro*, fueron evaluadas por el personal médico del Instituto para diagnosticar Síndrome de Ovario Poliquístico bajo la definición de Rotterdam, 2003. De las historias clínicas y estudios ultrasonográficos en INGENES se obtuvieron los datos para poder ser clasificadas como SOP: 1) oligo/anovulación (definida como retraso en la menstruación >35 días o <8 episodios hemorrágicos espontáneos/año), 2) hirsutismo clínico (empleando la escala modificada de Ferriman y Gallwey (mFG) de ≥ 8) y/o signos bioquímicos de hiperandrogenismo basado en la testosterona total, y 3) ovarios poliquísticos (12 o más folículos en cada ovario que miden de 2 a 9 mm de diámetro y/o aumento de volumen >10 ml).

5.5 Presencia de indicadores de Síndrome Metabólico

5.5.1 Principio

El Síndrome Metabólico será caracterizado a través de la unificación de los criterios para su diagnóstico, definido por *Harmonizing the Metabolic Syndrome* o Armonización del Síndrome Metabólico, basado en la presencia de tres de los siguientes criterios: circunferencia de cintura igual o mayor a 80 cm, triglicéridos altos, HDL-C bajo, presión sanguínea elevada y glucosa elevada en ayuno.

5.5.2 Procedimiento

Las pacientes diagnosticadas con SOP con un ciclo de estimulación fallida fueron evaluadas por el personal médico del Instituto INGENES para evidenciar la presencia de indicadores de Síndrome Metabólico por los cinco criterios siguientes: circunferencia de cintura ≥ 80 cm, glucosa elevada en ayuno (glucosa en ayuno ≥ 100 mg/dl), triglicéridos ≥ 150 mg/dl, HDL-c < 50 mg/dl, presión sanguínea elevada (≥ 130 mmHg sistólica o ≥ 85 mmHg diastólica). Las mediciones se hicieron en condiciones de ayuno. En posición erguida y respiración normal se midió la circunferencia de cintura mediante el uso de una cinta métrica. Con ropa ligera y sin zapatos se midió el peso corporal empleando una báscula (Marca LAICA). Para la presión arterial se utilizó un baumanómetro (BM26 Marca Beurer®) manteniendo a la paciente sentada de forma erguida y apoyando el brazo a la altura del corazón. Para los datos de glucosa, triglicéridos y HDL-C las pacientes acudieron a un laboratorio clínico calificado para realizar su cuantificación bajo los estándares de control de calidad que maneja cada uno, cada una de las pacientes entregó los resultados a través del reporte elaborado por dicho laboratorio.

5.6 Resultados de análisis clínicos

5.6.1 Principio

Los análisis clínicos consisten en el estudio de los componentes de muestras biológicas. El resultado de los análisis clínicos permite al médico determinar si el paciente presenta alguna anomalía, o bien, para monitorear o dar revisión general a su salud.

5.6.2 Procedimiento

Las pacientes diagnosticadas con SOP con un ciclo de estimulación fallida, previo al inicio con la inducción de cetosis y antes de iniciar un siguientes ciclo de estimulación ovárica controlada, se presentaron a un laboratorio clínico calificado para realizarse las siguientes determinaciones séricas: glucosa, triglicéridos, colesterol (HDL) e insulina. Los resultados los entregaron a través del reporte detallado elaborado por el laboratorio clínico.

5.7 Cuantificación de insulina

5.7.1 Principio

Para detectar cuantitativamente la hormona insulina en la muestra se utiliza el método de ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA). Consiste en el uso de placas en los cuales cada pozo esta pre-revestida por anticuerpos, en cada pozo se coloca la muestra/estándar para permitir que la insulina se acople al anticuerpo, seguido se añade el anticuerpo de detección marcado con biotina. Para la detección se utiliza estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante.

5.7.2 Procedimiento

Hubo una medición inicial de insulina sérica en ayunas para ser considerada paciente del estudio y otra después de seguir la intervención nutricional. Se les tomó muestra sanguínea a las pacientes que culminaron las tres a seis semanas de la intervención nutricional y/o durante el proceso de la estimulación ovárica. La muestra se recolectó por extracción de sangre venosa por medio del sistema BD vacutainer® en un tubo de tapón color oro (con gel separado) y se centrifugó a 2500 r.p.m. (revoluciones por minuto) por diez minutos para la obtención de suero. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el estuche *Human Insulin ELISA kit* (RAB0327-1KT). Todos los reactivos y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (18 – 25°C) antes de usarlos. Antes de dar inicio al procedimiento, se diluyó al 1X la solución de lavado con agua MiliQ y se preparó cada estándar de la siguiente

manera: se centrifugó brevemente el vial *Lyophilized Human Insulin Protein Standard (Item C)* y de la añadió 400 µl de *Assay Diluent A* para preparar un estándar de 1400 µU/ml. En un tubo Eppendorf de 1 ml se le agregó 150 µl del estándar de 1400 µU/ml con 550 µl de *Assay Diluent A* para preparar un estándar de 300 µU/ml. En siete tubos siguientes se colocaron 300 µl de *Assay Diluent A* (este mismo es usado como el estándar cero). Se utilizó la solución estándar de 300 µU/ml para producir una dilución en serie:

	Estándar	1	2	3	4	5	6	7		Cero
Vol. del diluyente	Item C + 400	550 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl		300 µl
Conc. uIU/ml	1400	300	150	75	37.5	18.75	9.38	4.69		0

Todas las incubaciones fueron a temperatura ambiente y con agitación suave. Se colocaron 100 µl de cada estándar (duplicado) y cada muestra en los pozos apropiados, seguido de esto la placa fue cubierta e incubada por 2.5 h. Durante este tiempo se procedió a preparar el anticuerpo de detección de la siguiente manera: se centrifugó brevemente el vial *Detection Antibody vial (Item F)* y se le agregó 100 µl de 1x *Diluent Buffer B (Item E1)* y se mezcló por pipeteo para preparar el anticuerpo de detección concentrado, para usarlo en el procedimiento se diluyó 80 veces con 1x *Diluent Buffer B (Item E1)*. Pasado el tiempo de incubación, se descartó el estándar y muestras de la placa y posteriormente se lavó cada pozo por cuatro ocasiones con 300 µl de 1X *Wash Solution*, quitando finalmente el remanente por aspiración. A cada pozo se le añadió 100 µl 1x del anticuerpo de detección preparado, se cubrió la placa y se incubó por 1 h. En este tiempo se preparó la solución de estreptavidina como sigue: se centrifugó brevemente el vial *HPRT-Streptavidin concentrate vial (Item G)* y se mezcló por pipeteo, para su uso se diluyó 500 veces con 1x *Diluent Buffer B (Item E1)*. Pasado el tiempo de incubación se descartó toda la solución de la placa y se lavó cada pozo por cuatro ocasiones con 300 µl de 1X *Wash Solution*, quitando finalmente el remanente por aspiración. El siguiente paso fue añadir en cada pozo 100 µl de la solución de estreptavidina preparada, se cubrió la placa y se incubó por 45 minutos. Después se descartó toda la solución de la placa y se lavó cada pozo por cuatro ocasiones con 300 µl de 1X *Wash Solution*, quitando finalmente

el remanente por aspiración. Se le añadió a cada pozo 100 μ l del reactivo *TMB One-Step Substrate Reagent (Item H)*, se cubrió la placa y se incubó por 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se le añadió a cada pozo 50 μ l del reactivo *Stop Solution (Item I)* e inmediatamente se midió a una absorbancia a 450 nm mediante el espectrofotómetro TECAN infinite M200PRO.

5.8 Cálculo de biomarcadores para el diagnóstico de RI

5.8.1 Principio

La resistencia a la insulina (RI) es un estado caracterizado por una respuesta disminuida de los tejidos periféricos (muscular, adiposo y hepático) a las acciones biológicas de la insulina, resultando en un aumento compensatorio de insulina por parte de las células beta del páncreas para mantener en la normalidad los niveles de glucemia. Se han desarrollado modelos para el estudio de la RI, entre ellos se encuentra el *Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance (HOMA)-IR*, que es una fórmula validada y bien establecida que expresa numéricamente el estado de RI de la persona evaluada, así como el índice Triglicéridos-Glucosa-IMC (TyG-IMC) y la relación Triglicéridos/HDL-C (Tg/HDL-C).

5.8.2 Procedimiento

Para realizar los cálculos utilizamos los valores de glucosa, insulina, triglicéridos, HDL-C y el IMC de las pacientes antes de iniciar la intervención y antes de iniciar el siguiente ciclo de estimulación ovárica. El índice HOMA-IR fue calculado para cada una de las pacientes, utilizando los valores de glucosa e insulina en ayuno. La fórmula que se utilizó fue la siguiente: $HOMA-IR = \text{glucemia en ayuno (mg/dl)} \times \text{insulina en ayuno } (\mu\text{UI/ml}) / 405$. El valor de referencia para el diagnóstico de resistencia a la insulina es ≥ 1.96 . El cálculo de TyG-BMI mediante la siguiente fórmula: $TyG-IMC = [\text{Ln (Triglicéridos en ayuno, mg/dl} \times \text{Glucosa en ayuno, mg/dl)} / 2]$. Para la relación Tg/HDL-C mediante la división de triglicéridos en ayuno, mg/dl / HDL-C, mg/dl.

5.9 Inducción de cetosis

5.9.1 Principio

Disminuir el consumo de carbohidratos favorece el proceso de lipólisis en tejido adiposo. Una vez que son liberados, los ácidos grasos libres son sometidos a beta-oxidación en las mitocondrias hepáticas para producir acetil CoA para la formación de cuerpos cetónicos. Estos productos son utilizados como fuente de energía en prácticamente todas las células del organismo.

5.9.2 Procedimiento

Antes de iniciar la inducción, se confirmó el estado no cetogénico de las pacientes mediante el uso de una tira reactiva de orina para evaluar la presencia de acetoacetato. La inducción de cetosis consistió en la modificación de la dieta de las pacientes durante tres a seis semanas. Mediante el sistema de seguimiento a distancia establecido, a cada una de las pacientes se le dio la indicación de restringir el consumo de carbohidratos (máximo de 50 g/día) mediante la eliminación de los alimentos procesados y particularmente altos en harinas y azúcares, así como priorizar el consumo de proteínas y grasas. Se hizo una evaluación inicial del consumo de macronutrientes mediante un interrogatorio y se calculó la cantidad de macronutrientes y calorías, antes y a lo largo de la intervención utilizando la aplicación MyFitnessPal. Para dar seguimiento al desarrollo de cetosis, se evaluó la presencia de acetoacetato en orina hasta alcanzar concentraciones por arriba de 40mg/dL de manera estable (dos valoraciones consecutivas con diferencia de al menos cinco días).

5.10 Determinación de presencia de cetonas en orina

5.10.1 Principio

Una de las formas más comunes de verificar el estado de cetosis nutricional es mediante el uso de tiras medidoras de acetoacetato en orina. Se fundamenta en la reacción del ácido acetoacético y la acetona con nitroprusiato sódico y glicina en un medio alcalino para formar un complejo color violeta. El cambio de color va desde un rosado

pálido para resultados negativos, hasta un rosado oscuro o color púrpura para resultados positivos.

5.10.2 Procedimiento

A cada paciente se le pidió que adquirieran un frasco de las tiras medidoras de cetonas en orina (*KETONE TEST STRIPS*). Evaluaron su estado de cetosis antes, durante (cada semana) y al finalizar la intervención nutricional. La paciente sumergió la tira en la primera orina de la mañana que recolectó en un recipiente, cuidando en cubrir el área reactiva de la tira con la orina. Inmediatamente la sacó, e hizo la comparación del color del área reactiva con la tabla de colores que viene en el frasco de tiras. Mediante una foto de la tira nos mostraron evidencia del cambio de color.

5.11 Evaluación de indicadores reproductivos y obstétricos en un ciclo de FIV

5.11.1 Principio

La fertilización *in vitro* es una técnica de reproducción asistida utilizada para ayudar a la concepción de un bebé. Este procedimiento consiste en la extracción de los óvulos para fecundarlos con los espermatozoides, y finalmente transferir los embriones al útero. Para asegurar que se lleve a cabo la fertilización, implantación y curso del embarazo, se le da seguimiento a este proceso mediante la evaluación de indicadores reproductivos y resultados obstétricos.

5.11.2 Procedimiento

Las pacientes que se encontraron en estado de cetosis al finalizar la intervención nutricional dieron comienzo al proceso de estimulación ovárica para la fertilización *in vitro*. Esta etapa se llevó a cabo por el personal médico altamente capacitado del Instituto INGENES, quienes dieron seguimiento al proceso mediante la evaluación de los siguientes indicadores reproductivos: número de ovocitos en día dos a través del conteo obtenido después de realizar la cosecha ovular (idealmente deben corresponder entre 10 a 20 ovocitos), el porcentaje de fertilización obtenido al realizar el cálculo en porcentaje de cuantos ovocitos lograron ser fertilizados (considerando >68% como bueno y <30%

como una fertilización mala), el número y la calidad de embriones transferidos a los cuales les dan una calificación de acuerdo a su morfología embrionaria usando los criterios de *Istanbul Consensus Workshop on Embryo Assessment* (de acuerdo a la nomenclatura con dos letras, la primera califica la masa interna celular y la segunda letra califica al trofotodermo. De acuerdo a la siguiente categoría, la Categoría A: óptima calidad con máxima capacidad de implantación, Categoría B: buena calidad con alta capacidad de implantación, Categoría C: calidad intermedia con capacidad de implantación intermedia, y Categoría D: mala calidad con baja capacidad de implantación). Otro parámetro que decidimos evaluar fue el grosor del endometrio porque debe tener el grosor apropiado durante el proceso de la transferencia embrionaria para que se lleve a cabo la implantación y eventualmente, el sostenimiento del embarazo. Antes del paso de la transferencia embrionaria, se analiza y se mide el grosor del endometrio por ultrasonografía; se debe ver un endometrio trilaminar con un grosor mayor a 7mm. El siguiente parámetro evaluado fue el resultado de embarazo mediante el valor de β -hCG al día 14 (resultado positivo >10 mUI/ml). Dado que nuestras pacientes fueron reclutadas en tiempos desfazados, con algunas de ellas también logramos obtener otros datos como la presencia de embarazo clínico (presencia de saco con latido visible por ultrasonido en la semana seis a la ocho) y embarazo en curso (de la semana 12 en adelante). Mantuvimos comunicación con las pacientes con embarazo en curso con la finalidad de estar al tanto de su salud y para conocer la fecha del nacimiento del bebé, registrando peso, talla y género.

5.12 Cuantificación de estradiol

5.12.1 Principio

Ensayo inmunoluminométrico competitivo, que se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. En un ensayo competitivo, un antígeno libre (Ag) compite con un antígeno marcado (Ag*) por un número fijo y limitado de sitios de unión del anticuerpo. La extensión de la unión anticuerpo (Ab)-Ag* depende de la concentración de Ag libre. A mayor concentración de analito (Ag libre), menos Ag* se une al Ab, permitiendo la cuantificación de la concentración del analito (Ag libre). Utiliza un anticuerpo anti-estradiol marcado con

N-(aminobutil-N-(etilisoluminol) (ABEI) y microperlas magnéticas cubiertas con anti-Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

5.12.2 Procedimiento

Se les tomó muestra sanguínea a las pacientes que culminaron la intervención nutricional. La muestra se recolectó por extracción de sangre venosa por medio del sistema BD vacutainer® en un tubo de tapón color oro (con gel separado) y se centrifugó a 2500 r.p.m. (revoluciones por minuto) por diez minutos para la obtención de suero. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el estuche MAGLUMI Estradiol (CLIA). Utiliza un anticuerpo monoclonal anti-E2 (estradiol) marcado con ABEI y un antígeno purificado de E2 marcado con FITC. El equipo que se utilizó es el analizador *Snibe Diagnostic* MAGLUMI 800. Primero se colocó 80 µl de la muestra/calibrador, 40 µl del marcador ABEI y 20 µl del reactivo de desplazamiento, y se incubó a 37°C por diez minutos. Después se añadieron 40 µl del marcador FITC y 20 µl de las microperlas magnéticas recubiertas con anti-FITC, y se incubó a 37°C por diez minutos, formando complejos anticuerpo-antígeno; después de sedimentarse en un campo magnético, se decantó el sobrenadante, y se dio un ciclo de lavado por un minuto. Se le agregaron los reactivos y se inició una reacción quimioluminiscente. La señal de luz es medida por un fotomultiplicador dentro de tres segundos, siendo proporcional a la concentración de estradiol presente en la muestra.

5.13 Análisis de los efectos de la exposición a insulina en las células de la cúmula

5.13.1 Principio

En el laboratorio se ha establecido un cultivo primario de células de la granulosa humana obtenidas tras la recuperación de ovocitos de pacientes y donantes del Instituto INGENES que pasan por el proceso de cosecha ovular. Se tiene evidencia que las células de la cúmula expresan los marcadores propios de la célula [110].

5.13.2 Procedimiento

Las células de la cúmula se obtuvieron a partir del rasurado de ovocitos de pacientes y donantes del Instituto INGENES. Las células de cada paciente se transportaron al CINVESTAV en medio de cultivo DMEM/F12 Advanced (ampicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml, gentamicina 10 µg/ml). Se les hizo tres lavados con PBS 1X atemperado, posteriormente las células se pasaron a una caja de cultivo y se les adicionó de 50 – 100 µl de hialuronidasa a 1 mg/ml (140318, sigma), con la punta de la micropipeta de 1000 µl se mezclaron hasta disgregar. Se pasaron a un tubo de 1.5 ml con 500µl de medio y se homogeneizó, se centrifugó a 3200g por cinco minutos. Se retiró el medio con cuidado y las células se resuspendieron con 500 µl de medio. A un tubo de 0.6 ml se adicionó 10 µl de medio y 10 µl de azul de tripano, se homogeneizó por pipeteo. Se tomaron 10 µl que se colocaron en una laminilla (*Countess cell counting chamber slides*, Invitrogen), el cual se llevó al contador automatizado de células (*Countess Automated Cell Counting*, C10227 Invitrogen). Posteriormente se sembraron de 50,000 a 75,000 células por pozo en tubos eppendorf de 1 ml. Se seleccionaron algunos tubos para exponer a insulina 100 nM, posteriormente se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 30 min. Seguido de esto se dio inicio el proceso de captura de glucosa.

5.14 Ensayo de captura de glucosa

5.14.1 Principio

El ensayo de captura de glucosa es un método por bioluminiscencia homogénea basado en la detección de 2-deoxiglucosa-6-fosfato (2DG6P). Cuando la 2-deoxiglucosa (2DG) es añadido a las células, este es transportado a través de la membrana y es fosforilado rápidamente de la misma manera que la glucosa. Sin embargo, las enzimas que modifican a la glucosa-6-fosfato (G6P) no pueden modificar a la 2DG6P, por lo tanto, este analito que es impermeable a la membrana se acumula dentro de la célula. Mediante un detergente ácido se lisan las células para terminar con la captura de glucosa y eliminar el NADPH dentro de las células, y seguido se neutraliza el ácido. Finalmente, se utiliza el reactivo de detección que contiene glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), NADP⁺,

Reductasa, Ultra-Glo™ Luciferasa Recombinante y sustrato de proluciferina. La G6PDH oxida la 2DG6P a 6-fosfodeoxygluconato y, al mismo tiempo se reduce el NADP⁺ a NADPH. La reductasa utiliza el NADPH para convertir la proluciferina a luciferina, que luego es utilizada por la Ultra-Glo™ Luciferasa Recombinante para producir una señal luminiscente que es proporcional a la concentración de 2DG6P.

5.14.2 Procedimiento

Todo el proceso se llevó a cabo en los tubos eppendorf donde se encuentran sembradas las células de la cúmula y que previamente estuvieron dentro de la incubadora por 30 min estimuladas con insulina y sin estimular. El protocolo de captura de glucosa se siguió de acuerdo con lo establecido en el producto *Glucose Uptake-Glo™ Assay* (J1342). Todos los reactivos se descongelaron en un recipiente con agua a temperatura ambiente, ya descongelados, se mantuvieron en temperatura ambiente los siguientes reactivos: *Stop Buffer*, *Neutralization Buffer* y *Luciferase Reagent*; el resto de los componentes se mantuvieron en hielo. Antes de usarlos homogeneamos cada reactivo. Para minimizar la lectura de fondo, el Reactivo de Detección 2DG6P debe dejarse equilibrando por 1 h a temperatura ambiente, para ello durante los 30 minutos de incubación de las células de la granulosa se preparó el Reactivo de Detección 2DG6P (solamente es usado el día que es preparado) considerando el número total de reacciones correspondiente al número de tubos con células de la granulosa, el blanco y el control positivo. La preparación del reactivo fue considerando el volumen de cada reactivo como sigue:

Componente	Por reacción
<i>Luciferase Reagent</i>	100 µl
NADP ⁺	1 µl
G6PDH	2.5 µl
<i>Reductase</i>	0.5 µl
<i>Reductase Substrate</i>	0.0625 µl

Luego de los 30 minutos de incubación, los tubos que contenían las células de la granulosa fueron centrifugados a 3600g por tres minutos y con cuidado se removió el

medio, seguido de esto se les colocó 150 μ l de PBS para hacer un lavado. Nuevamente se centrifugaron los tubos a 3600g por tres minutos para remover el PBS. Se agregó 50 μ l de 2-deoxiglucosa a 1mM (previamente se diluyó el reactivo de 100 mM con PBS) a cada tubo y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incorporaron dos tubos más, el correspondiente al blanco (50 μ l de PBS) y el control positivo (45 μ l de PBS + 1 μ l de 2DG6P *Standar* 1mM). Después a cada tubo de le agregó 25 μ l de *Stop Buffer* y se mezclaron suavemente. Seguido se les añadió 25 μ l de *Neutralization Buffer* y se mezclaron suavemente. A cada tubo se les colocó 100 μ l del Reactivo de Detección 2DG6P y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, de cada tubo se tomaron 150 μ l y se colocaron en una placa blanca, la lectura de la luminiscencia se hizo utilizando 0.3-1 segundo de integración mediante el equipo TECAN *infinite* M200PRO.

2 Resultados

6.1 Diseño de una intervención nutricional para inducir cetosis y corregir la RI

Todas las pacientes seleccionadas para este estudio presentan SOP y resistencia a la insulina. Considerando que nuestra hipótesis postula que la RI es resultado de la hiperinsulinemia constante causada por un consumo elevado y constante de carbohidratos (glucotoxicidad), se diseñó una intervención nutricional basada en cinco principios:

- 1) Eliminación de alimentos que aportan un exceso de CH e incorporación de alimentos reales (no procesados) bajos en CH
- 2) Un sistema de seguimiento electrónico a distancia que permite:
 - a. Verificación de cumplimiento de las recomendaciones de la intervención nutricional
 - b. Comunicación constante y retroalimentación para la paciente
- 3) Evaluación constante de parámetros bioquímicos y antropométricos, para dar seguimiento al progreso de la paciente (cetonas en orina, peso, medida de cintura, valor de glucosa y presión sanguínea)
- 4) Reducción efectiva del valor HOMA (disminución y/o normalización)
- 5) Mejora de los parámetros de Síndrome Metabólico

Reclutamos a 35 pacientes SOP y con RI para participar en el estudio (Figura 6). Los resultados que se muestran a continuación se lograron en 12 pacientes que siguieron la intervención nutricional, en las que se pudo registrar evidencia clara de parámetros metabólicos, se sometieron a un segundo ciclo de FIV y prueba de embarazo (nivel de beta-HGC).

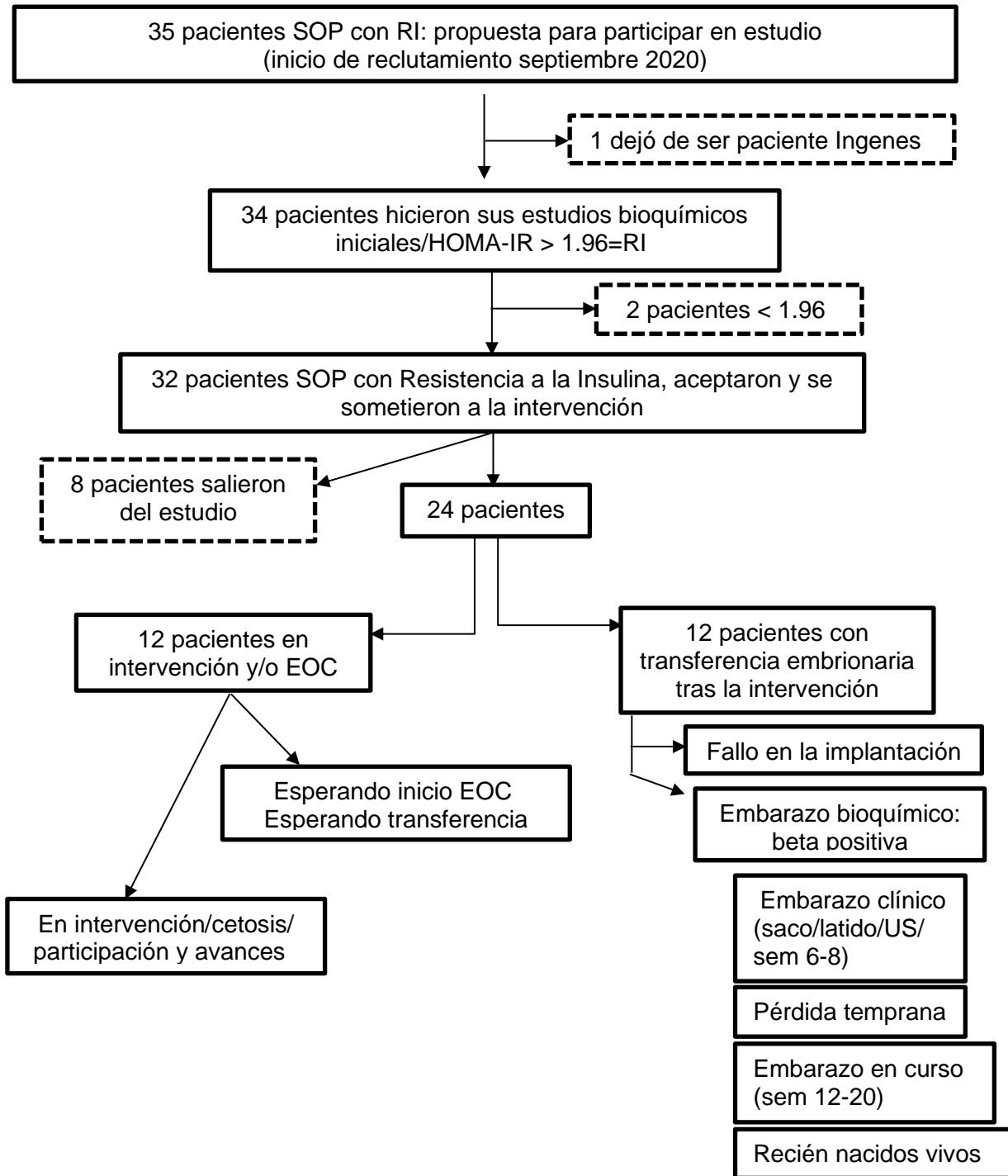
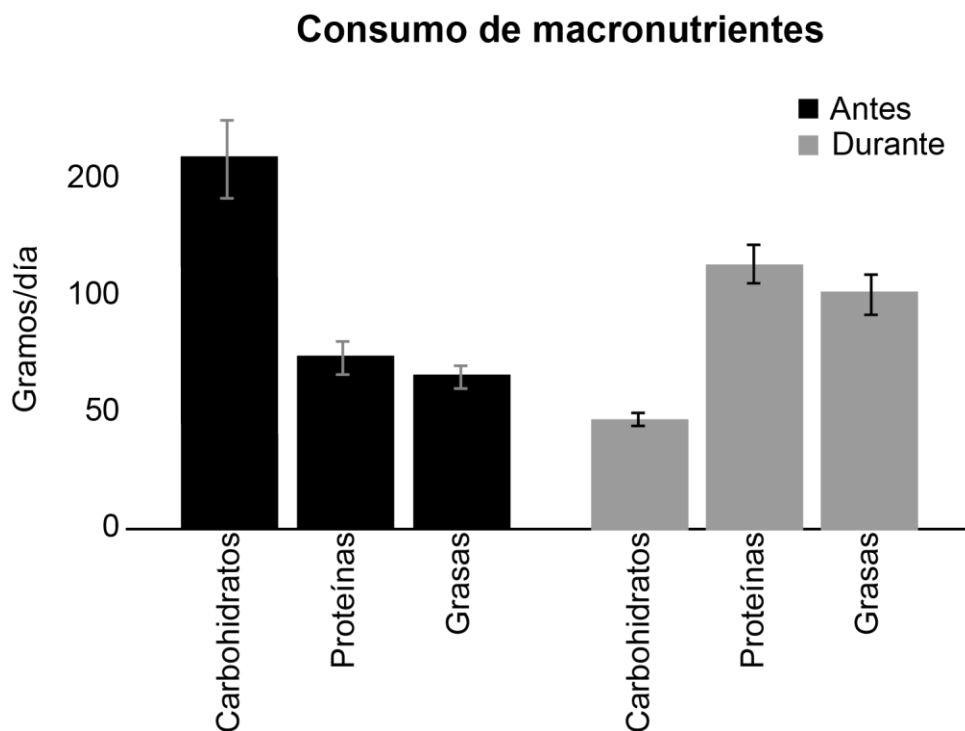


Figura 6. Reporte detallado para estudios observacionales en epidemiología.

Los datos de las pacientes del ala derecha de este esquema constituyen el cuerpo de información analizada y reportada en este escrito, porque son los casos

6.1.1 Intervención nutricional

El cuadrante superior de la Figura 7 muestra el promedio en el consumo de carbohidratos, antes de iniciar la intervención nutricional fue de 208.6 ± 16.8 g/día; durante la intervención disminuyó considerablemente (hasta 41.7 ± 10.1 g/día). Antes de la intervención el consumo de carbohidratos representaba el 48.7% del total de calorías diarias, y durante la intervención disminuyó hasta un 18%. Estos resultados evidencian una clara disminución en el consumo de carbohidratos tras la eliminación de los alimentos con un índice glicémico más alto (glucotóxicos) como harinas y panes, pastas, frutas, jugos, refrescos, tortillas, etc. Por otro lado, se registró un aumento en el consumo de las grasas pasando de un 34.2% a un 39%, y de proteínas aumentando de 17.1% a 43%, tal como se muestra en la Figura 7 en el cuadrante inferior.



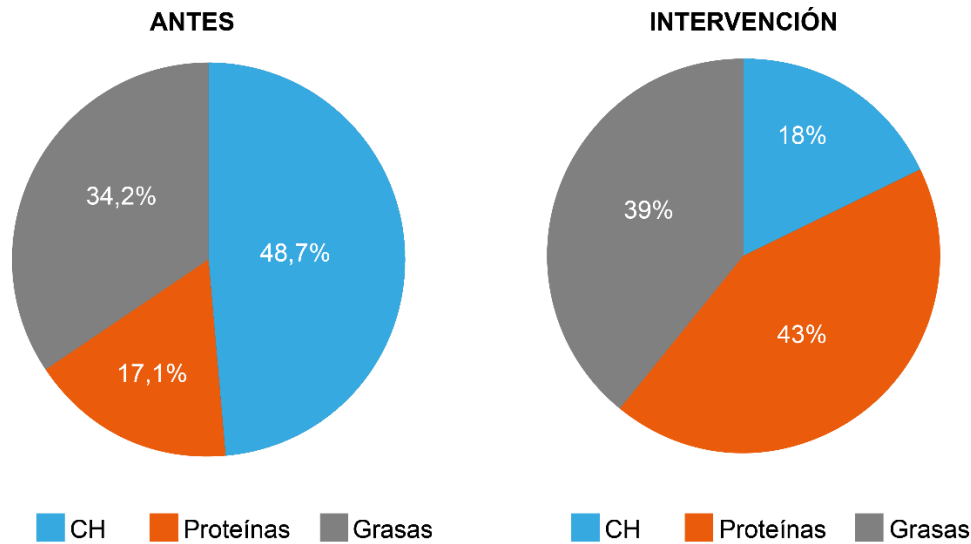


Figura 7. Cambio en el consumo de macronutrientes totales (A) y proporción de macronutrientes antes y durante la intervención nutricional (B).

Se calculó la cantidad de los macronutrientes totales que consumieron las pacientes antes y durante la intervención (rango semana 1 a la 27). Los resultados están representados como la media \pm error estándar (arriba). A partir de la cantidad de carbohidratos, proteínas y grasas totales que consumieron las pacientes antes y durante la intervención, se calculó la proporción de los macronutrientes (abajo).

6.1.2 Detección de cetosis

Como se observa en la Figura 8, eventualmente todas las pacientes muestran un valor positivo de cetonas en orina (≥ 40 mg/dl); el 41.67% de las pacientes lograron el estado de cetosis desde la primera semana de la intervención nutricional mientras que el 41.67% mostró la presencia de acetoacetato en orina en la segunda semana. El 16.66% de las pacientes requirió 3 o 5 semanas para lograr la cetosis.

Los resultados de la Figura 7 y 8 indican que es posible instruir a las pacientes para que reduzcan el consumo de carbohidratos para lograr la inducción de cetosis nutricional.

Tiempo para entrar en cetosis

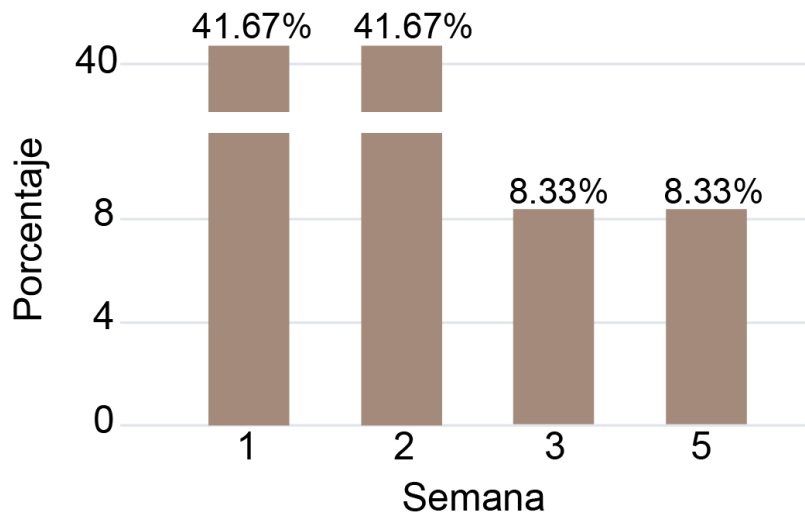


Figura 8. Tiempo y generación de un estado de cetosis.

El seguimiento mediante el uso de tiras reactivas para medir cetonas en orina se hizo cada 3-5 días, con evidencia fotográfica del color de la tira, enviada por las pacientes y considerando que se usó la misma marca en todos los casos; se consideró como un valor positivo una concentración igual o mayor a 40 mg/dl. Se graficó el porcentaje de pacientes/semana en la que alcanzaron el estado de cetosis. Total: 12 pacientes.

6.2 Corrección de la de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina después de la intervención nutricional

Verificamos los niveles de insulina de las pacientes después de seguir la intervención nutricional. En la Figura 9 se muestra la concentración inicial y final de insulina sérica, donde cada línea representa a cada paciente, tal como se observa, en cada una de ellas disminuyó la concentración de la insulina después de seguir la intervención nutricional, pasando de un promedio de 22 ± 4.6 a 10.4 ± 2.1 $\mu\text{UI/ml}$ (datos mostrados en la Tabla 4). Estos resultados muestran que después de seguir la intervención nutricional es posible disminuir la condición de hiperinsulinemia presente en las pacientes.

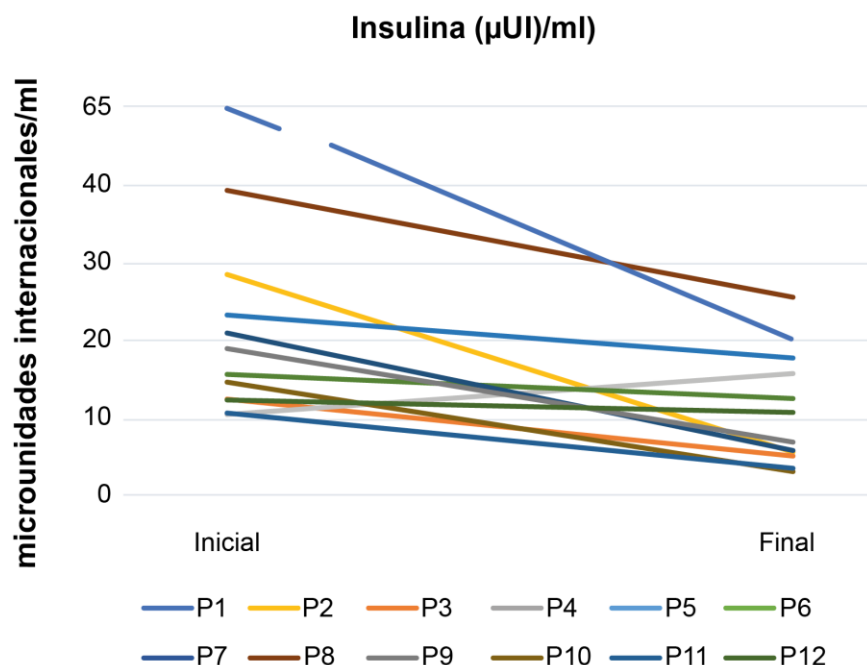


Figura 9. Concentración de insulina de cada una de las pacientes antes y después de la intervención nutricional.

En cada una de las pacientes se cuantificó la concentración de insulina en ayuno antes y después de seguir la intervención. Los resultados están representados como la concentración de insulina en microunidades internacionales/mililitro.

Tabla 4. Concentración promedio de insulina y biomarcadores asociados a RI de las pacientes antes y después de la intervención nutricional.

	Inicial	Final	P (t-Student)
Insulina (µUI/ml)	22 ± 4.6	10.4 ± 2.1	0.009*
HOMA-IR	5.6 ± 1.6	2.3 ± 0.6	0.025*
Triglicéridos-Glucosa-IMC	275 ± 16.6	233.3 ± 12.8	<0.0001
Triglicéridos/HDL-C	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.0163*

Los datos están expresados como la media ± el error estándar; *p < 0.05 indica una diferencia significativa al comparar los valores antes y después de la IN, usando t-Student pareada.

La Tabla 4 muestra que hubo una clara disminución en el valor promedio de HOMA-IR de las pacientes después de seguir la intervención, pasando de 5.6±1.6 a 2.3±0.6 y la Figura 9, esquematiza los datos de cada paciente. Por otro lado, en la Figura 10 se encuentran los valores de HOMA-IR de manera individual, tal como se observa en cada

una de las pacientes se mostró una disminución en su valor con respecto al valor inicial, con excepción de la paciente cuatro.

Considerando otros dos biomarcadores para el diagnóstico de RI, empleamos el índice Triglicéridos-Glucosa-IMC y la relación Triglicéridos/HDL-C, un valor alto de estos indica RI, observándose una disminución de ambos valores luego de haber seguido la intervención nutricional, el índice paso de 275 ± 16.6 a 233.3 ± 12.8 , mientras que la relación bajó de 1.4 ± 0.1 a 1.1 ± 0.1 . En la Tabla 5 se encuentra el porcentaje de pacientes que lograron normalizar o disminuir el valor HOMA-IR, mostrando que el 58.3% de las pacientes normalizaron su valor, mientras que el 8.3% tuvo una disminución en su HOMA-IR mayor al 50%, el 25% de las pacientes se mostró una disminución en su HOMA-IR en más del 25%, y, finalmente, el 8.3% restante no fue modificado. Estos resultados nos indican que mediante esta intervención nutricional es posible mejorar la resistencia a la insulina, medido por el índice HOMA-IR, logrando normalizar o disminuir este valor.

Cambios del HOMA-IR después de la intervención

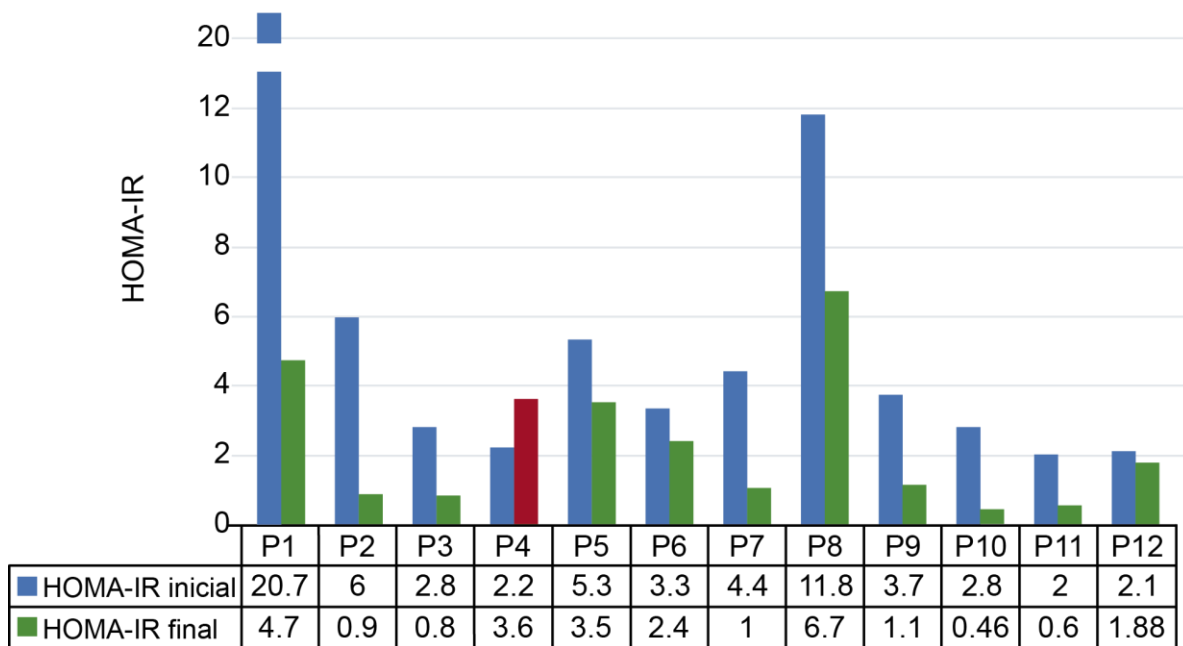


Figura 10. Modificación del índice HOMA-IR después de seguir la intervención nutricional.

A cada paciente se le cuantificó la insulina y glucosa en ayuno antes y después de la intervención, y se calculó el índice HOMA-IR (<https://amhigo.com/mi-diagnostico/calculadoras/indice-de-resistencia-a-la-insulina-homa-ir>).

Tabla 5. Porcentaje de pacientes que normalizaron o disminuyeron su valor HOMA-IR después de la intervención nutricional.

	Pacientes
HOMA-IR	<i>Final</i>
Normalizado después de la intervención (1.96 o menos)	58.3% (n=7)
Más de 50% de disminución (con respecto valor original)	8.3% (n=1)
Más de 25% de disminución 25%	25% (n=3)
Sin cambio	8.3% (n=1)

Los datos están expresados como el porcentaje de las pacientes dentro de cada clasificación.

6.3 Efecto de la intervención nutricional sobre los parámetros antropométricos, bioquímicos y metabólicos

6.3.1 Impacto de la intervención nutricional sobre los signos de síndrome metabólico

Las Tablas 6 y 7 muestran los parámetros que fueron evaluados en las pacientes. Tal como se observa, antes de iniciar la intervención nutricional, el grupo de las pacientes inició con un promedio de IMC de 30.8 ± 1.7 kg/m² disminuyendo a un 27.5 ± 1.4 kg/m² después de seguir la intervención nutricional (datos mostrados en la Tabla 6), otro parámetro que mostró mejora fue la circunferencia de cintura pasando de un promedio de 94.6 ± 3.6 cm a 86.3 ± 3.4 cm, también mostraron disminución en el promedio de triglicéridos y glucosa, pasando de 171.8 ± 22.6 mg/dl a 128.1 ± 18.8 mg/dl y de 95.6 ± 4.7 mg/dl a 84.1 ± 3.2 , respectivamente. Estos datos muestran que nuestras pacientes RI también tenían otros parámetros metabólicos alterados, de los cuales, algunos mostraron mejora luego de seguir la intervención nutricional, como el IMC, la circunferencia de cintura, triglicéridos y glucosa.

Tabla 6. Valores antropométricos antes y después de seguir la intervención nutricional.

Parámetro	Inicial	Final	P (t-Student)
Peso corporal (kg)	74.6 ± 3.9	66.7 ± 3.5	< 0.001*
IMC (kg/m ²)	30.8 ± 1.7	27.5 ± 1.4	< 0.001*
Obesidad (%)	41.7	25.0	0.480
Sobrepeso (%)	58.3	41.7	0.683
Peso Normal (%)	0.0	33.3	0.134

Los datos están expresados como la media ± el error estándar; *p < 0.05 indica una diferencia significativa al comparar los valores antes y después; análisis por t-Student pareada o prueba de McNemar.

Tabla 7. Valor promedio de cada signo de síndrome metabólico antes y después de seguir la intervención nutricional.

Parámetro	Inicial	Final	P (t-Student)
Circunferencia de cintura (cm)	94.6 ± 3.6	86.3 ± 3.4	0.001*
Triglicéridos (mg/dl)	171.8 ± 22.6	128.1 ± 18.8	0.003*
HDL-C (mg/dl)	46.4 ± 2.9	44.6 ± 2.8	0.546
Glucosa (mg/dl)	95.6 ± 4.7	84.1 ± 3.2	0.007*

Los datos están expresados como la media ± el error estándar; *p < 0.05 indica una diferencia significativa al comparar los valores antes y después; análisis por t-Student pareada.

Cada uno de los parámetros evaluados corresponde a signos metabólicos empleados para diagnosticar el SM (sólo si se presenta mínimo 3 de estos signos se diagnostica el síndrome como tal). De la evaluación metabólica realizada en cada paciente, realizamos el conteo del número de signos que presentó cada una de ellas antes y después de la intervención nutricional. En la Figura 11 se muestra el número de parámetros metabólicos alterados en cada una de las pacientes; como se observa no todas las pacientes presentaron SM; de las 12 pacientes, sólo seis lo presentaron antes de iniciar la intervención nutricional, y cuatro de ellas salieron del SM. Con estos resultados podemos

observar que no todas las pacientes con RI tienen diagnóstico de SM, pero sí presentan al menos un parámetro de SM alterado (Figura 11).

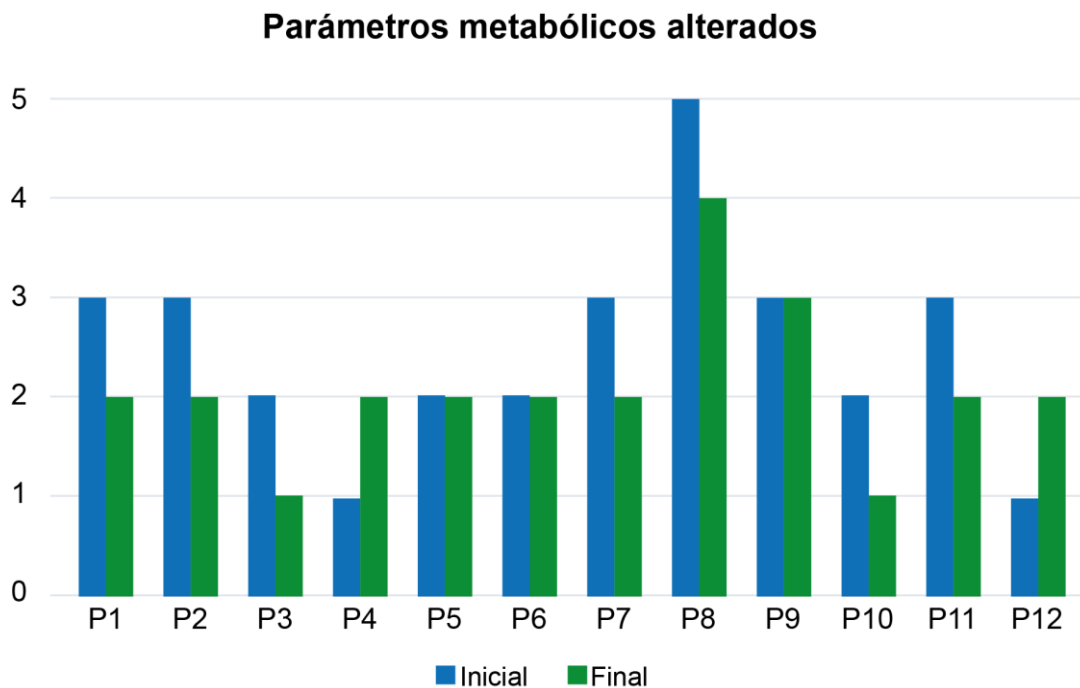


Figura 11. Número de signos o síntomas del Síndrome metabólico (SM) de cada paciente antes y después de la intervención.

6.4 Resultados reproductivos después de la intervención nutricional

La siguiente etapa fue iniciar con el proceso de Estimulación Ovárica Controlada (EOC) para la FIV y completar un siguiente ciclo hasta hacer la transferencia embrionaria y ver el resultado de las pruebas de embarazo.

6.4.1 Efecto de la Intervención Nutricional (IN) sobre los parámetros reproductivos

En la Tabla 8 se muestran los datos de los parámetros reproductivos de cada una de las pacientes, analizados de forma individual o como el promedio del valor de cada parámetro. No se encontró diferencia significativa entre el ciclo fallido y el ciclo actual, ni cambios en la calidad de los embriones, tal como se puede observar en las Tablas 8 y 9. Numéricamente hablando, tras seguir la intervención nutricional no se alteran ni mejoran los parámetros reproductivos.

Tabla 8. Parámetros reproductivos antes y después de seguir la intervención nutricional.

#	Tipo de embriones	#Folículos antrales		#Ovocitos		#Ovocitos MII		%Fertilización		Embriones			
										Número		Edad (días)	
		Ciclo Anterior	Ciclo actual	Ciclo anterior	Ciclo actual	Ciclo anterior	Ciclo actual	Ciclo anterior	Ciclo actual	Ciclo anterior	Ciclo actual	Ciclo anterior	Ciclo actual
P1	Propios	12	15	10	12	3	0	60	58.33	3	2	3	3
P2	Propios	15	15	17	22	5	16	55.6	59.09	4	4	3	5
P3	Propios	28	25	35	29	30	26	80	82.76	7	7	5	5
P4	Ovodón	NR	NR	19	25	4	0	84.2	52	8	4	5	5
P5	Propios	24	8	18	17	14	11	61.1	58.82	6	3	5	5
P6	Propios	40	18	15	16	9	11	60	56.25	4	5	5	5
P7	Propios	14	10	23	15	0	0	69.6	73.33	6	9	5	5
P8	Propios	35	35	33	17	11	6	58.8	29.41	1	3	6	5
P9	Ovodón	NR	NR	15	16	24	16	73.3	93.75	6	8	5	5
P10	Ovodón	25	NR	21	16	20	12	57.1	68.75	2	4	5	5
P11	Propios	NR	50	NR	23	NR	22	NR	93.91	NR	7	NR	5
P12	Propios	28	24	18	46	14	41	50	93.91	3	9	3	5
Promedio		24.5	22.22	20.4	21.2	12.2	13.4	64.5	65.0	4.5	5.4	4.5	4.8
Error estándar		3.18	4.4	2.3	2.7	2.8	3.5	3.2	4.8	0.7	0.7	0.3	0.2
P (t-Student)		0.962		0.822		0.789		0.933		0.384		0.414	

No hay una diferencia significativa al comparar los valores antes y después de la IN; p: t-Student apareada. NR: No Reportado.

Tabla 9. Calidad de los embriones antes y después de seguir la intervención nutricional.

#	Tipo de embriones	Calidad de los embriones (DIA 5)	
		Ciclo anterior	Ciclo actual
P1	Propios	1(7/0), 1(7/5), 1(6/5) (DIA 3)	1(9/0), 1(6/5) (DIA 3)
P2	Propios	2(8/0), 1(7/5), 1(10/5) (DIA 3)	1BE, 3BC
P3	Propios	2AC, 5BC	2AC, 5BC
P4	Ovodón	5BB, 3BC	1BE, 3BC
P5	Propios	4BE, 2BC	3BE
P6	Propios	4BC	5BC
P7	Propios	3BE, 3BC	5BE, 4BC
P8	Propios	BC	3BC
P9	Ovodón	6BC	1BE, 7BC
P10	Ovodón	2BC	2BE, 2BC
P11	Propios	NR	1AC, 1BB, 5BC
P12	Propios	1(8/5), 2(7/5) (DIA 3)	1AC, 1BB, 7BC

Calidad de los embriones en el ciclo anterior y ciclo actual (después de seguir la intervención nutricional)

6.4.2 Efecto de la intervención sobre el grosor del endometrio

Para cada paciente registramos el valor del grosor en su ciclo FIV fallido y el valor luego de seguir la intervención para hacer la comparación. En la Tabla 10 se indica el grosor del endometrio de cada paciente en su ciclo anterior y en el ciclo después de seguir la intervención, con aumento el promedio del grosor de cerca de 2 unidades después de la intervención, sin embargo, este valor no fue estadísticamente significativo. Vale la pena mencionar que, tras seguir la intervención, 11 pacientes mostraron un grosor endometrial adecuado o mejorado, que pudiera ser un factor importante para el logro y sostén del embarazo. Vale la pena mencionar que en la literatura se considera que valores mayores a 11 mm tampoco son deseables [111].

Tabla 10. Cambio en el grosor del endometrio antes y después de seguir la intervención nutricional.

#	Grosor del endometrio (mm)	
	Ciclo anterior	Ciclo actual
P1	9.7	8
P2	3	<u>4.8</u>
P3	4.6	<u>7.7</u>
P4	8.1	6
P5	5.2	<u>10</u>
P6	2.9	<u>13.2</u>
P7	16	<u>8.9</u>
P8	7	<u>11.1</u>
P9	4.7	<u>7.9</u>
P10	3.1	<u>4.5</u>
P11	5	<u>12</u>
P12	12.1	8.3
Promedio	6.8	8.6
Error estándar	1.2	0.8
P	0.277	
Número de pacientes con grosor endometrial de 7 a 11 mm tras la intervención	6	
Número de pacientes con un grosor endometrial que mejoró comparado con el dato antes de la intervención	5	
Número de pacientes con un grosor menor comparado con el dato antes de la intervención	1	

Análisis por *t*-Student apareada. Rojo: valores grosor endometrial sub-óptimos; verde: alcanzó grosor adecuado tras la IN aun siendo menor en ciclo previo; subrayado: todos los casos de clara mejoría.

6.4.3 Resultados obstétricos después de lograr la cetosis nutricional

Los resultados obstétricos se muestran en la Tabla 11; el 83.33% de las pacientes logró el embarazo bioquímico (β -hCG > 10 mUI/ml), mientras que el 66.67% llegó a embarazo clínico y, de este mismo grupo, una paciente se encuentra en embarazo en curso y finalmente siete pacientes concluyeron el embarazo, donde la paciente cuatro y seis dieron a nacimiento a dos bebés. Este último grupo corresponde al 66.67% que se

encuentra en embarazo en curso o bien, como Recién Nacido Vivo (RNV). Estos resultados muestran una clara mejora en la tasa de implantación embrionaria, así como el embarazo en curso y RNV.

Tabla 11. Logro de embarazo después de seguir la intervención nutricional.

	Embarazo bioquímico (beta-hCG > 10 mUI/mlm 14 días tras la punción)	Embarazo clínico (Saco con latido, US, semana 6 a 8)	Embarazo en curso 12 semanas o más / Recién Nacido Vivo
P1	NO (fallo de implantación)	NO	NO
P2	SI	NO	NO
P3	SI	NO	NO
P4	SI	SI	Recién nacido vivo (2)
P5	SI	SI	Recién nacido vivo (1)
P6	SI	SI	Recién nacido vivo (2)
P7	SI	SI	Recién nacido vivo (1)
P8	SI	SI	Recién nacido vivo (1)
P9	SI	SI	Recién nacido vivo (1)
P10	SI	SI	Recién nacido vivo (1)
P11	NO (fallo de implantación)	NO	NO
P12	SI	SI	SI (1) (16 semanas)
N*	10	8	8
%	83.33 %	66.67 %	66.67 %

*Número total de pacientes en cada categoría.

6.4.4 Recién nacidos vivos

Mantuvimos comunicación con las pacientes con embarazo en curso con la finalidad de estar al tanto de su salud y para conocer la fecha del nacimiento del bebé, registrando el peso, talla y género. En la Tabla 12 se muestran los datos de cada uno de los bebés nacidos vivos, seis niños y tres niñas, y dos embarazos fueron mellizos. La talla de los bebés se encontró entre 43 a 48 cm. La OMS considera bajo peso al nacer cuando el bebé tiene un peso menor a 2500 g, sin embargo, el peso en mellizos suele ser menor a este valor, tal como lo podemos observar en la tabla con los mellizos de las pacientes cuatro y seis, el resto de los bebés tuvieron un peso mayor a 2500g.

Tabla 12. Características de recién nacidos vivos

Paciente	Semana gestacional	Peso (g)	Talla (cm)	Género
P4	38+2	2054 / 2057	43 / 44	Masculino / Femenino
P5	42+5	3039	50.3	Masculino
P6	35+5	2100 / 1900	45 / 45	Masculino / Femenino
P7	39+4	2950	50	Masculino
P8	36+3	NR	NR	Masculino
P9	41+1	3250	48	Masculino
P10	37	2690	47	Femenino

NR: No registrado.

6.5 Respuesta metabólica funcional en las células de la cúmula

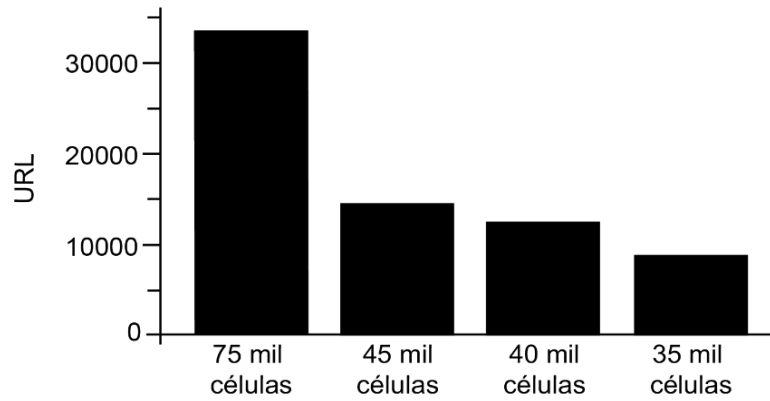
6.5.1 Ensayo de captura de glucosa en respuesta a insulina

Para determinar el efecto de la exposición a insulina en las células de la cúmula que son cosechadas con el complejo cúmula-ovocito durante la punción, decidimos explorar si evaluado la captura de glucosa, es posible visualizar una asociación entre la falta de respuesta y resultados negativos de FIV. Una manera plausible de evaluar la respuesta metabólica funcional de las células de la granulosa tipo cúmula, puede ser la captura de glucosa. Las células son estimuladas con insulina para movilizar al transportador GLUT4 hacia la membrana celular y con ello permitir la entrada de glucosa en la célula. Como primer paso para evaluar esta función en las células de la cúmula decidimos hacer la

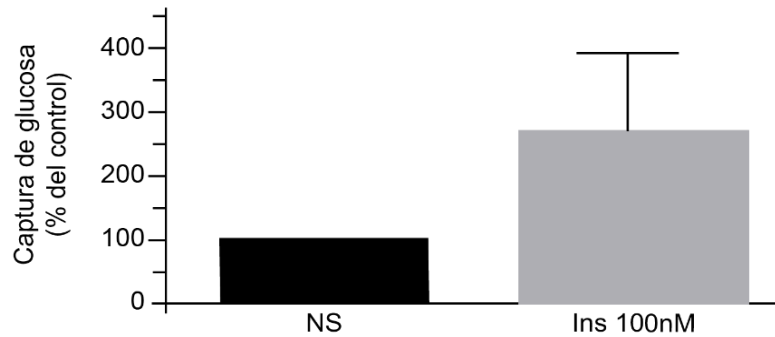
estandarización de una técnica no radiactiva. Trabajamos con las células de la cúmula que fueron obtenidas después de la punción ovárica, procedimiento que consiste en la extracción del complejo cúmula-ovocito. Para la estandarización hay que determinar el número mínimo de células requeridas para obtener tener niveles detectables de luminiscencia. Para ello empleamos una mezcla de células de la cúmula pertenecientes a dos pacientes y dos donantes, de la cual sembramos 75 000, 45 000, 40 000 y 35 000 células que fueron incubadas por 30 min y se procedió a realizar la captura de glucosa. Con el objetivo de evaluar la respuesta funcional de las células, nuevamente trabajamos con una mezcla de células obtenidas de dos pacientes y dos donantes, las sembramos en una cantidad de 75 000 células para el grupo sin dar tratamiento y para las estimuladas con insulina a una concentración de 100 nM, se incubaron por 30 min y se realizó la captura de glucosa. Para demostrar que es posible trabajar con células de una sola paciente, empleamos células provenientes de una paciente con factor SOP, las sembramos a una cantidad de 75 000 células y se realizó la captura luego de un tiempo de 30 min de incubación en los grupos sin tratamiento y las tratadas con insulina a 100 nM.

En la Figura 12 se muestra la captura de glucosa registrada con diferentes poblaciones de células de la cúmula; en el panel A se encuentra la captura de glucosa que corresponde a la primera parte de la estandarización, como se observa en la gráfica, entre 75 000 y 45 000 células hay suficiente detección de la luminiscencia. El siguiente paso de la estandarización fue registrar si hay aumento en la captura de glucosa después de hacer la estimulación con insulina. En este sentido, utilizamos una mezcla de células proveniente de dos pacientes y dos donantes, tal como se puede ver en el panel B, con 75 000 células se muestra un aumento en la captura de glucosa después de estimular con insulina a una concentración de 100 nM (barra gris). En un experimento similar a este, pero con células de una sola paciente, el Panel C, muestra que hay un aumento en la captura de glucosa después de la estimulación con insulina. Con estos datos mostramos que contamos con un modelo de células de la cúmula que nos permitirá evaluar la respuesta funcional individual a la insulina en las células provenientes en cada una de las pacientes, utilizando una cantidad mínima de 50 000 células.

A. Determinación del número mínimo para células para el ensayo de captura de glucosa



B. Capacidad de respuesta de las células de la cúmula



C. Respuesta en células colectadas de manera individual

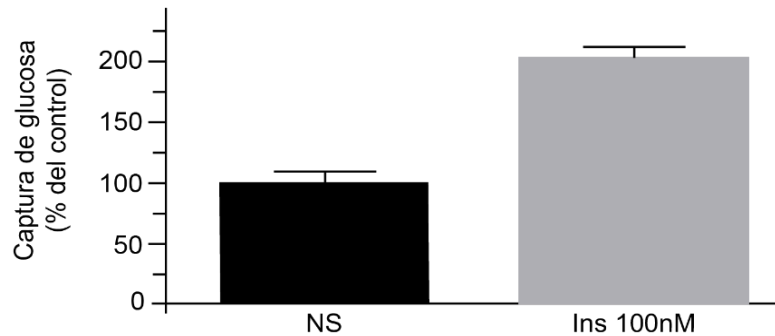


Figura 12. Estandarización de la captura de glucosa en células de la cúmula.

Se recolectaron las células de la cúmula de pacientes y donantes; estas células se pueden trabajar mezcladas con todas las células provenientes de la punción de varias mujeres o individualmente (células de una sola paciente); se contaron y se sembraron empleando diferente número de células y éstas fueron estimuladas por 30 minutos con insulina a una concentración de 100 nM antes de hacer la captura de glucosa; panel A y B: mezcla de células de dos donantes y dos pacientes; panel C: células de una sola paciente infértil con factor SOP. La intensidad de la señal se expresa como URL o bien, como porcentaje con respecto al control no tratado.

6.5.2 Respuesta funcional al reto con insulina en las células de la cúmula en paciente individual

Después de determinar el número requerido de células para llevar a cabo la captura de glucosa, evaluamos la respuesta funcional de estas células en paciente individual para analizar su relación con los posibles resultados del proceso FIV. Para llevar a cabo este paso, estuvimos pendientes de la agenda para darle seguimiento a las pacientes que se encontraban próximas para la punción ovárica. El día de la punción solicitamos que las células de la cúmula fueran cosechadas, y trabajamos con 50 000 o idealmente con 75 000 células para cada condición; éstas fueron divididas en dos grupos, sin tratamiento y las estimuladas con insulina a 100 nM durante 30 min; finalmente se hizo la captura de glucosa. A estas mismas pacientes se les dio seguimiento para registrar los resultados del proceso FIV; a saber, los resultados considerados positivos (en verde en las tablas subsecuentes) fueron: la ejecución de la transferencia embrionaria, el logro de embarazo bioquímico y/o la presencia de saco con latido de la semana seis a la ocho de embarazo; y considerados negativos son: desarrollo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), no transferencia, no implantación (beta negativa) o pérdida temprana.

Las células de las pacientes que formaron parte de este estudio presentaban dos factores que pueden generar mayor riesgo de infertilidad, la presencia de SOP (un grupo diferente a las pacientes que siguieron la intervención nutricional) y la edad (≥ 38 años), en las Tablas 13 y 14. Con respecto a la captura de glucosa, se consideró como el 100% al grupo no tratado y los resultados mostrados en las tablas corresponden al porcentaje obtenido en las células que fueron estimuladas con insulina, estos datos numéricos los presentamos de acuerdo a la intensidad de la respuesta a insulina, en orden de mayor a menor.

Los resultados de las pacientes con factor SOP se encuentran en la Tabla 13; tal como se observa en la columna del índice HOMA, todas las pacientes tienen resistencia a la insulina. Aparentemente, conforme va disminuyendo el porcentaje de respuesta de las células también se van observando resultados negativos con respecto al obtenido en la beta-hCG y en la presencia de saco con latido. Otro resultado que también registramos

fue conocer si la transferencia se hizo de manera inmediata o si se había postergado, en este grupo de pacientes la transferencia que se tuvo que postergar estuvo relacionado a la presencia de SHO, condición que afectó en más del 60% de las pacientes. En la Tabla 14 se muestran los resultados del grupo de las pacientes con factor edad y sin SOP; llamó la atención la columna del valor de HOMA ya que todas presentaron resistencia a la insulina, sin embargo, ninguna pasó por SHO. En la tabla de este grupo, se puede observar que en las pacientes con células que tuvieron menor respuesta también tuvieron un resultado negativo sobre la beta-hCG y el saco con latido. Con estos resultados tenemos un primer acercamiento de la respuesta funcional de las células, el cual nos podría permitir relacionarlo con uno de los resultados finales del proceso FIV, esto nos permitirá en un futuro emplear el ensayo de captura de glucosa para tomar una mejor decisión durante el proceso FIV.

Tabla 13. Respuesta funcional de las células de la cúmula y datos obstétricos de las pacientes con factor SOP.

	% de respuesta a insulina	Edad	IMC	HOMA	Beta-hCG	Saco con latido	Transferencia inmediata / postergada	SHO
SOP1	244.4	28	25.64	60.09	Positiva	Si	Si	Si
SOP2	217.02	29	28.84	33.17	Positiva	No/pérdida	Si	-
SOP3	156.9	35	28.88	29.84	Positiva	Si	No/ Si	Si
SOP4	142.73	37	24.78	6.8	Positiva	Si	No/ Si	Si
SOP5	129.8	41	27.01	22.03	-	-	No/No	Si
SOP6	122.7	31	36.73	10.4	Positiva	No/pérdida	No, P4alta/Si	-
SOP7	87.9	35	24.24	44.3	-	-	No	Si
SOP8	77.7	23	27.54	2.2	Negativa	-	Si	-
SOP9	67.08	29	23.05	26.5	Negativa	-	Si	-
SOP10	66	32	39.35	40.6	-	-	No	Si
SOP11	64.3	29	48	6.8	Positiva	Si	Si	Si
SOP12	45.3	33	31.25	7.74	-	-	No	Si
SOP13	43.9	20	23.4	5.6	-	-	No	Si

Respuesta a insulina: degradación de color azul oscuro a claro indica disminución en el % de respuesta. Resultados reproductivos positivos posibles en verde: la ejecución de la transferencia embrionaria, el logro de embarazo bioquímico y/o la presencia de saco con latido de la semana 6 a 8 de embarazo; resultados reproductivos negativos en rojo: desarrollo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), no fue posible la transferencia, no implantación (beta negativa) o pérdida temprana del embarazo.

Tabla 14. Respuesta funcional de las células de la cúmula y datos obstétricos de las pacientes con infertilidad por factor edad

	% de respuesta a insulina	Edad años	IMC Kg/m ²	HOMA	Beta-hCG	Saco con latido	Transferencia inmediata/postergada	SHO
PE1	418.47	38	27.59	7.8	Negativa	-	Si	-
PE2	177.9	38	28.25	4.9	Positiva		No, PGTA/Si	-
PE3	154.05	41	26.03	2.8	Positiva	Si	Si	-
PE4	98.79	40	36.39	121.5	Positiva	No/Ectópico	Si	-
PE5	81.3	42	NR	3	-	-	No, embriones mala calidad	-
PE6	73.56	41	25.1	14	Negativa	-	Si	-

Respuesta a insulina: degradación de color azul oscuro hasta un azul claro indicando disminución en el % de respuesta. Resultados positivos posibles en verde: la ejecución de la transferencia embrionaria, el logro de embarazo bioquímico y/o la presencia de saco con latido de la semana 6 a 8 de embarazo; Negativos en rojo: desarrollo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), no transferencia, no implantación (beta negativa) o pérdida temprana. PGTA: Análisis genético preimplantación.

6.6 HOMA-IR, IMC y respuesta de la estimulación ovárica controlada (EOC) en las pacientes con SOP

Los resultados mostrados en las tablas 13 y 14 muestran evidencia preliminar que indica que las pacientes con SOP con valores altos de RI y que no pasan por una mejora en su salud metabólica tienen tendencia a obtener resultados negativos en algún paso de la FIV, por lo que decidimos analizar un grupo adicional de pacientes SOP tratando de catalogar el resultado FIV como propicio (verde) o negativo.

Durante la EOC las pacientes son tratadas con gonadotropinas por aproximadamente diez días, durante este tiempo, a cada paciente se le toman tres muestras sanguíneas con la finalidad de cuantificar la concentración de estradiol para dar seguimiento en la estimulación; de acuerdo con la literatura, la proporción entre el valor del estradiol final y el valor estradiol inicial no debe resultar mayor a diez veces para considerar una estimulación efectiva pero no excesiva. En estas mismas muestras de suero cuantificamos los niveles de glucosa e insulina, e hicimos el cálculo del índice HOMA, y dimos seguimiento para conocer los resultados obstétrico de cada una. Seleccionamos

pacientes con factor SOP e IMC alto, cabe resaltar que se trata de un grupo totalmente diferente al grupo de pacientes de la intervención.

La Tabla 15 muestra los datos obtenidos en cada una de las pacientes seleccionadas. La columna E final/ E1 muestra el resultado de la división entre los valores de concentración de estradiol final e inicial, tal como se puede observar en más del 50% de las pacientes, este valor se encontró por arriba de diez veces indicando una respuesta excesiva. En cuanto al valor del HOMA, empleamos cuatro diferentes colores con la finalidad de resaltar la variación en este índice en cada paciente durante la EOC, en color verde, los valores que muestran ausencia de resistencia a la insulina (pocas pacientes en este caso). Los otros colores utilizados fueron: amarillo para valores entre 1.96 a 9.9, naranja entre 10 a 20, y en rojo para aquellos valores de RI muy altos por arriba de 20. Como se puede ver en la Tabla 15, durante la EOC se alteran aún más los valores del índice HOMA en paciente SOP. De acuerdo con el resultado obstétrico obtenido en este grupo, la tasa de éxito de embarazo fue del 33.33%.

Estos resultados, aunque preliminares, parecen indicar que en pacientes SOP con IMC alto, los valores del índice HOMA se alteran significativamente durante la EOC y, esto podría relacionarse con una respuesta exacerbada a las gonadotropinas, un aumento en el riesgo de SHO, con una baja tasa de éxito de embarazo y mayores tropiezos en para lograr un ciclo FIV exitoso.

Tabla 15. Impacto de la RI e IMC en la respuesta a la EOC y los resultados obstétricos en pacientes con SOP

	Edad	IMC	HOMA 1	HOMA 2	HOMA 3	Estradiol 1 (pg/ml)	Estradiol 2 (pg/ml)	Estradiol 3 (pg/ml)	Efinal/E1	Resultado obstétrico
PacSOP7	27	25	4.58	12.24	6.24	194	448	1704	8.78	beta-hCG negativa
PacSOP6	27	25.15	4.16	6.86	1.76	147	2655	5843	39.75	SHO / beta-hCG negativa
PacSOP8	35	25.39	4.34	15.66	2.47	232	437	1927	8.31	beta-hCG negativa
PacSOP1	28	25.64	6.23	60.09	24.01	545	5421	10327	18.95	SHO / beta-hCG positiva
PacSOP10	31	25.71	4.35	2.92	0.93	93	1296	3492	37.55	beta-hCG positiva / embarazo clínico
PacSOP17	27	26.7	12.2	7.55	7.94	326	1949	3461	10.62	beta-hCG negativa
PacSOP3	41	27.01	4.83	2.97	22.03	229	709	2379	10.39	SHO
PacSOP15	34	27.06	6.55	11.22	12.42	111	822	1717	15.47	beta-hCG negativa
PacSOP16	28	27.06	5.4	5.16	7.75	1542	3564	9091	5.9	beta-hCG positiva / embarazo clínico
PacSOP11	38	27.63	3.36	3.83	3.63	61	52	2594	42.52	beta-hCG positiva / embarazo clínico
PacSOP9	27	27.97	10.7	28.86	5.48	127	552	994	7.83	beta-hCG positiva / embarazo clínico
PacSOP12	29	28	21.62	52.57	14.78	136	460	1900	13.97	beta-hCG positiva / embarazo clínico
PacSOP2	29	28.84	33.17	6.81	21.43	19.8	436	1890	95.45	beta-hCG positiva / pérdida temprana
PacSOP4	35	28.88	5.62	29.84	2.91	54	299	1233	22.83	SHO
PacSOP14	30	31.22	30.43	7.13	39.47	142	1900	8437	59.42	beta-hCG negativa
PacSOP5	33	31.25	4.2	7.74	4	109	460	5613	51.5	SHO
PacSOP13	35	32.8	1.3	1.73	10.02	557	554	1424	2.56	Aún no transferencia
PacSOP18	42	34.51	5.39	8.01	19.72	42	315	949	22.6	beta-hCG negativa

Tasa de éxito de embarazo: 33.33%

Valor en el índice HOMA, verde: <1.96, es decir, no resistencia a la insulina; amarillo: valores entre 1.96 a 9.9; anaranjado: entre 10 a 20; rojo: valores por arriba de 20. Valor en IMC: degradación de color azul claro hasta un azul oscuro indicando aumento en el valor IMC. Resultados obstétricos: positivos posibles en verde: la ejecución de la transferencia embrionaria, el logro de embarazo bioquímico y/o la presencia de saco con latido de la semana 6 a 8 de embarazo; Negativos en rojo: desarrollo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), no implantación (beta negativa).

7. Discusión

La glucotoxicidad consiste en la elevación continua y crónica de la glucosa plasmática, provocando alteración tanto en la secreción como en las acciones de la insulina en diferentes órganos y tejidos. En consecuencia, se genera un estado de hiperinsulinemia constante e intermitente para lograr mantener niveles normales de glucosa sanguínea. La glucotoxicidad y el aumento constante en la insulina plasmática que ésta genera, conducen al desarrollo de varios efectos tóxicos.

La hiperglucemia prolongada causa alteración en la producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno porque disminuye la capacidad de una enzima antioxidante, la glutatión reductasa, aumenta la producción de radicales superóxido, se activa la vía de la proteína cinasa C (PKC), y se forman los productos finales de glicación avanzada (AGEs) [112]. Además de inducir un estado de inflamación generalizada, diferentes órganos y tejidos se ven afectados por la hiperglucemia prolongada, el sistema cardiovascular, riñones, ojos, neuronas, tiroides y sistema reproductivo, [36].

En particular, a nivel ovárico se ha reportado que la hiperinsulinemia mantiene la hiperandrogenemia presente en las mujeres con SOP, ya que actúa directamente sobre las células de la teca induciendo la producción excesiva de andrógenos, y aumentando el efecto del estímulo de la hormona luteinizante [113] y a nivel hepático se suprime la producción de la globulina fijadora de hormonas sexuales, contribuyendo al mantenimiento de testosterona libre en suero [114]. En conjunto, todos estos cambios exacerban los signos y síntomas característicos del SOP. Este estado hiperinsulinémico lo observamos en todas las pacientes que entraron al protocolo de la intervención nutricional, por ello la finalidad principal de este estudio fue corregir la glucotoxicidad.

La restricción en el consumo de carbohidratos da como resultado un cambio metabólico en el que el organismo, puede cambiar al uso de las grasas provenientes de la dieta y la reserva de grasa, para la producción de cuerpos cetónicos, con función energética pero también reguladora. La dieta cetogénica puede ser un tratamiento no farmacológico para revertir la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 y en SOP [94, 115, 116], porque se ha mostrado disminución en la insulina en ayunas, en el

HOMA-RI, los triglicéridos, el IMC, el peso, la grasa abdominal central, en varios de los marcadores de enfermedad cardiovascular y una disminución significativa de la proteína C reactiva de alta sensibilidad y de la inflamación [117].

Aunque la mayor parte de las pacientes alcanzaron la cetosis nutricional en las primeras tres semanas de la IN, como originalmente habíamos considerado, hubo pacientes que necesitaron hasta cinco semanas para entrar en cetosis. Además de los diferentes grados de daño metabólico, hay otras razones que explican la diversidad para alcanzar un buen grado de cetosis. El proceso de entrada a cetosis puede ser más lento ingiriendo alimentos procesados, ya que de esta manera se pueden estar consumiendo carbohidratos ocultos o no lograr una disminución suficiente en la cantidad de calorías ingeridas por día, porque estos alimentos son hipercalóricos y compactos en volumen. Por otro lado, un consumo excesivo de proteínas puede retrasar la entrada al estado de cetosis debido a que las proteínas contribuyen al conteo calórico y pueden eventualmente ser utilizadas para la producción de glucosa, manteniendo niveles altos de glucosa y secreción de insulina. Esto resalta nuestro interés en llevar también un control de la cantidad de proteína diaria y se mantenga en niveles moderados (1 a 2 g/kg de peso).

Apridonidze y colaboradores en el 2005, estudiaron la prevalencia de SM en pacientes SOP, mostrando que solamente el 43% de ellas tenían el diagnóstico de SM y el 47.2% presentaban solamente de uno a dos parámetros de SM alterado [118]. Es decir, de un grupo seleccionado de pacientes SOP no todas presentan SM, similar a los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, resaltamos que todas nuestras pacientes presentaban RI, un diagnóstico que no se consideró en la publicación del 2005. De acuerdo con los datos obtenidos, proponemos que el primer evento es la aparición de RI, lo que da inicio al desarrollo en la alteración de los demás parámetros del SM -la obesidad central, aumento en los niveles de triglicéridos, disminución en los niveles de HDL-C, aumento en la presión sanguínea y alteración en los niveles de glucosa sérica. Sin embargo, el orden de aparición de estos signos es variable, no todas las pacientes mostraron alteración en exactamente los mismos parámetros, ni en el mismo orden. En soporte de esta propuesta, en 1988 en la revisión realizada por Reaven y cols., se sugiere que la dupla hiperinsulinemia/resistencia a la insulina juega un papel importante en la aparición de los diferentes eventos del SM [119]; por otro

lado, dando seguimiento a 2217 sujetos durante ocho años, se observó que la hiperinsulinemia precede a la aparición de los diferentes parámetros del SM, al hígado graso no alcohólico así como también al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 [120]. Durante el estado de hiperinsulinemia aumenta la producción hepática de VLDL y de los triglicéridos séricos, al mismo tiempo, disminuye la producción de las lipoproteínas de alta densidad [121] lo que contribuye a la dislipidemia. La elevación en la presión sanguínea durante la RI muy probablemente se debe a la activación de la vía MAPK, que favorece a la vasoconstricción, y la retención de agua y sodio en el riñón [122].

Por otro lado, se ha mostrado que la obesidad es un predictor de aumento en los niveles de insulina, y la hiperinsulinemia también resulta en un aumento de peso, indicando que existe una relación bidireccional entre la obesidad y la hiperinsulinemia [123], efecto que también encontramos en las pacientes de nuestro estudio, particularmente siguiendo la medida de la circunferencia de la cintura como parámetro indicativo de obesidad central.

Notamos que el parámetro de SM que menos se altera es el nivel sérico de glucosa, luego de la glucotoxicidad, hiperinsulinemia y RI que observamos en nuestra población de estudio; en el trabajo de Apridonidze solo el 3.8% de las pacientes SOP presentaron un alto nivel de glucosa sanguínea en ayuno [118]. Usualmente el factor que más contribuye a los altos niveles de glucosa sérica en ayuno en el diabético tipo 2 es que a nivel hepático se estimula la gluconeogénesis a través de la función estimulante de la enzima piruvato carboxilasa y la activación de la acetil-CoA [124], lo que se observa en un hígado francamente resistente a la insulina. Nuestro estudio descartó pacientes diabéticas.

El sobrepeso y la obesidad de nuestras pacientes podrían ser los factores involucrados en la falta de mejora en los niveles de HDL-C que observamos. En comparación, Sharman y colaboradores, analizaron los datos de un grupo de hombres normolipémicos y con peso normal, que se sometieron por seis semanas a una dieta cetogénica, logrando aumentar los niveles de HDL-C hasta un 11.5% del valor inicial considerando la condición inicial de los sujetos de este estudio [125]. Se ha mostrado que la obesidad altera la actividad de las enzimas involucradas en el remodelado de las lipoproteínas como la lecitin-colesterol transferasa (LCAT), la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), y la propia composición de la HDL

[126]. A pesar de que las pacientes de nuestro estudio disminuyeron su IMC, es posible que no se lograra mejorar la actividad de estas enzimas o bien esta falta de cambio sea debida a la condición femenina/SOP. Los resultados en la literatura son conflictivos: un estudio de pacientes SOP con sobrepeso/obesidad que siguieron una dieta cetogénica por 6 meses no mostraron diferencia significativa en los valores de HDL-C [94]. Por el contrario, en el trabajo realizado por Cincione y colaboradores, a pesar de que las pacientes SOP tenían sobrepeso/obesidad, lograron aumentar los niveles de HDL-C luego de seguir el tratamiento dietético por 45 días, pero cabe resaltar que la diferencia fue que en este grupo de pacientes el valor de HDL-C no era bajo inicialmente, se encontraba en 50 mg/dl, lo que podría incidir en que se lograra el aumentar el valor de HDL [115].

Durante la intervención nutricional, las pacientes restringieron el consumo de carbohidratos, el principal macronutriente que estimula la secreción de insulina, logrando una mejora en la hiperinsulinemia. El siguiente paso fue evaluar el estado de RI de las pacientes, para ello empleamos un modelo matemático llamado *homeostasis model assessment* (HOMA) presentado por Matthews y colaboradores, que permite hacer una estimación de la resistencia a la insulina mediante las concentraciones de la glucosa e insulina sérica en ayuno [127]. Luego de haber seguido la intervención, las pacientes mejoraron significativamente en el índice HOMA, que interpretamos como disminución de la resistencia a la insulina. Además de usar el índice HOMA-IR, decidimos usar otros dos indicadores que se han postulado en la literatura como biomarcadores asociados a la RI. Existe una gran necesidad de indicar a una paciente el riesgo que representa la RI para su salud, pero también para el logro de un embarazo. Se han propuesto alternativas al HOMA que no requieran medir insulina sérica. Aunque la medición de insulina es estándar en laboratorios clínicos, su costo es variable y puede llegar a ser más elevado que medir triglicéridos o glucosa, que siempre están incluidos en una química de 5 elementos o pueden ser medidos en consultorio con una gota de sangre. Uno de ellos fue el marcador Triglicéridos-Glucosa-Índice de masa corporal (IMC) [128, 129], que podría establecerse en la práctica clínica como algo muy sencillo de medir. El promedio del TYG-IMC en las pacientes al inicio fue de 275 disminuyendo significativamente hasta 233, misma tendencia observada con el valor HOMA. Aunque aún no se ha establecido un punto

de corte exacto para determinar el estado de RI, si se ha observado que existe una asociación estadísticamente significativa con RI y un valor de este marcador por arriba de 200 puede estar indicando riesgo; sin embargo, hay que tomar en consideración las diferencias étnicas y se requieren más estudios para entender si puede sustituir al HOMA [129-132].

El último marcador que utilizamos fue la relación entre Triglicéridos/HDL-C, que como su nombre lo indica, solamente emplea esos parámetros para su cálculo y se ha reportado con buena correlación con RI [128, 133]; paralelamente con los resultados de los índices anteriores, el promedio disminuyó significativamente tras la IN.

En los parámetros reproductivos, contamos con dos niveles de evaluación: calidad ovular y calidad endometrial. No registramos diferencia numérica significativa entre el ciclo anterior y el ciclo posterior a la intervención nutricional, en parámetros clásicamente registrados como marcadores de calidad FIV. Sin embargo, la calidad del ovocito debe siempre medirse de manera indirecta, no se debe manipular, por lo que una manera indirecta de evaluar su calidad es mediante las células de la cúmula [134]. Este tipo celular se encuentra rodeando y en íntimo contacto metabólico con el ovocito con la finalidad de proveerle el soporte físico y ambiental requerido para el correcto desarrollo durante la foliculogénesis [135, 136]. El complejo Cúmula-Ovocito utiliza la glucosa para varios de los procesos metabólicos esenciales, siendo las células de la cúmula las responsables en metabolizar la mayor parte de la glucosa, brindando intermediarios metabólicos al ovocito como piruvato, NADPH, purina de novo y cisteína, porque no puede producirlos [137]. Una manera factible que podría servir en un futuro para evaluar indirectamente la calidad del ovocito es la evaluación funcional de la cúmula: considerando que su función consiste en emplear glucosa para dar los nutrientes necesarios al ovocito, usamos un sistema de captura de glucosa y analizamos la capacidad de entrada de glucosa en respuesta al estímulo de insulina *in vitro*. Como primer acercamiento hemos mostrado que cada paciente tiene una respuesta variable ante el estímulo con insulina, y al equiparar estos datos con su respectivo resultado obstétrico notamos que una menor captura de glucosa se asocia con resultados obstétricos negativos. Ampliando los alcances de estas observaciones, en un futuro este sistema se podría implementar dentro de la evaluación en la calidad de los ovocitos permitiendo tomar una mejor decisión en el proceso de la FIV.

Por otro lado, también en el ámbito de los parámetros reproductivos, evaluamos la calidad del endometrio para tratar de entender su capacidad efectiva para lograr la implantación del embrión, así como sostener el embarazo. El grosor promedio del endometrio no mostró diferencia significativa entre el ciclo anterior y el ciclo post-IN, sin embargo, si se pudo ver una tendencia de aumento en el grosor tras la intervención. Las pacientes que lograron un mejor grosor tras la intervención o un grosor óptimo de 7 a 11 mm lograron sostener el embarazo.

Todas las pacientes presentaban sobrepeso y obesidad antes de iniciar la intervención nutricional, lo que las mantienen en un estado de inflamación, este estado también afecta a nivel de endometrio. Al finalizar la IN, todas disminuyeron de peso. Se ha mostrado que los pacientes obesos resistentes a la insulina presentan a nivel hepático una acumulación de ácidos grasos libres provenientes de la grasa visceral, al mismo tiempo que se sintetizan y liberan otros componentes activos como resistina, angiotensina 2, interleucina 6 y 1β [138]. Es de relevancia resaltar que los marcadores de inflamación interleucina 6 y TNF- α se han relacionado con una tasa pobre de implantación [139].

Las pacientes SOP con RI tiene alteración en la receptividad endometrial [140]. Se ha demostrado que la insulina inhibe la producción de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP-1), sugiriendo que la hiperinsulinemia puede afectar la función normal del endometrio, provocando fallo de implantación del embrión y aumento en la tasa de abortos [141]. Esta intervención nutricional que mejoró la hiperinsulinemia y redujo la RI, corrigiendo potencialmente el proceso de decidualización, pudo resultar en un aumento en la implantación y en la tasa de embarazo exitoso, tal y como observamos con nuestras pacientes.

La receptividad endometrial también se ve afectada por la combinación de la resistencia a la insulina y el hiperandrogenismo, debido a que ocasionan inflamación a nivel endometrial y estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno [142]. Los fibroblastos del estroma endometrial de mujeres con SOP muestran una respuesta de decidualización aberrante a la progesterona [143]. Cuando la dieta cetogénica reduce el IMC y el volumen del tejido adiposo visceral, también se muestra una disminución en la producción de estrógenos acíclicos a partir de la aromatización del exceso androgénico en el tejido adiposo y de los niveles sanguíneos de sulfato de

dehidropiandrosterona, mejorando la testosterona total y libre, la relación hormona luteinizante (LH)/hormona foliculoestimulante (FSH), del estradiol y de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) [81, 115].

El ambiente inflamatorio en el endometrio desencadenado por la RI también puede resultar en resistencia a la progesterona y esto ser la causa probable de la disfunción endometrial, infertilidad y complicaciones en el embarazo en mujeres con SOP [144]. Luego de seguir la intervención nutricional también pudo haber reducido el estado inflamatorio en el endometrio; se ha mostrado que seguir una dieta cetogénica mejora el estado inflamatorio en diferentes condiciones patológicas [145].

El microambiente endometrial anormal en pacientes con SOP y RI puede conducir a una receptividad endometrial alterada por estados hiperplásicos; la persistencia estrogénica, la hiperinsulinemia y la RI han mostrado una correlación positiva con estados endometriales hiperproliferativos (hiperplasia y cáncer endometriales) que se encuentran con mayor frecuencia en las mujeres con SOP.

El tratamiento con gonadotropinas podría generar un estado transitorio de RI adicional en las pacientes que pasan por la EOC siendo SOP y/o teniendo un IMC alto, estado que puede ser más agudo tal como lo observamos en los valores más elevados del índice HOMA-IR de un grupo adicional de pacientes (Tabla 15). El nivel de aumento en el estradiol sérico a lo largo de la EOC es crítico, la respuesta tiene que ser óptima y controlada para un buen desarrollo ovular y endometrial. Específicamente, durante la EOC si el índice HOMA-IR ya es anormal, esto podría tener efectos deletéreos en la preparación endometrial, desarrollo de los folículos, y agravar la hiperestimulación ovárica. Las pacientes con factor SOP tienden a pasar por SHO más frecuentemente en comparación con las pacientes con otro factor de infertilidad como la edad [146]. Un estudio realizado por Coussa y cols., mostró que el proceso FIV altera los niveles de glucosa e insulina [147]; y en mujeres con SOP tratadas con anticonceptivos orales disminuye la sensibilidad a la insulina y aumentan los niveles de triglicéridos [148]. Un mediador responsable de la fisiopatología del SHO es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y hay un aumento en la expresión del ARNm de este factor en el folículo cístico de mujeres con SOP [149], que plausiblemente puede contribuir a un alto riesgo de desarrollar SHO [150].

Una idea que resulta entonces de gran interés es combatir la RI antes de iniciar la EOC, en toda paciente que muestre un IMC y HOMA altos, en prevención del SHO, particularmente en pacientes SOP, aunque no excluye a toda aquella paciente que sea RI. El SHO puede ser un problema mayor que cause efectos severos o mínimamente, causa retraso en la transferencia embrionaria porque se genera la necesidad de ir a un ciclo diferido.

Finalmente, vale la pena puntualizar los alcances de este estudio: al implementar y confirmar la efectividad terapéutica de la intervención nutricional se logró:

- Disminución efectiva de la hiperinsulinemia constante causada por la exposición excesiva y continua a glucosa.
- Disminución efectiva de la resistencia a la insulina en las pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico.
- Mejoría de la salud metabólica de estas pacientes.
- Mejoría significativa en tasas de embarazo, embarazo en curso y bebés nacidos vivos en un tratamiento FIV para pacientes con SOP.

Así mismo, las limitaciones que consideramos mencionar son:

- La información para el seguimiento nutricional es proporcionada por la paciente, lo que puede causar imprecisiones en los datos, pero el parámetro más importante que es la reducción en CH siempre causó excreción de cetonas en orina, que tuvo siempre evidencia clara en el cambio de color de la tira.
- Este es un estudio piloto, el tamaño de la muestra aún es pequeña, pero pone sobre la mesa la necesidad de brindar a la paciente SOP la oportunidad de corregir la RI para lograr el embarazo.

8. Conclusiones

- Con esta intervención nutricional logramos hasta un 90% de disminución en la carga total diaria de carbohidratos con la consecuente reducción de la glucotoxicidad, corrección de la hiperinsulinemia y disminución del HOMA-IR (11 de 12 pacientes con mejoría o normalización en IR).
- Todas las pacientes que lograron cetosis nutricional mostraron mejora metabólica con pérdida de peso, disminución de la grasa abdominal, mejor IMC e índice TYG-IMC.
- Los modelos de seguimiento electrónico remoto basados en la auto-detección de cetosis, y medida de cintura, glucosa (glucómetro) y peso, registraron efectivamente el apego de la paciente al programa de cambio nutricional, que resultó efectivo para mejorar las tasas de embarazo a término y proporcionó a la mayoría de las pacientes una solución a su problema de infertilidad.
- Nuestros datos parecen indicar que el beneficio mayor de la IN se refleja en un endometrio más receptivo y con mejor capacidad para sostener el embarazo.

9. Perspectivas

- Utilizar la evidencia del beneficio de la IN para informar y educar a la comunidad médica y promover el tratamiento para más pacientes SOP.
- Considerar a la población general de pacientes con IMC alto, con resistencia a la insulina y problemas de infertilidad diferentes al Síndrome Ovario Poliquístico, para estudiar si evitando la glucotoxicidad se obtienen mejores tasas de embarazo en FIV.
- Ahondar en el estudio de los parámetros reproductivos que mejoraron más con la intervención:
 - (1) calidad endometrial (grosor y tasas de crecimiento, parámetros transcripcionales)
 - (2) calidad de los ovocitos (pruebas basadas en granulosa)

10. Referencias

1. Franks, S., J. Stark, and K. Hardy, *Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(4): p. 367-78.
2. Ibanez, L., et al., *An International Consortium Update: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Polycystic Ovarian Syndrome in Adolescence*. Horm Res Paediatr, 2017. **88**(6): p. 371-395.
3. Lebbe, M. and T.K. Woodruff, *Involvement of androgens in ovarian health and disease*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(12): p. 828-37.
4. Webber, L.J., et al., *Formation and early development of follicles in the polycystic ovary*. Lancet, 2003. **362**(9389): p. 1017-21.
5. Legro, R.S., et al., *Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(12): p. 4565-92.
6. Pasquali, R. and A. Gambineri, *New perspectives on the definition and management of polycystic ovary syndrome*. J Endocrinol Invest, 2018. **41**(10): p. 1123-1135.
7. Stein, I.F. and M.L. Leventhal, *Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1935. **29**(2): p. 181-191.
8. Yau, T.T., et al., *Polycystic ovary syndrome: a common reproductive syndrome with long-term metabolic consequences*. Hong Kong Med J, 2017. **23**(6): p. 622-34.
9. Dewailly, D., et al., *Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(3): p. 334-52.
10. Hughesdon, P.E., *Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis"*. Obstet Gynecol Surv, 1982. **37**(2): p. 59-77.
11. Lizneva, D., et al., *Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2016. **106**(1): p. 6-15.
12. Zawadzki, J. and A. Dunaif, *Diagnostic criteria for polycystic syndrome: towards a rational approach*. Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, and others, Eds. Polycystic ovary syndrome. Boston: Blackwell Scientific, 1992: p. 337-84.
13. Group., R.E.A.-S.P.C.W., *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2004. **81**(1): p. 19-25.
14. Group., R.E.A.-S.P.C.W., *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)*. Hum Reprod, 2004. **19**(1): p. 41-7.
15. Azziz, R., et al., *Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4237-45.
16. Azziz, R., et al., *The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report*. Fertil Steril, 2009. **91**(2): p. 456-88.
17. Health, N.I.o., *Evidence-based methodology workshop on polycystic ovary syndrome, Decembre 3-5, 2012. Executive summary*. National Institutes of Health.
18. Bozdag, G., et al., *The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod, 2016. **31**(12): p. 2841-2855.
19. Goldrat, O. and A. Delbaere, *PCOS: update and diagnostic approach*. Clin Biochem, 2018. **62**: p. 24-31.
20. Yildiz, B.O., et al., *Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria*. Hum Reprod, 2012. **27**(10): p. 3067-73.
21. Moran, C., et al., *Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in mexican women*. Gynecol Obstet Invest, 2010. **69**(4): p. 274-80.
22. Goodarzi, M.O., et al., *Polycystic ovary syndrome in Mexican-Americans: prevalence and association with the severity of insulin resistance*. Fertil Steril, 2005. **84**(3): p. 766-9.
23. Park, Y.W., et al., *The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994*. Arch Intern Med, 2003. **163**(4): p. 427-36.

24. Andrade, V.H., et al., *Current aspects of polycystic ovary syndrome: A literature review*. Rev Assoc Med Bras (1992), 2016. **62**(9): p. 867-871.
25. Dumesic, D.A., et al., *Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome*. Endocr Rev, 2015. **36**(5): p. 487-525.
26. Kazer, R.R., B. Kessel, and S.S. Yen, *Circulating luteinizing hormone pulse frequency in women with polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **65**(2): p. 233-6.
27. Walters, K.A., et al., *New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins*. Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(12): p. 841-852.
28. Walters, K.A., et al., *The Role of Central Androgen Receptor Actions in Regulating the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis*. Neuroendocrinology, 2018. **106**(4): p. 389-400.
29. Diamanti-Kandarakis, E. and A. Dunaif, *Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications*. Endocr Rev, 2012. **33**(6): p. 981-1030.
30. Delitala, A.P., et al., *Polycystic ovary syndrome, adipose tissue and metabolic syndrome*. Arch Gynecol Obstet, 2017. **296**(3): p. 405-419.
31. Prentki, M., et al., *Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic beta-Cell*. Diabetes, 2020. **69**(3): p. 279-290.
32. Campos-Nonato, I., et al., *Prevalence of previously diagnosed diabetes and glycemic control strategies in Mexican adults: ENSANUT-2016*. PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0230752.
33. Andres-Hernando, A., et al., *Sugar causes obesity and metabolic syndrome in mice independently of sweet taste*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020.
34. Yang, Q., et al., *Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults*. JAMA Intern Med, 2014. **174**(4): p. 516-24.
35. Newsholme, P., et al., *Nutrient regulation of insulin secretion and action*. J Endocrinol, 2014. **221**(3): p. R105-20.
36. Giri, B., et al., *Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity*. Biomed Pharmacother, 2018. **107**: p. 306-328.
37. Kawahito, S., H. Kitahata, and S. Oshita, *Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(33): p. 4137-42.
38. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction*. Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 351-66.
39. Allaman, I., M. Bélanger, and P.J. Magistretti, *Methylglyoxal, the dark side of glycolysis*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 23.
40. Irshad, Z., et al., *Activation of the unfolded protein response in high glucose treated endothelial cells is mediated by methylglyoxal*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 7889.
41. Puddu, A., et al., *Advanced Glycation End-Products and Hyperglycemia Increase Angiopoietin-2 Production by Impairing Angiopoietin-1-Tie-2 System*. J Diabetes Res, 2019. **2019**: p. 6198495.
42. Del Prato, S., *Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies*. Diabet Med, 2009. **26**(12): p. 1185-92.
43. Crofts, C.A.P., *Hyperinsulinemia: A unifying theory of chronic disease?* Diabesity, 2015. **1**(4): p. 34.
44. Stout, R.W., *Insulin and atheroma. 20-yr perspective*. Diabetes Care, 1990. **13**(6): p. 631-54.
45. Zavaroni, I., et al., *Hyperinsulinemia in a normal population as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension, and coronary heart disease: the Barilla factory revisited*. Metabolism, 1999. **48**(8): p. 989-94.
46. Ceriello, A. and E. Motz, *Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(5): p. 816-23.
47. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 915-28.
48. Feng, L., et al., *Metabolic syndrome and amnesic mild cognitive impairment: Singapore Longitudinal Ageing Study-2 findings*. J Alzheimers Dis, 2013. **34**(3): p. 649-57.
49. Yan, W. and X. Li, *Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases*. Front Med, 2013. **7**(1): p. 81-90.

50. Huang, P.L., *A comprehensive definition for metabolic syndrome*. *Dis Model Mech*, 2009. **2**(5-6): p. 231-7.
51. Jeanes, Y.M. and S. Reeves, *Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges*. *Nutr Res Rev*, 2017. **30**(1): p. 97-105.
52. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. *Diabet Med*, 1998. **15**(7): p. 539-53.
53. Balkau, B. and M.A. Charles, *Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. *Diabet Med*, 1999. **16**(5): p. 442-3.
54. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. *Circulation*, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
55. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. *Circulation*, 2005. **112**(17): p. 2735-52.
56. Zimmet, P., et al., *The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition*. *J Atheroscler Thromb*, 2005. **12**(6): p. 295-300.
57. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
58. Lizarzaburu Robles, J., *Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. Metabolic syndrome: concept and practical application*. *An Fac med*, 2013. **74**(4): p. 315-20.
59. De Leo, V., A. la Marca, and F. Petraglia, *Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(5): p. 633-67.
60. Burghen, G.A., J.R. Givens, and A.E. Kitabchi, *Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980. **50**(1): p. 113-6.
61. Stepto, N.K., et al., *Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp*. *Hum Reprod*, 2013. **28**(3): p. 777-84.
62. Poretsky, L., *On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states*. *Endocr Rev*, 1991. **12**(1): p. 3-13.
63. Poretsky, L., et al., *The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(4): p. 535-82.
64. Diamond, M.P., et al., *Human follicular fluid insulin concentrations*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985. **61**(5): p. 990-2.
65. Méndez, E., N. Montserrat, and J.V. Planas, *Modulation of the steroidogenic activity of luteinizing hormone by insulin and insulin-like growth factor-I through interaction with the cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in the trout ovary*. *Mol Cell Endocrinol*, 2005. **229**(1-2): p. 49-56.
66. Rice, S., et al., *Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries*. *Hum Reprod*, 2005. **20**(2): p. 373-81.
67. Dunaif, A., et al., *Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(2): p. 801-10.
68. Nestler, J.E., et al., *Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(6): p. 2001-5.
69. Rojas, J., et al., *Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth*. *Int J Reprod Med*, 2014. **2014**: p. 719050.
70. Azziz, R., et al., *Polycystic ovary syndrome*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16057.
71. Skubleny, D., et al., *The Impact of Bariatric Surgery on Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review and Meta-analysis*. *Obes Surg*, 2016. **26**(1): p. 169-76.
72. Tang, T., et al., *Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012(5): p. Cd003053.

73. Jensterle, M., et al., *Long-term efficacy of metformin in overweight-obese PCOS: longitudinal follow-up of retrospective cohort*. *Endocr Connect*, 2020. **9**(1): p. 44-54.
74. Curi, D.D., et al., *Metformin versus lifestyle changes in treating women with polycystic ovary syndrome*. *Gynecol Endocrinol*, 2012. **28**(3): p. 182-5.
75. Nestler, J.E., et al., *Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(26): p. 1876-80.
76. Abdalla, M.A., et al., *A review of therapeutic options for managing the metabolic aspects of polycystic ovary syndrome*. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2020. **11**: p. 2042018820938305.
77. Xu, Y., Y. Wu, and Q. Huang, *Comparison of the effect between pioglitazone and metformin in treating patients with PCOS: a meta-analysis*. *Arch Gynecol Obstet*, 2017. **296**(4): p. 661-677.
78. Chao, E.C., *SGLT-2 Inhibitors: A New Mechanism for Glycemic Control*. *Clin Diabetes*, 2014. **32**(1): p. 4-11.
79. Scheen, A.J. and N. Paquot, *Metabolic effects of SGLT-2 inhibitors beyond increased glucosuria: A review of the clinical evidence*. *Diabetes Metab*, 2014. **40**(6 Suppl 1): p. S4-s11.
80. Javed, Z., et al., *Effects of empagliflozin on metabolic parameters in polycystic ovary syndrome: A randomized controlled study*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2019. **90**(6): p. 805-813.
81. Paoli, A., et al., *Effects of a ketogenic diet in overweight women with polycystic ovary syndrome*. *J Transl Med*, 2020. **18**(1): p. 104.
82. Stamets, K., et al., *A randomized trial of the effects of two types of short-term hypocaloric diets on weight loss in women with polycystic ovary syndrome*. *Fertil Steril*, 2004. **81**(3): p. 630-7.
83. Moran, L.J., et al., *Short-term meal replacements followed by dietary macronutrient restriction enhance weight loss in polycystic ovary syndrome*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(1): p. 77-87.
84. Tsagareli, V., M. Noakes, and R.J. Norman, *Effect of a very-low-calorie diet on in vitro fertilization outcomes*. *Fertil Steril*, 2006. **86**(1): p. 227-9.
85. Porchia, L.M., et al., *Diets with lower carbohydrate concentrations improve insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome: A meta-analysis*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2020. **248**: p. 110-117.
86. Fukao, T., et al., *Ketone body metabolism and its defects*. *J Inherit Metab Dis*, 2014. **37**(4): p. 541-51.
87. Dabek, A., et al., *Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States*. *Nutrients*, 2020. **12**(3).
88. Halestrap, A.P. and D. Meredith, *The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 619-28.
89. Pierre, K. and L. Pellerin, *Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function*. *J Neurochem*, 2005. **94**(1): p. 1-14.
90. Puchalska, P. and P.A. Crawford, *Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics*. *Cell Metab*, 2017. **25**(2): p. 262-284.
91. Gershuni, V.M., S.L. Yan, and V. Medici, *Nutritional Ketosis for Weight Management and Reversal of Metabolic Syndrome*. *Curr Nutr Rep*, 2018. **7**(3): p. 97-106.
92. Bough, K.J., et al., *Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet*. *Ann Neurol*, 2006. **60**(2): p. 223-35.
93. Newman, J.C. and E. Verdin, *beta-hydroxybutyrate: much more than a metabolite*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. **106**(2): p. 173-81.
94. Mavropoulos, J.C., et al., *The effects of a low-carbohydrate, ketogenic diet on the polycystic ovary syndrome: a pilot study*. *Nutr Metab (Lond)*, 2005. **2**: p. 35.
95. Volek, J. and S.D. Phinney, *The art and science of low carbohydrate living: An expert guide to making the life-saving benefits of carbohydrate restriction sustainable and enjoyable*. 2011: Beyond Obesity.
96. INGENES. *Fertilización In Vitro vs. Inseminación Artificial*. 11 de abril del 2023; Available from: <https://www.ingen.es.com/fertilizacion-in-vitro-vs-inseminacion-artificial/>.
97. Maseelall, P.B., et al., *Antral follicle count is a significant predictor of livebirth in in vitro fertilization cycles*. *Fertil Steril*, 2009. **91**(4 Suppl): p. 1595-7.
98. Jamil, M., et al., *Impact of the number of retrieved oocytes on IVF outcomes: oocyte maturation, fertilization, embryo quality and implantation rate*. *Zygote*, 2023. **31**(1): p. 91-96.

99. Álvarez, C., et al., *In vitro maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles*. Indian J Med Res, 2013. **137**(2): p. 331-8.
100. Bergh, C., et al., *Comparison of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocytes from large and small follicles*. Hum Reprod, 1998. **13**(7): p. 1912-5.
101. Hill, G.A., et al., *The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer*. Fertil Steril, 1989. **52**(5): p. 801-6.
102. Heijnen, E.M., et al., *A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(1): p. 13-21.
103. Franks, S. and K. Hardy, *Aberrant follicle development and anovulation in polycystic ovary syndrome*. Ann Endocrinol (Paris), 2010. **71**(3): p. 228-30.
104. Child, T.J., et al., *In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2001. **76**(5): p. 936-42.
105. Wang, T.H., et al., *Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3300-8.
106. Zolton, J.R. and S. Torrealday, *In Vitro Fertilization for Polycystic Ovarian Syndrome*. Clin Obstet Gynecol, 2021. **64**(1): p. 39-47.
107. Qi, J., et al., *Local Cortisol Elevation Contributes to Endometrial Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(7): p. 2457-2467.
108. Ebejer, K. and J. Calleja-Agius, *The role of cytokines in polycystic ovarian syndrome*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**(6): p. 536-40.
109. Viechtbauer, W., et al., *A simple formula for the calculation of sample size in pilot studies*. J Clin Epidemiol, 2015. **68**(11): p. 1375-9.
110. Herrera-Cogco, E., et al., *Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures*. Toxicol Mech Methods, 2020. **30**(5): p. 336-349.
111. Wolfman, W., *No. 249-Asymptomatic Endometrial Thickening*. J Obstet Gynaecol Can, 2018. **40**(5): p. e367-e377.
112. Campos, C., *Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae*. Postgrad Med, 2012. **124**(6): p. 90-7.
113. Nestler, J.E., et al., *Insulin Stimulates Testosterone Biosynthesis by Human Thecal Cells from Women with Polycystic Ovary Syndrome by Activating Its Own Receptor and Using Inositolglycan Mediators as the Signal Transduction System*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998. **83**(6): p. 2001 - 2005.
114. Nestler, J.E., et al., *A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **72**(1): p. 83-9.
115. Cincione, R.I., et al., *Effects of Mixed of a Ketogenic Diet in Overweight and Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021. **1**(3): p. 413-26.
116. Hallberg, S.J., et al., *Reversing Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence*. Nutrients, 2019. **11**(4).
117. Hallberg, S.J., et al., *Effectiveness and Safety of a Novel Care Model for the Management of Type 2 Diabetes at 1 Year: An Open-Label, Non-Randomized, Controlled Study*. Diabetes Therapy, 2018. **9**(2): p. 583-612.
118. Apridonidze, T., et al., *Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 1929-35.
119. Reaven, G.M., *Role of Insulin Resistance in Human Disease*. Diabetes, 1988. **37**: p. 1595 - 1607.
120. Haffner, S.M., et al., *Prospective analysis of the Insulin-Resistance Syndrome (Syndrome X)*. Diabetes, 1992. **41**: p. 715 - 722.
121. Roberts, C.K., A.L. Hevener, and R.J. Barnard, *Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training*. Compr Physiol, 2013. **3**(1): p. 1-58.
122. Zhou, M.-S., A. Wang, and H. Yu, *Link between insulin resistance and hypertension: What is the evidence from evolutionary biology?* Diabetology & Metabolic Syndrome 2014. **6**(12).

123. Xu, C., et al., *Bidirectional temporal relationship between obesity and hyperinsulinemia: longitudinal observation from a Chinese cohort*. *BMJ Open Diab Res Care*, 2021. **9**.
124. Rodríguez-Rodríguez, E., et al., *Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico*. *Nutr Hosp*, 2009. **24**(4): p. 415 - 421.
125. Stadler, J.T., et al., *Obesity Affects HDL Metabolism, Composition and Subclass Distribution*. *Biomedicines*, 2021. **1**(3): p. 413-26.
126. Sharmar, M.J., et al., *A Ketogenic Diet Favorably Affects Serum Biomarkers for Cardiovascular Disease in Normal-Weight Men*. *Human Nutrition and Metabolism*, 2002: p. 1879 - 1885.
127. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**: p. 412 - 419.
128. Mirr, M., et al., *Newly proposed insulin resistance indexes called TyG-NC and TyG-NHtR show efficacy in diagnosing the metabolic syndrome*. *J Endocrinol Invest*, 2021. **44**(12): p. 2831-2843.
129. Wang, X., et al., *Triglyceride glucose-body mass index and the risk of diabetes: a general population-based cohort study*. *Lipids Health Dis*, 2021. **20**(1): p. 99.
130. Li, Y., et al., *Association between triglyceride glucose-body mass index and non-alcoholic fatty liver disease in the non-obese Chinese population with normal blood lipid levels: a secondary analysis based on a prospective cohort study*. *Lipids Health Dis*, 2020. **19**(1): p. 229.
131. Mirr, M., et al., *Newly proposed insulin resistance indexes called TyG-NC and TyG-NHtR show efficacy in diagnosing the metabolic syndrome*. *J Endocrinol Invest*, 2021. **44**(12): p. 2831-2843.
132. Khamseh, M.E., et al., *Triglyceride Glucose Index and Related Parameters (Triglyceride Glucose-Body Mass Index and Triglyceride Glucose-Waist Circumference) Identify Nonalcoholic Fatty Liver and Liver Fibrosis in Individuals with Overweight/Obesity*. *Metab Syndr Relat Disord*, 2021. **19**(3): p. 167-173.
133. Chauhan, A., A. Singhal, and P. Goyal, *TG/HDL Ratio: A marker for insulin resistance and atherosclerosis in prediabetics or not?* *J Family Med Prim Care*, 2021. **10**(10): p. 3700-3705.
134. Ocampo, A., et al., *Assessment of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 and Versican gene expression profile from the cumulus cells: association with better in vitro fertilization outcomes*. *J Ovarian Res*, 2018. **11**(1): p. 84.
135. Albertini, D.F., et al., *Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development*. *Reproduction*, 2001. **121**: p. 647 - 653.
136. Gilchrist, R.B., M. Lane, and J.G. Thompson, *Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality*. *Hum Reprod Update*, 2008. **14**(2): p. 159-77.
137. Sutton-McDowall, M.L., R.B. Gilchrist, and J.G. Thompson, *The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence*. *Reproduction*, 2010. **139**(4): p. 685-95.
138. Schulte, M.M., J.H. Tsai, and K.H. Moley, *Obesity and PCOS: the effect of metabolic derangements on endometrial receptivity at the time of implantation*. *Reprod Sci*, 2015. **22**(1): p. 6-14.
139. Gosman, G.G., H.I. Katcher, and R.S. Legro, *Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction*. *Hum Reprod Update*, 2006. **12**(5): p. 585-601.
140. Fornes, R., et al., *Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia*. *Mol Med*, 2010. **16**(3-4): p. 129-36.
141. Gupta, M.B., et al., *IUGR Is Associated With Marked Hyperphosphorylation of Decidual and Maternal Plasma IGFBP-1*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019. **104**(2): p. 408-422.
142. Xue, Z., et al., *Research Progress on the Mechanism Between Polycystic Ovary Syndrome and Abnormal Endometrium*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 788772.
143. Piltonen, T.T., *Polycystic ovary syndrome: Endometrial markers*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016. **37**: p. 66-79.
144. Patel, B.G., et al., *Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017. **96**(6): p. 623-632.
145. Srivastava, S., et al., *Immune Modulatory Effects of Ketogenic Diet in Different Disease Conditions*. *Immuno*, 2023. **3**(1): p. 1-15.
146. Tummon, I., et al., *Polycystic ovaries and ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic review**. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2005. **84**(7): p. 611-6.

147. Coussa, A., H.A. Hasan, and T.M. Barber, *Effects of in vitro fertilization (IVF) therapies on metabolic, endocrine and inflammatory status in IVF-conceived pregnancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 2020. **93**(6): p. 705-712.
148. Korytkowski, M.T., et al., *Metabolic Effects of Oral Contraceptives in Women with Polycystic Ovary Syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1995. **80**(11): p. 3327 - 3334.
149. Kamat, B.R., et al., *Expression of Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor by Human Granulosa and Theca Lutein Cells Role in Corpus Luteum Development*. American Journal of Pathology, 1995. **146**: p. 157 - 165.
150. Rizk, B., et al., *The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome*. Human Reproduction Update, 1997. **3**(3): p. 255 - 266.

11. Anexos

Anexo 1: Artículos publicados

Palafox-Gómez C, Ortiz G, Madrazo I, López-Bayghen E. Adding a ketogenic dietary intervention to IVF treatment in patients with polycystic ovary syndrome improves implantation and pregnancy. *Reprod Toxicol.* 2023 Aug;119:108420. doi: 10.1016/j.reprotox.2023.108420. Epub 2023 Jun 7. PMID: 37290496.

Reproductive Toxicology 119 (2023) 108420



Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox



Adding a ketogenic dietary intervention to IVF treatment in patients with polycystic ovary syndrome improves implantation and pregnancy



Cecilia Palafox-Gómez^a, Ginna Ortiz^b, Iván Madrazo^b, Esther López-Bayghen^{a,*}

^a Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), México City 07360, Mexico

^b Investigación Clínica, Instituto de Infertilidad y Genética México SC, INGENES, México City 05320, Mexico

ARTICLE INFO

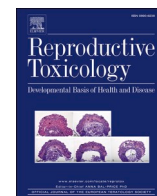
Handling Editor: Alberto Mantovani

Keywords:

Assisted reproduction
Endometrial growth
Insulin resistance
Ketogenic diet
Metabolic syndrome
PCOS

ABSTRACT

Patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) on a high-carbohydrate diet intrinsically suffer from exacerbated glucotoxicity, insulin resistance (IR), and infertility. Lowering the carbohydrate content has improved fertility in patients with IR and PCOS; however, the effects of a well-controlled ketogenic diet on IR and fertility in PCOS patients undergoing in vitro fertilization (IVF) have not been reported. Twelve PCOS patients with a previous failed IVF cycle and positive for IR (HOMA1-IR > 1.96) were retrospectively evaluated. Patients followed a ketogenic diet (50 g of total carbohydrates/1800 calories/day). Ketosis was considered when urinary concentrations were > 40 mg/dL. Once ketosis was achieved, and IR diminished, patients underwent another IVF cycle. The nutritional intervention lasted for 14 ± 11 weeks. Carbohydrate consumption decreased from 208 ± 50.5 g/day to 41.71 ± 10.1 g/day, which resulted in significant weight loss (-7.9 ± 1.1 kg). Urine ketones appeared in most patients within 13.4 ± 8.1 days. In addition, there was a decrease in fasting glucose (-11.4 ± 3.5 mg/dl), triglycerides (-43.8 ± 11.6 mg/dl), fasting insulin (-11.6 ± 3.7 mIU/mL), and HOMA-IR (-3.28 ± 1.27). All patients underwent ovarian stimulation, and compared to the previous cycle, there was no difference in oocyte number, fertilization rate, and viable embryos produced. However, there was a significant improvement in the implantation (83.3 vs. 8.3 %), clinical pregnancy (66.7 vs. 0 %), and ongoing pregnancy/live birth rates (66.7 vs. 0 %). Here, restriction in carbohydrate consumption in PCOS patients induced ketosis, improved key metabolic parameters, and decreased IR. Even though this did not affect oocyte or embryo quality or quantity, the subsequent IVF cycle significantly improved embryo implantation and pregnancy rates.



Adding a ketogenic dietary intervention to IVF treatment in patients with polycystic ovary syndrome improves implantation and pregnancy

Cecilia Palafox-Gómez^a, Ginna Ortiz^b, Iván Madrazo^b, Esther López-Bayghen^{a,*}

^a Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), México City 07360, Mexico

^b Investigación Clínica, Instituto de Infertilidad y Genética México SC, INGENES, México City 05320, Mexico

ARTICLE INFO

Handling Editor: Alberto Mantovani

Keywords:

Assisted reproduction
Endometrial growth
Insulin resistance
Ketogenic diet
Metabolic syndrome
PCOS

ABSTRACT

Patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) on a high-carbohydrate diet intrinsically suffer from exacerbated glucotoxicity, insulin resistance (IR), and infertility. Lowering the carbohydrate content has improved fertility in patients with IR and PCOS; however, the effects of a well-controlled ketogenic diet on IR and fertility in PCOS patients undergoing in vitro fertilization (IVF) have not been reported. Twelve PCOS patients with a previous failed IVF cycle and positive for IR (HOMA1-IR > 1.96) were retrospectively evaluated. Patients followed a ketogenic diet (50 g of total carbohydrates/1800 calories/day). Ketosis was considered when urinary concentrations were > 40 mg/dL. Once ketosis was achieved, and IR diminished, patients underwent another IVF cycle. The nutritional intervention lasted for 14 ± 11 weeks. Carbohydrate consumption decreased from 208 ± 50.5 g/day to 41.71 ± 10.1 g/day, which resulted in significant weight loss (−7.9 ± 1.1 kg). Urine ketones appeared in most patients within 13.4 ± 8.1 days. In addition, there was a decrease in fasting glucose (−11.4 ± 3.5 mg/dl), triglycerides (−43.8 ± 11.6 mg/dl), fasting insulin (−11.6 ± 3.7 mIU/mL), and HOMA-IR (−3.28 ± 1.27). All patients underwent ovarian stimulation, and compared to the previous cycle, there was no difference in oocyte number, fertilization rate, and viable embryos produced. However, there was a significant improvement in the implantation (83.3 vs. 8.3 %), clinical pregnancy (66.7 vs. 0 %), and ongoing pregnancy/live birth rates (66.7 vs. 0 %). Here, restriction in carbohydrate consumption in PCOS patients induced ketosis, improved key metabolic parameters, and decreased IR. Even though this did not affect oocyte or embryo quality or quantity, the subsequent IVF cycle significantly improved embryo implantation and pregnancy rates.

1. Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disorder that affects approximately 10 % of women of reproductive age, usually characterized by ovulatory dysfunction, hyperandrogenism, and polycystic ovarian morphology [1]. At reproductive age, the most concerning problem in PCOS is infertility, leading to the use of artificial reproduction technologies. Typically, in vitro fertilization (IVF) results in a large number of immature oocytes, low embryo quality, reoccurring miscarriages, and a higher incidence of Ovarian Hyperstimulation Syndrome when compared with non-PCOS patients of the same age [2]. PCOS innately predisposes women to reproductive complications. Regrettably, obesity affects fertility among all women, but lower pregnancy rates were observed in obese PCOS patients when compared to non-obese PCOS patients [3,4]. This demonstrates a metabolic component for PCOS patients concerning fertility.

Like many other degenerative diseases, PCOS is aggravated by a high-carbohydrate diet [5]. The Western diet is carbohydrate-based, with frequent eating and excessive food intake, making it high-glycemic and high-insulinemic [6]. Significant components of the Western diet are sugar, processed foods, and high-caloric beverages. Therefore, constant exposure to and consumption of sugar-sweetened foods are favored, as these foods are readily available, cheap, and continuously advertised [6]. Excessive glucose exposure is related to the development of different pathologies. In addition, high and constant exposure to glucose can produce toxic effects, a phenomenon known as glucotoxicity. High-carbohydrate diets promote insulin resistance (IR) by supplying high glucose levels and reducing antioxidant activity. Consistently elevated serum glucose levels result in the decreased ability of pancreatic β-cells to secrete insulin. Due to the low production of antioxidative enzymes in pancreatic islet cells, oxidative stress has been associated with glucotoxicity [7]. Lower carbohydrate diets were shown

* Corresponding author.

E-mail address: ebayghen@cinvestav.mx (E. López-Bayghen).

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108420>

Received 20 February 2023; Received in revised form 11 May 2023; Accepted 4 June 2023

Available online 7 June 2023

0890-6238/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

to promote antioxidant activity (see the reviews by Kawahito et al. or by Lopez-Acosta et al. [7,8]). Hyperinsulinemia and IR result from glucotoxicity; both affect the ovarian environment and IVF success [9]. Thus, it is within reason that restricting glucose exposure via diet modifications should improve reproductive outcomes for PCOS patients [10].

In this study, PCOS patients undergoing IVF maintained a nutritional intervention focused on controlling glucose load (quantity, frequency, time of exposure) to reduce glucose toxicity. As a result, parameters for IR and metabolic syndrome were compared pre-and post-intervention. Patients who showed improvement underwent a subsequent IVF cycle, in which embryo implantation and clinical pregnancy were assessed.

2. Materials and methods

2.1. Selection of the participants

Patients were recruited from the Ingenes Institute in Mexico City for this retrospective study. At the Ingenes Institute, patients with overweight or obesity are advised to consider a nutritional intervention after the first failed IVF cycle. In consultation with a licensed nutritionist, the patients select a potential diet. From 32 possible files, 12 patients with known PCOS, complete data for IVF cycles, and who chose and followed a documented ketogenic diet were considered for this study. Inclusion criteria were 1) a confirmed diagnosis of PCOS according to Rotterdam Criteria (at least two of three conditions: a) clinical signs of hyperandrogenism, b) oligo/amenorrhea or amenorrhea, and c) polycystic ovaries confirmed by ultrasound), 2) with IR (HOMA-IR > 1.96 as determined using <https://amhigo.com/mi-diagnostico/calculadoras/indice-de-resistencia-a-la-insulina-homa-ir>), and 3) a failed previous controlled ovarian stimulation and IVF cycle. Exclusion criteria included patients who did not present criteria to diagnose PCOS or IR or had a previous diagnosis of another endocrine pathology, such as thyroid disease, hyperprolactinemia, Cushing syndrome, congenital adrenal hyperplasia, Type 1 or Type 2 Diabetes Mellitus. In addition, only data from patients who agreed to participate and signed a general informed consent were considered in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Ethics Committee of the Ingenes Institute (approval number: ISF181219).

2.2. Nutritional intervention

Patients received nutritional education (zoom interviews, educational videos, and written guides) focused on controlling the glucose load. The purpose was to teach them to avoid ultra-processed foods, starches, juices, certain fruits, bread, sweets, sugared beverages, and carbohydrate-rich food (rice, beans, tortilla, and legumes), as well as to avoid snacking. Instead, the patients were told to focus on consuming whole natural foods, emphasizing protein content, by encouraging the patients to eat eggs, red meat, poultry, and fish, at least twice daily. In addition, patients were instructed to follow a ketogenic diet (1800–2000 calories/day), consisting of daily consumption of ≤ 50 g of total carbohydrates (around 15%), 1.5 g of protein per kilogram of body weight (25%), and the remainder with fat ($\geq 60\%$) [11]. To record adherence to the diet, the patients auto-registered all food consumption (before and during nutritional intervention) and reported it to the nutritionist. Then, using the MyFitnessPal app, the nutritionist confirmed the daily and weekly macronutrients consumed, correcting diet macronutrient distribution when needed. In addition, all patients were followed daily via direct messaging for ongoing counseling about the general guidelines of the nutritional intervention, inquiring about food consumption, any doubts about their diet, physical or mental changes, or symptoms. In the daily communication, the patients were explicitly and specifically asked about stomach upset, tiredness, light cramps, and headaches. In addition, patients were encouraged to measure and report body weight and waist circumference for follow-up changes at least once a week. The duration of the intervention varied depending on the patient's needs and

the clinician's opinion. For example, patient food intake and macronutrient composition are presented as [supplement information \(Supplement Fig. 1\)](#).

2.3. Outcome measures

Patients auto-monitored urine, before and during the nutritional intervention, to quantify the presence of ketones, measured at least twice a week (6–8 times) with Ketone Test Strips (Medicon, China). Values > 40 mg/dL were considered positive. No severe adverse effects, such as fast-severe weight loss or a sudden loss in blood pressure, were recorded. However, patients were explicitly asked if they developed an upset stomach, constipation, tiredness, dizziness, cramps, and headaches. When presented with these effects ($n = 5$, only one each), they resolved within 12 h after being told to rehydrate. Before the ketogenic diet and at the end of the intervention (before the beginning of the next controlled ovarian stimulation and IVF), patients underwent laboratory assessment at an external facility. All patients in the study had initial and final laboratory tests for fasting glucose, fasting insulin, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). In addition, while sitting for at least 5 min, the patient's systolic and diastolic blood pressures were determined using an automated blood pressure monitor with an appropriate size cuff. Metabolic Syndrome (MetS) was diagnosed according to the Harmonizing definition for Metabolic Syndrome using criteria for Mexican women: central obesity (waist circumference ≥ 80 cm), hypertriglyceridemia (triglycerides ≥ 150 mg/dL), dyslipidemia (HDL-C < 50 mg/dL), hypertension (systolic blood pressure ≥ 130 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 85 mmHg), and hyperglycemia (fasting glucose ≥ 100 mg/dL) [12]. The patient was considered to have MetS if they had at least 3 of 5 criteria.

2.4. IVF outcome measurements

All patients with intervention and reduced IR underwent a subsequent IVF cycle. Briefly, the patient's ovaries were stimulated for 10–14 days with gonadotrophin-releasing hormone agonists and antagonists. The ovarian response was assessed by measuring serum estradiol levels, and follicular development was evaluated by ultrasound examination every other day. Oocyte retrieval was conducted 36 h after the human chorionic gonadotropin (hCG) was administered (when at least six follicles reached > 12 mm). At the same time, the partner's semen was prepared by density gradient centrifugation. All retrieved oocytes were inseminated by intracytoplasmic sperm injection, and fertilization was judged by forming two pronuclei 19 h after insemination. Embryos were cultured in Global Total for Fertilization media (Cat # LGGT-30, Life Global) and incubated at 37°C in 8% CO_2 , 5% O_2 , and 87% N_2 . All information about the IVF process was monitored and recorded by an embryologist. The data collected were: antral follicle counts as determined by transvaginal ultrasound (defined as the total number of follicles measuring between 2 and 10 mm in diameter that were observed during the early follicular phase), the number of ova captured after harvesting, the number of retrieved MII oocytes, the fertilization rate, embryo quality, the number of embryos reaching Day 5 blastocyst stage, serum β -hCG, and endometrial thickness per a standardized protocol. Embryo implantation was confirmed on Day 14 by testing serum β -hCG (> 10 mIU/mL was considered positive). Clinical pregnancy was confirmed by the presence of a fetal heartbeat using ultrasound at 6–8 weeks. Pregnancies were followed to collect data about deliveries.

2.5. Statistical analyses

All analyses were carried out with the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS, v. 26.0, Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism (v5.00 GraphPad Software, Boston, MA, USA). A Paired *t*-test was used to compare the pre-and post-intervention differences between continuous variables. In addition, the implantation, clinical pregnancy,

and live birth rates were analyzed using McNemar's test. P-values < 0.05 (two-tailed) were considered statistically significant. Data are represented as the mean \pm the standard error of the mean unless stated otherwise.

3. Results

Of the 32 patients identified with PCOS between 2020 and 2022, who had at least one altered parameter of MetS and were positive for IR, 12 patients followed the instructions for the nutritional intervention and completed a second IVF cycle. Initially, 41.7 % were obese, and the remainder were overweight (Table 1); none were normal weight. Ten patients had PCOS as the only cause of infertility; three were more than 38 years old (range 22–40 years). The most common components for MetS were abdominal obesity (Fig. 1, panels A and B) and hypertriglyceridemia (Fig. 1C), with two patients with hyperglycemia (Fig. 1D). All patients presented with normal blood pressure before and after the intervention.

Most patients consumed a high-carbohydrate diet of over 200 g/day (199–289 g/day, Fig. 2A). Due to the study design, there was 100 % compliance with the diet. Once the patients followed the intervention, the carbohydrate component ranged between 32 and 58 g/day once the patient followed the intervention (about 18 % of caloric intake, Fig. 2B). As a result, 83.3 % of the cohort went into ketosis within two weeks (Fig. 2C). Once ketosis was achieved, there was a significant improvement in certain metabolic parameters (Table 1). For waist circumference, 83.3 % of the cohort showed a modest decrease, with one patient (P6) having an increase in waist circumference and one patient (P3) having no change (Fig. 1A). Nonetheless, all patients showed a significant decrease in weight (Fig. 1B). For triglycerides, 83.3 % of the cohort showed decreased serum concentrations, and two patients (P3 and P10) had increased levels (Fig. 1C). However, 75.0 % of the cohort showed a modest decrease in fasting glucose, with three patients (P4, P11, P12) having elevated serum glucose concentrations after intervention but less than 99 mg/dL (11 patients, Fig. 1D). Interestingly, none of the patients presented with increased values (compared to baseline) in two or more metabolic categories. Overall, fasting insulin (−0.53-fold change) and IR (−0.59-fold change) significantly decreased ($p < 0.05$, Table 1). Individually, 91.6 % of the cohort presented with lower fasting insulin concentrations (Figs. 1E), and for IR, 61.5 % of the cohort improved within the normal range (HOMA-IR < 1.96, Fig. 3A). This resulted in 58.3 % of the cohort improving in at least one criterion for MetS and 16.7 % of the cohort increasing the number of MetS criteria (Fig. 3B).

Compared to the patient's previous cycle, there was no improvement in the antral follicular count, the number of oocytes collected, the number of MII oocytes collected, and the fertilization rates (Table 2).

Table 1
Changes in patient characteristics along the nutritional intervention.

Parameter	Initial	Final	P-value ^a
Waist circumference (cm)	94.6 \pm 3.6	86.3 \pm 3.4	<0.001*
Weight (kg)	74.6 \pm 3.9	66.7 \pm 3.5	<0.001*
BMI (kg/m ²)	30.8 \pm 1.7	27.5 \pm 1.4	<0.001*
Obesity (%)	41.7	25.0	0.480
Overweight (%)	58.3	41.7	0.683
Normal weight (%)	0.0	33.3	0.134
Serum triglycerides (mg/dl)	171.8 \pm 22.6	128.1 \pm 18.8	0.003*
Fasting glucose (mg/dl)	95.6 \pm 4.7	84.1 \pm 3.2	0.007*
HDL-C (mg/dl)	46.4 \pm 2.9	44.6 \pm 2.8	0.546
Fasting insulin (mIU/mL)	22.0 \pm 4.6	10.4 \pm 2.1	0.009*
HOMA-IR	5.6 \pm 1.6	2.3 \pm 0.6	0.025*
Age (years)	33.2 \pm 1.6 (22–40)		

Abbreviations: BMI: body mass index; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance. Values are presented as percentages or average \pm standard error of the mean. A p-value was calculated using either Paired t-test or the McNemar test. A significant difference ($p < 0.05$) is indicated with *.

Concerning the embryos produced, there was no difference in the fragmentation, growth rate (Day 3 and Day 5), and embryo quality (Tables 2 and 3). Interestingly, the endometrial thickness increased from 6.8 \pm 1.2–8.6 \pm 0.8 mm (difference: 2.1 \pm 1.2), with 75 % of the cases showing some improvement (Table 3). In addition, 83.3 % of the transfers resulted in embryo implantation (positive serum β -hCG), with 66.7 % achieving clinical pregnancy (fetal heartbeat from at least one sac), 8.3 % having an ongoing pregnancy (at least one structurally healthy fetus), and 58.3 % resulting in a live birth (Tables 3 and 4). Considering the previous IVF cycle, after the nutritional intervention, the embryo implantation, the clinical pregnancy, and the ongoing pregnancy/live birth rates significantly improved (Table 4). Furthermore, all deliveries were healthy from birth with no developmental problems (Table 5).

4. Discussion

Here, we demonstrate that a ketogenic diet reduces exposure to glucose (glucotoxicity) and IR in patients with PCOS. Furthermore, even though the nutritional intervention did not affect oocyte production or embryo quality, the nutritional intervention did improve endometrium thickness as well as the embryo implantation rate, the clinical pregnancy rate, and the live birth rate.

Weight reduction therapies have shown improvement in IR in patients with PCOS [13,14] and restricting calorie intake decreased weight, IR, and fasting glucose [15]. Moreover, Porchia et al. demonstrated that a hypocaloric diet's effectiveness depends on the protein content at the expense of the carbohydrate content [16]. Therefore, a ketogenic diet was expected to promote weight loss and improve IR. Indeed, all patients presented with a reduction in weight and lower HOMA-IR scores. Weight loss was associated with lower abdominal obesity, as measured by waist circumference, suggesting that the diet affected visceral and subcutaneous fat [17]. Interestingly, visceral fat is more associated with IR in women than subcutaneous fat [18]. Therefore, it is questionable that visceral fat reduction was primarily related to improved IR. Future studies must measure visceral and subcutaneous fat more accurately to confirm this. Nevertheless, this does posit that using different ketogenic diets could improve IR. In addition, alternative dietary patterns using specific macro- and micro-nutrient compositions could specifically reduce visceral fat.

Once carbohydrates are drastically reduced, potentially due to a hypocaloric diet or ketogenic diet, hyperinsulinemia is reduced [19]. Due to the lowering in available glucose absorbed, the number of events and severity of insulin secretion is diminished. All patients observed that serum insulin levels decreased after the nutritional intervention. This supports the argument that improving insulin sensitivity and eventually reducing IR are consequences of reduced carbohydrate consumption. Furthermore, ketones in urine are proof of the *de novo* conversion of fatty acids into β -hydroxybutyrate, which signals that adipocytes are now in a lipolytic state [17,20]. For women, visceral fat is more associated with IR [21,22] and the waist reduction observed here aligns with less visceral fat, leading to less inflammation [23,24]. Therefore, it is posited that a well-controlled ketogenic diet will substantially decrease inflammatory parameters.

Ovarian tissues are affected by IR. High insulin levels cause the ovaries to produce testosterone and impair ovulation [25,26]. The ketogenic diet was expected to improve ovarian parameters; however, that was not the case. Compared to the previous cycle, there was no significant improvement in the antral follicle counts, the number of MII oocytes, and the fertilization rates; moreover, there was no effect on the assessed morphological quality of the produced embryos. Not seeing changes in the number of oocytes/embryos is not necessarily harmful; quantity depends on ovarian reserve and response to ovarian stimulation [27]. Also, not all metabolic abnormalities were corrected; while serum triglycerides and fasting glucose improved significantly, HDL-C remained unaffected by the intervention. Elevated serum triglycerides

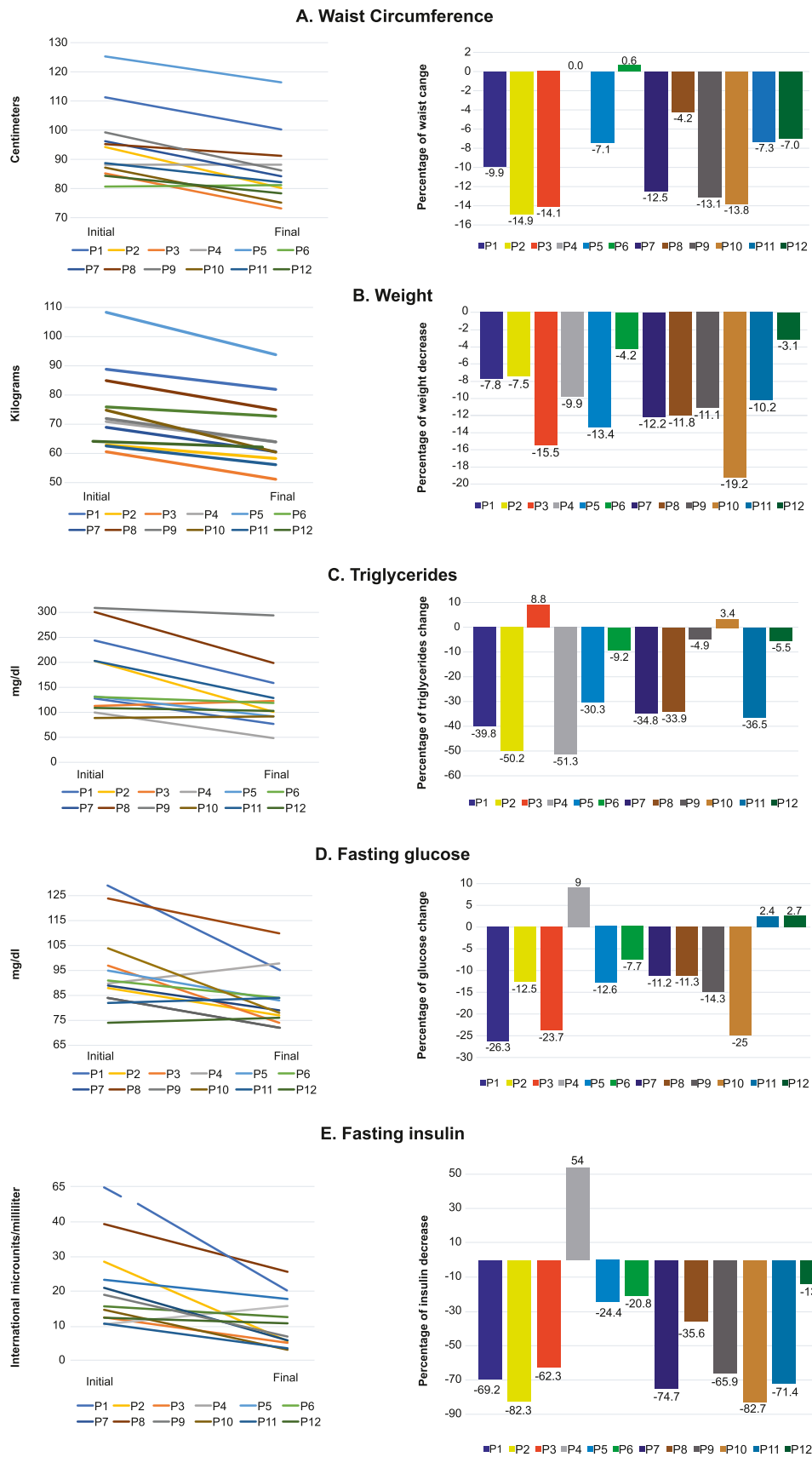


Fig. 1. Anthropometric and biochemical parameters in each patient before and after following the nutritional intervention. Initial and final values are shown (left column), as well as the percent of change (right column) of each panel for waist circumference (A) and body weight (B), as triglycerides (C), fasting glucose (D), and fasting insulin (E).

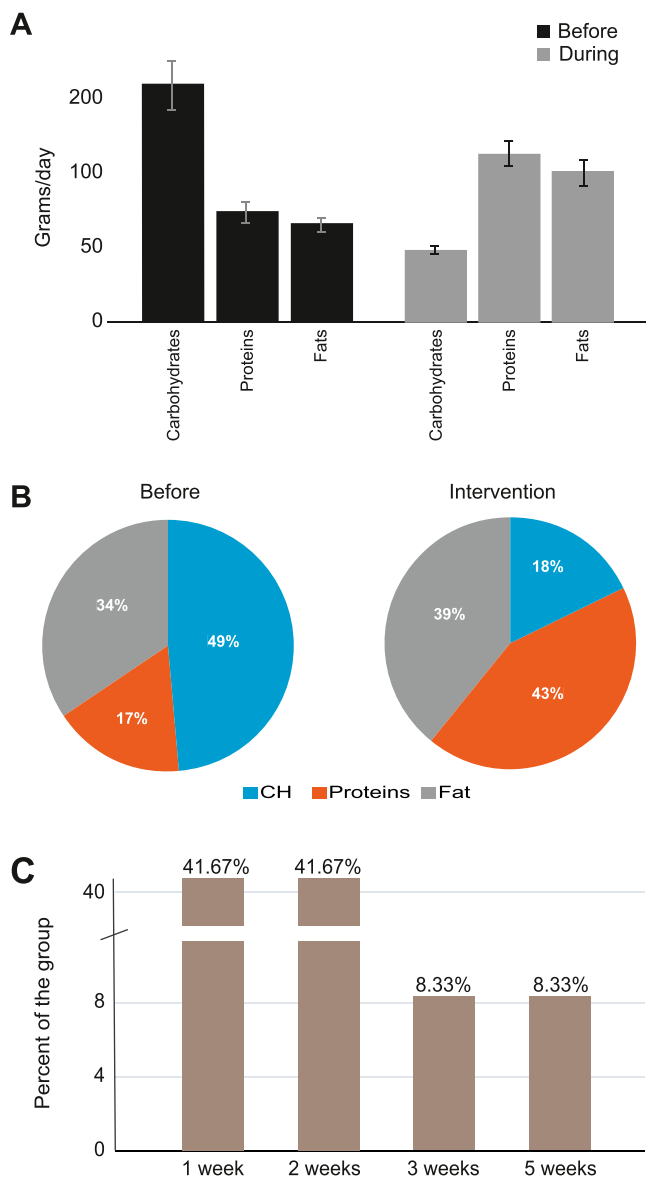


Fig. 2. Dietary assessment before and during the nutritional intervention. A. Average macronutrient intake before (black) and during (gray) the nutritional intervention. Each bar is the mean value \pm SEM for the 12 included patients. B. The average proportion of macronutrient consumption before (left) and during (right) the nutritional intervention. C. Time of entering into nutritional ketosis. Urine acetoacetate $>$ 40 mg/dL was considered positive.

with minimal lowering of HDL-C levels are associated with loss of ovarian function [28]. Therefore, the notion remains that not all metabolic abnormalities were corrected.

Concerning endometrium, hyperinsulinemia and IR were shown to affect embryo implantation and early pregnancy loss [29,30]. Furthermore, specific metabolic disorders and IR affect the receptivity of the endometrium [29,31]. Therefore, it is posited that improving the metabolic profile or reducing IR would increase the endometrium's receptivity. Compared to the patient's previous cycle, the endometrium thickness increased in almost all the patients, and the embryo implantation rate significantly improved, which we believe is associated with reduced IR. As pointed out by Chen et al., IR is a significant risk factor for early miscarriages [25], resulting in the loss of clinical pregnancy. Here, the clinical pregnancy rate significantly improved, suggesting the ketogenic diet reduced IR, allowing the endometrium to become more hospitable for embryo implantation and development, contributing to a

high rate of newborns [32]. The potential mechanisms for a ketogenic diet's effect on uterine health remain elusive; however, it is postulated that many factors could be involved. For example, in the endometrium of patients with PCOS, Fornes et al. found that patients with hyperinsulinemia lack some of the insulin receptor substrates, which disrupts glucose metabolism in the endometrium and impairs endometrial receptivity [33]. In addition, insulin inhibits the production of IGFBP-1, a biomarker of decidualization, suggesting that hyperinsulinemia can affect the normal function of the endometrium, leading to failed embryo implantation and an increased abortion rate [34]. Here, the ketogenic diet reduced serum insulin levels as well as IR. This should then lead to, potentially, correcting the decidualization process, increasing implantation and successful pregnancy, which was observed (Table 5). Alternatively, endometrium development and receptivity are dependent on many hormones [35,36]. Ketogenic diets are known to reduce acyclic production of estrogens from adipose tissue in androgenic-excess patients as well as reducing dehydroepiandrosterone sulfate blood levels while improving total and free testosterone, LH/FSH ratio, estradiol, and sex hormone binding globulin [13,37]. In addition, IR and hyperandrogenism causes endometrial inflammation and stimulate reactive oxygen species, impairing receptivity [38]. The endometrial inflammation environment triggered by IR may lead to progesterone resistance as a cause of endometrial dysfunction, infertility, and pregnancy complications in patients with PCOS [39]. Ketogenic diets were shown to reduce markers for inflammation as well as reactive oxygen species [13, 40, 41]. Subsequently, potential mechanisms that led to the ketogenic diet-induced improvement of the endometrium could involve a better glucose metabolism, a modified hormone profile that supports embryo implantation, and reduced inflammation and reactive oxygen species. Nevertheless, with respect to our results, we speculated that the endometrium improved due to reducing the severity of IR. We suggested that a low carbohydrate diet could be continued throughout the pregnancy as long as no complications from the diet intervention occurred.

This study has a few limitations. First, this was a retrospective study in which the participants took a nutritional intervention for reasons other than IR and PCOS. Therefore, a future prospective study should be performed, controlling for certain confounding factors. Second, the participants were instructed to achieve ketosis by reducing carbohydrate intake. Even with the instructions and the videos the participants watched, the dietary patterns could differ for each participant; moreover, only macronutrients were evaluated. Certain micronutrients were shown to affect IR. For example, chromium, zinc, magnesium, thiamine, and vitamin D deficiencies decreased IR [42,43]. If the cause of infertility is associated with IR, then the monitoring and augmenting of the consumption of these micronutrients as well as the ideal dietary pattern needs to be investigated. Third, the cohort consisted of patients undergoing IVF for PCOS-caused infertility. Other causes of infertility could benefit from a ketogenic diet when IR is suspected. Fourth, the duration of the intervention could have been optimized. The patients were initially told to maintain the diet until biochemical pregnancy was confirmed and adjust to a moderate carbohydrate diet during pregnancy to avoid complications. Fourth, the ovarian stimulation occurred when IR decreased (assessed by HOMA-IR) by at least 25% or was normalized, which differed for each patient. We cannot confirm if this was the optimal time for the patient to continue with IVF. Fifth, the patient's age varied between 22 and 40 years old. Age has been shown to increase infertility and decrease endometrium thickness by affecting the hormones in normal women [44]; however, Mellembakken et al. demonstrated that for patients with PCOS, the hormonal imbalance is minimally affected due to age when compared with infertile eumenorrheic women [45]. This would suggest that our results are resilient to age-induced effects; however, future studies are required to confirm this. Lastly, the sample size in this pilot study is small and lacks a control group. The effects of PCOS on IR and infertility are well documented, and after one round of IVF, the potential improvement from just IVF is minimal for these patients. Therefore, comparing to the patient's

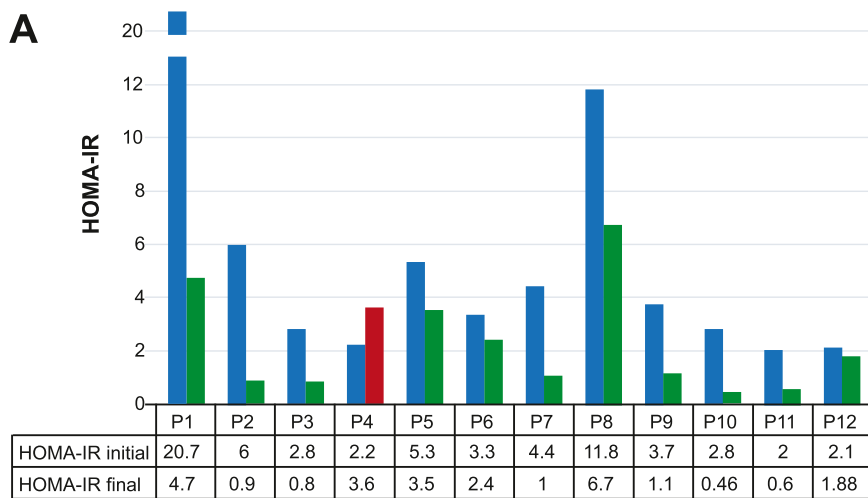


Fig. 3. The nutritional intervention reduced insulin resistance (IR) and improved Metabolic Syndrome (MetS). A. IR was determined using the HOMA-IR index (<https://amhigo.com/mi-diagnostico/calculadoras/indice-de-resistencia-a-la-insulina-homa-ir>) for each patient before (blue bars) and at the end of the nutritional intervention (green bars = decrease and red bars = increase). A HOMA-IR score > 1.96 was considered positive for IR. B. Using the Harmonizing Definition for MetS, the number of criteria was determined before (blue bars) and after (green bars = decrease, red bars = increase, white bars = no change) the intervention. Three or more criteria were considered positive for MetS. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

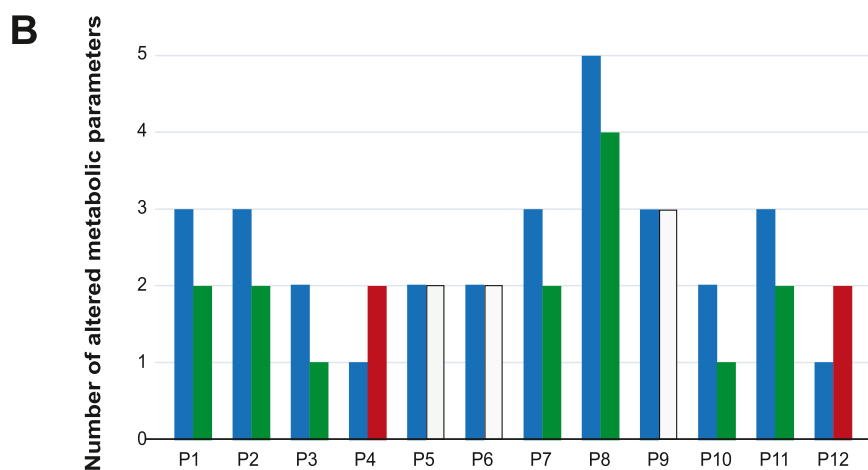


Table 2
The effect of a ketogenic diet on ovarian, endometrial, and embryo parameters, comparing the previous cycle with the cycle after the nutritional intervention.

Category	Previous	Current	p-value ^a
<i>Ovarian parameters</i>			
Antral Follicle Count (n)	24.5 ± 3.18	22.22 ± 4.4	0.962
Oocytes collected (n)	20.4 ± 2.3	21.2 ± 2.7	0.822
MII oocytes (n)	12.2 ± 2.8	13.4 ± 3.5	0.789
Fertilization rate (%)	64.5 ± 3.2	65.0 ± 4.8	0.933
<i>Embryo parameters</i>			
Number for transfer	4.5 ± 0.7	5.4 ± 0.7	0.384
Age (Days)	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.2	0.414
<i>Endometrial parameters</i>			
Endometrial thickness (mm)	6.8 ± 1.2	8.6 ± 0.8	0.277

Abbreviations: MII: Metaphase II.

Values are average and standard error of the mean.

^a p-value was calculated using Paired t-test.

previous cycle is acceptable with this study design, minimizing confounding factors, which allows us to use a small sample size. Nevertheless, the study provides a foundation for future studies.

5. Conclusion

Here, in PCOS patients, a ketogenic diet improved waist circumference, serum triglycerides, and fasting glucose concentrations with a reduction in the patient’s IR. In addition, after the nutritional intervention, when compared to the previous IVF cycle, endometrium

thickness, as well as the embryo implantation rate, the clinical pregnancy rate, and the live birth rate also improved in the following cycle.

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all participants. The principles of the Declaration of Helsinki conducted all procedures. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Ingenes Institute (approval number: ISF181219).

Consent for publication

Written informed consent was obtained from the patient for scientific activities, including the publication of this report.

CRediT authorship contribution statement

CPG contributed to the study design, the acquisition, analysis, and interpretation of the data. ELB interpreted the data and drafted and reviewed the manuscript. IM and GO were the clinicians in charge of patient care and data accuracy. All authors revised and provided final approval of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

Table 3
Reproductive results after nutritional treatment.

Pt ID	Obstetric result		EMT (mm)				Ova source/ # Collected Ova	Sperm source	Fertilization rate	Frozen embryo	Embryo Quality (stage/ICM quality + trophectoderm quality) ^b	# Embryos transferred	β-hCG (mIU/mL)	# Gest. sacs
	Result	Week	Pre	Post	Diff.	>7 ^a								
1	Not Pregnant	N/A	9.7	8.0	-1.7	+	Patient/12	Partner	58.3	No	9/0, 6/5 (Day 3)	2	1.2	0
2	Miscarriage	2 + 2	3.0	4.8	1.8	-	Patient/22	Partner	59.1	Yes	BE, BC	2	407.0	0
3	Miscarriage	1 + 4	4.6	7.7	3.1	+	Patient/29	Partner	82.8	Yes	AC, BC	2	226.2	0
4	Live Birth	38 + 2	8.1	6.0	-2.1	-	Donor/25	Partner	52.0	Yes	BE, BC	2	506.0	2
5	Live Birth	42 + 5	5.2	10.0	4.8	+	Patient/17	Partner	58.8	No	BE	3	231.0	1
6	Live Birth	35 + 5	2.9	13.2	10.3	+	Patient/16	Partner	56.3	Yes	BC	3	316.0	2
7	Live Birth	39 + 4	16.0	12.0	-4.0	+	Patient/15	Partner	73.3	Yes	BE, BC	2	172.0	1
8	Live Birth	36 + 3	7.0	11.1	4.1	+	Patient/17	Partner	29.4	No	BC	3	62.0	1
9	Live Birth	41 + 1	4.7	7.9	3.2	+	Donor/16	Partner	93.8	Yes	BE, BC	2	327.4	1
10	Live Birth	37	3.1	4.5	1.4	-	Donor/16	Partner	68.8	Yes	BE, BC	2	90.9	1
11	Not Pregnant	N/A	5.0	12.0	7.0	+	Patient/23	Partner	93.8	No	AC, BB, BC	2	0.1	0
12	Ongoing	22	12.1	8.3	-3.8	+	Patient/46	Partner	98.8	Yes	AC, BB, BC	3	408.1	2

Abbreviations: Gest: gestational; ICM: Inner Cell Mass; N/A: not applicable.

^a > 7: (+) The endometrium thickness was ≥ 7 mm with a trilaminar image at the transfer for the second cycle. (-) The endometrium thickness was < 7 mm.

^b Unless stated otherwise, embryos were transferred on Day 5 (embryo age).

Table 4
Comparison of outcomes between the current and the previous cycle.

Category	Previous Cycle	Current Cycle	p-value ^a
Cycle implantation rate (%)	8.3 (1/12)	83.3 (10/12)	0.008*
Clinical pregnancy rate (%)	0.0 (0/12)	66.7 (8/12)	0.013*
Live birth rate (%)	0.0 (0/12)	58.3 (7/12)	0.023*
Ongoing pregnancy/live birth rate (%)	0.0 (0/12)	66.7 (8/12)	0.013*

a p-value was calculated using the McNemar test. A significant difference is indicated with an *.

Table 5
Live birth results.

Pt ID	Gestational week	Birth weight (g)	Height (cm)	Gender
P4	38 + 2	2054 ^a / 2057 ^a	43 / 44	Male/Female
P5	42 + 5	3039	50.3	Male
P6	35 + 5	2100 ^a / 1900 ^b	45 / 45	Male/Female
P7	39 + 4	2950	50	Male
P8	36 + 3	NR	NR	Male
P9	41 + 1	3250	48	Male
P10	37	2690	47	Female

Abbreviations: NR: not recorded.

^a Low birth weight is considered normal in twins.

^b Low birth weight.

the work reported in this paper.

Data availability

Data supporting the conclusions are included in the article.

Acknowledgements

We express our gratitude to the study participants and the medical staff at the Ingenes Institute. We thank Andrea Ruiz Rodríguez, Abril Romero, and Yuvika Reyes for their aid in data collection and Dr. Leticia Ramírez-Martínez's help on technical issues. Thanks to Dr. Leonardo M. Porchia and Dinorah Hernández-Melchor for the critical reading of the manuscript. Finally, the authors would like to thank the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, México

(CONAHCYT); the National Council of Science and Technology of México (CONACYT) for the scholarship to CPG (number 756245). This research received no specific grant from funding agencies in the commercial or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.reprotox.2023.108420](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108420).

References

- [1] R. Deswal, V. Narwal, A. Dang, C.S. Pundir, The prevalence of polycystic ovary syndrome: a brief systematic review, *J. Hum. Reprod. Sci.* 13 (4) (2020) 261–271.
- [2] P. Kumar, N. Nawani, N. Malhotra, J. Malhotra, M. Patil, K. Jayakrishnan, S. Kar, P. R. Jirge, N. Mahajan, Assisted reproduction in polycystic ovarian disease: a multicentric trial in India, *J. Hum. Reprod. Sci.* 6 (1) (2013) 49–53.
- [3] K. Tziomalos, K. Dinas, Obesity and outcome of assisted reproduction in patients with polycystic ovary syndrome, *Front. Endocrinol.* 9 (2018) 149.
- [4] A.P. Bailey, L.K. Hawkins, S.A. Missmer, K.F. Correia, E.H. Yanushpolsky, Effect of body mass index on in vitro fertilization outcomes in women with polycystic ovary syndrome, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 211 (2) (2014) 163.e1–163.e6.
- [5] F. Shahdadian, R. Ghiasvand, B. Abbasi, A. Feizi, P. Saneei, Z. Shahshahan, Association between major dietary patterns and polycystic ovary syndrome: evidence from a case-control study, *Appl. Physiol., Nutr., Metab. Physiol. Appl., Nutr. Et. Metab.* 44 (1) (2019) 52–58.
- [6] W. Kopp, How Western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases, *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 12 (2019) 2221–2236.
- [7] S. Kawahito, H. Kitahata, S. Oshita, Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress, *World J. Gastroenterol.* 15 (33) (2009) 4137–4142.
- [8] O. Lopez-Acosta, A. Ruiz-Ramirez, M.A. Barrios-Maya, J. Alarcon-Aguilar, J. Alarcon-Enos, C.L.C. Acuna, M. El-Hafidi, Lipotoxicity, glucotoxicity and some strategies to protect vascular smooth muscle cell against proliferative phenotype in metabolic syndrome, *Food Chem. Toxicol.* 172 (2023).
- [9] F. Hassani, S. Oryan, P. Eftekhari-Yazdi, M. Bazrgar, A. Moini, N. Nasiri, A. Ghaheri, Association between the number of retrieved mature oocytes and insulin resistance or sensitivity in infertile women with polycystic ovary syndrome, *Int. J. Fertil. Steril.* 12 (4) (2019) 310–315.
- [10] H. Maryam, G. Reza, F. Awat, A. Gholamreza, Dietary patterns and Ovulatory infertility: a case-control study, *J. Nutr. Sci. Diet.* 3 (1) (2017).
- [11] S.J. Hallberg, A.L. McKenzie, P.T. Williams, N.H. Bhanpuri, A.L. Peters, W. W. Campbell, T.L. Hazbun, B.M. Volk, J.P. McCarter, S.D. Phinney, J.S. Volek, Effectiveness and safety of a novel care model for the management of type 2 diabetes at 1 year: an open-label, non-randomized, controlled study, *Diabetes Ther. Res., Treat. Educ. Diabetes Relat. Disord.* 9 (2) (2018) 583–612.
- [12] K.G. Alberti, R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, J.I. Cleeman, K.A. Donato, J. C. Fruchart, W.P. James, C.M. Loria, S.C. Smith Jr., International Diabetes Federation Task Force on, Prevention, L. Hational Heart, I. Blood, A. American Heart, F. World Heart, S. International Atherosclerosis, O. International Association for the Study of, Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim

- statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity, *Circulation* 120 (16) (2009) 1640–1645.
- [13] A. Paoli, L. Mancini, M.C. Giacona, A. Bianco, M. Caprio, Effects of a ketogenic diet in overweight women with polycystic ovary syndrome, *J. Transl. Med.* 18 (1) (2020) 104.
- [14] R.K. Patten, R.A. Boyle, T. Moholdt, I. Kiel, W.G. Hopkins, C.L. Harrison, N. K. Stepto, Exercise interventions in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis, *Front. Physiol.* 11 (2020) 606.
- [15] S. Mei, J. Ding, K. Wang, Z. Ni, J. Yu, Mediterranean diet combined with a low-carbohydrate dietary pattern in the treatment of overweight polycystic ovary syndrome patients, *Front. Nutr.* 9 (2022), 876620.
- [16] L.M. Porchia, S.C. Hernandez-Garcia, M.E. Gonzalez-Mejia, E. López-Bayghen, Diets with lower carbohydrate concentrations improve insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis, *Eur. J. Obstet., Gynecol., Reprod. Biol.* 248 (2020) 110–117.
- [17] Y. Gu, H. Yu, Y. Li, X. Ma, J. Lu, W. Yu, Y. Xiao, Y. Bao, W. Jia, Beneficial effects of an 8-week, very low carbohydrate diet intervention on obese subjects, *Evid. Based Complement. Altern. Med. eCAM* 2013 (2013), 760804.
- [18] S. Sandeep, K. Gokulakrishnan, K. Velmurugan, M. Deepa, V. Mohan, Visceral & subcutaneous abdominal fat in relation to insulin resistance & metabolic syndrome in non-diabetic south Indians, *Indian J. Med. Res.* 131 (5) (2010) 629–635.
- [19] M.J. Skytte, A. Samkani, A.D. Petersen, M.N. Thomsen, A. Astrup, E. Chabanova, J. Frystyk, J.J. Holst, H.S. Thomsen, S. Madsbad, T.M. Larsen, S.B. Haugaard, T. Krarup, A carbohydrate-reduced high-protein diet improves HbA(1c) and liver fat content in weight stable participants with type 2 diabetes: a randomised controlled trial, *Diabetologia* 62 (11) (2019) 2066–2078.
- [20] H. Kolb, K. Kempf, M. Rohling, M. Lenzen-Schulte, N.C. Schloot, S. Martin, Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel, *BMC Med.* 19 (1) (2021) 313.
- [21] H. Huang, X. Zheng, X. Wen, J. Zhong, Y. Zhou, L. Xu, Visceral fat correlates with insulin secretion and sensitivity independent of BMI and subcutaneous fat in Chinese with type 2 diabetes, *Front. Endocrinol.* 14 (2023), 1144834.
- [22] R. de Mutsert, K. Gast, R. Widya, E. de Koning, I. Jazet, H. Lamb, S. le Cessie, A. de Roos, J. Smit, F. Rosendaal, M. den Heijer, Associations of abdominal subcutaneous and visceral fat with insulin resistance and secretion differ between men and women: the Netherlands Epidemiology of Obesity Study, *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 16 (1) (2018) 54–63.
- [23] U. Durmus, C. Duran, S. Ecirli, Visceral adiposity index levels in overweight and/or obese, and non-obese patients with polycystic ovary syndrome and its relationship with metabolic and inflammatory parameters, *J. Endocrinol. Investig.* 40 (5) (2017) 487–497.
- [24] S. Castro-Barquero, R. Casas, E.B. Rimm, A. Tresserra-Rimbau, D. Romaguera, J. A. Martinez, J. Salas-Salvado, M.A. Martinez-Gonzalez, J. Vidal, M. Ruiz-Canela, J. Koniczna, E. Sacanella, J.F. Garcia-Gavilan, M. Fito, A. Garcia-Arellano, R. Estruch, Loss of visceral fat is associated with a reduction in inflammatory status in patients with metabolic syndrome, *Mol. Nutr. Food Res.* 67 (4) (2023), e2200264.
- [25] Y. Chen, J. Guo, Q. Zhang, C. Zhang, Insulin resistance is a risk factor for early miscarriage and macrosomia in patients with polycystic ovary syndrome from the first embryo transfer cycle: a retrospective cohort study, *Front. Endocrinol.* 13 (2022), 853473.
- [26] E. Diamanti-Kandarakis, A. Dunaif, Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications, *Endocr. Rev.* 33 (6) (2012) 981–1030.
- [27] M.F. Verberg, M.J. Eijkemans, N.S. Macklon, E.M. Heijnen, E.B. Baart, F. P. Hohmann, B.C. Fauser, F.J. Broekmans, The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis, *Hum. Reprod. Update* 15 (1) (2009) 5–12.
- [28] E.A. Knauff, H.E. Westerveld, A.J. Goverde, M.J. Eijkemans, O. Valkenburg, E. J. van Santbrink, B.C. Fauser, Y.T. van der Schouw, Lipid profile of women with premature ovarian failure, *Menopause* 15 (5) (2008) 919–923.
- [29] C. Wang, Y.X. Wen, Q.Y. Mai, Impact of metabolic disorders on endometrial receptivity in patients with polycystic ovary syndrome, *Exp. Ther. Med.* 23 (3) (2022) 221.
- [30] W.Y. Cai, X. Luo, H.Y. Lv, K.Y. Fu, J. Xu, Insulin resistance in women with recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis, *BMC Pregnancy Childbirth* 22 (1) (2022) 916.
- [31] X. Bai, L. Zheng, D. Li, Y. Xu, Research progress of endometrial receptivity in patients with polycystic ovary syndrome: a systematic review, *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 19 (1) (2021) 122.
- [32] N. Roos, H. Kieler, L. Sahlin, G. Ekman-Ordeberg, H. Falconer, O. Stephansson, Risk of adverse pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: population based cohort study, *BMJ* 343 (2011) d6309.
- [33] R. Fornes, P. Ormazabal, C. Rosas, F. Gabler, D. Vantman, C. Romero, M. Vega, Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia, *Mol. Med.* 16 (3–4) (2010) 129–136.
- [34] M.B. Gupta, M. Abu Shehab, K. Nygard, K. Biggar, S.S. Singal, N. Santoro, T. L. Powell, T. Jansson, IUGR is associated with marked hyperphosphorylation of decidual and maternal plasma IGFBP-1, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104 (2) (2019) 408–422.
- [35] R.J. Paulson, Hormonal induction of endometrial receptivity, *Fertil. Steril.* 96 (3) (2011) 530–535.
- [36] D.A. Gibson, I. Simitsidellis, O. Kelepouri, H.O.D. Critchley, P.T.K. Saunders, Dehydroepiandrosterone enhances decidualization in women of advanced reproductive age, *Fertil. Steril.* 109 (4) (2018) 728–734, e2.
- [37] R.I. Cincione, F. Losavio, F. Ciolli, A. Valenzano, G. Cibelli, G. Messina, R. Polito, Effects of mixed of a ketogenic diet in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (23) (2021).
- [38] Z. Xue, J. Li, J. Feng, H. Han, J. Zhao, J. Zhang, Y. Han, X. Wu, Y. Zhang, Research progress on the mechanism between polycystic ovary syndrome and abnormal endometrium, *Front. Physiol.* 12 (2021), 788772.
- [39] B.G. Patel, M. Rudnicki, J. Yu, Y. Shu, R.N. Taylor, Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 96 (6) (2017) 623–632.
- [40] H.S. Rhyu, S.Y. Cho, H.T. Roh, The effects of ketogenic diet on oxidative stress and antioxidative capacity markers of Taekwondo athletes, *J. Exerc. Rehabil.* 10 (6) (2014) 362–366.
- [41] S. Srivastava, V.A. Pawar, A. Tyagi, K.P. Sharma, V. Kumar, S.K. Shukla, Immune modulatory effects of ketogenic diet in different disease conditions, *Immuno* 3 (1) (2023) 1–15.
- [42] C.E. Ekpenyong, Micronutrient deficiency, a novel nutritional risk factor for insulin resistance and Syndrom X, *Arch. Food Nutr. Sci.* 2 (1) (2018) 016–030.
- [43] P. Dubey, V. Thakur, M. Chattopadhyay, Role of minerals and trace elements in diabetes and insulin resistance, *Nutrients* 12 (6) (2020).
- [44] W. Amir, B. Micha, H. Ariel, L.G. Liat, D. Jehoshua, S. Adrian, Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology, *Fertil. Steril.* 87 (4) (2007) 799–804.
- [45] J.R. Mellembakken, S.L. Berga, M. Kilen, T.G. Tanbo, T. Abyholm, P. Fedorcsak, Sustained fertility from 22 to 41 years of age in women with polycystic ovarian syndrome, *Hum. Reprod.* 26 (9) (2011) 2499–2504.

Hernández-Melchor D, Palafox-Gómez C, Madrazo I, Ortiz G, Padilla-Viveros A, López-Bayghen E. Surgical and nutritional interventions for endometrial receptivity: A case report and review of literature. *World J Clin Cases*. 2022 Nov 26;10(33):12295-12304. doi: 10.12998/wjcc.v10.i33.12295. PMID: 36483831; PMCID: PMC9724549.



[World J Clin Cases](#). 2022 Nov 26; 10(33): 12295–12304.

PMCID: PMC9724549

Published online 2022 Nov 26. doi: [10.12998/wjcc.v10.i33.12295](https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i33.12295)

PMID: [36483831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36483831/)

Surgical and nutritional interventions for endometrial receptivity: A case report and review of literature

[Dinorah Hernández-Melchor](#), [Cecilia Palafox-Gómez](#), [Ivan Madrazo](#), [Ginna Ortiz](#), [America Padilla-Viveros](#), and [Esther López-Bayghen](#)

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

Abstract

[Go to: ►](#)

BACKGROUND

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disease that combines metabolic, reproductive, and psychological dysfunctions. Ovulation disorders and impaired endometrial receptivity in PCOS can cause infertility. Insulin resistance (IR) is a pathological state of inadequate response to insulin that affects reproduction in PCOS, as damage caused by IR at the endometrial level becomes an obstacle for embryo implantation. Reversing IR resulted in spontaneous pregnancies in PCOS patients, indicating that metabolic corrections improve endometrial dysfunctions. Mesenchymal stem-cell treatment has also corrected endometrial quality and lead to pregnancies in patients with Asherman's syndrome. We propose a combination of nutritional intervention with the surgical placement of stem cells to improve endometrial quality to achieve pregnancy in a PCOS patient undergoing *in vitro* fertilization (IVF) treatment.



Surgical and nutritional interventions for endometrial receptivity: A case report and review of literature

Dinorah Hernández-Melchor, Cecilia Palafox-Gómez, Ivan Madrazo, Ginna Ortiz, America Padilla-Viveros, Esther López-Bayghen

Specialty type: Reproductive biology

Provenance and peer review:

Unsolicited article; Externally peer reviewed.

Peer-review model: Single blind

Peer-review report's scientific quality classification

Grade A (Excellent): 0

Grade B (Very good): B

Grade C (Good): C

Grade D (Fair): 0

Grade E (Poor): 0

P-Reviewer: Elfayoumy KN, Egypt; Shuang W, China

Received: June 20, 2022

Peer-review started: June 20, 2022

First decision: August 4, 2022

Revised: August 16, 2022

Accepted: October 17, 2022

Article in press: October 17, 2022

Published online: November 26, 2022



Dinorah Hernández-Melchor, America Padilla-Viveros, Science, Technology and Society Program, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México City 07360, CDMX, México

Dinorah Hernández-Melchor, Clinical Research, Instituto Regenera SC, México City 05320, CDMX, México

Cecilia Palafox-Gómez, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México City 07360, CDMX, México

Ivan Madrazo, Ginna Ortiz, Investigación Clínica, Instituto de Infertilidad y Genética México SC, INGENES, México City 05320, CDMX, México

Esther López-Bayghen, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México City 07360, CDMX, México

Corresponding author: Esther López-Bayghen, MSc, PhD, Academic Research, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, México City 07360, CDMX, México. cbayghen@cinvestav.mx

Abstract

BACKGROUND

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disease that combines metabolic, reproductive, and psychological dysfunctions. Ovulation disorders and impaired endometrial receptivity in PCOS can cause infertility. Insulin resistance (IR) is a pathological state of inadequate response to insulin that affects reproduction in PCOS, as damage caused by IR at the endometrial level becomes an obstacle for embryo implantation. Reversing IR resulted in spontaneous pregnancies in PCOS patients, indicating that metabolic corrections improve endometrial dysfunctions. Mesenchymal stem-cell treatment has also corrected endometrial quality and lead to pregnancies in patients with Asherman's syndrome. We propose a combination of nutritional intervention with the surgical placement of stem cells to improve endometrial quality to achieve pregnancy in a PCOS patient undergoing *in vitro* fertilization (IVF) treatment.

CASE SUMMARY

After two failed IVF cycles, a metabolic intervention, consisting of a ketogenic diet

with daily consumption of 50 g of carbohydrates (CH), was indicated until pregnancy. Metabolic Syndrome was assessed using the Harmonizing Definition (3 of 5 pathologies: Central obesity, hypertension, hyperglycemia, hypertriglyceridemia, and dyslipidemia), and the Homeostatic Model Assessment of IR (HOMA-IR) was used to measure the level of IR. Once IR improved, endometrial quality improved. However, two day 5-thawed embryos (euploid, donated oocyte-partner's sperm) failed to implant, suggesting endometrial quality improvement was insufficient. Therefore, transmyometrial implantation of mesenchymal stem cells from the stromal vascular fraction of adipose tissue was performed to enrich the endometrial stem cell niche. Minimal endometrial mean thickness for embryo transfer (6.9 mm) was achieved three months after stem cell treatment and continuous dietary control of IR. Two euploid-day 5-thawed embryos (donated oocyte-partner's sperm) were transferred, and embryo implantation was confirmed on day 14 by β -hCG serum levels. Currently, a 37 wk baby girl is born.

CONCLUSION

In PCOS, endometrial quality can be improved by combining nutrient-based metabolic correction with endometrial stem cell niche enrichment.

Key Words: Polycystic ovarian syndrome; Insulin resistance; Nutritional intervention; Endometrial quality; Stem cell treatment; Case report

©The Author(s) 2022. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core Tip: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disease that causes infertility due to ovulation disorders and impaired endometrial receptivity related to a pathological state of insulin resistance (IR). To date, endometrial dysfunctions are the rate-limiting factor for pregnancy in PCOS patients using *in vitro* fertilization. Here, an overweight PCOS patient with euploid embryos available for transfer achieved pregnancy only after a continuous nutritional intervention to correct IR and metabolic parameters and the enrichment of endometrial stem cell niche with mesenchymal stem cells from adipose tissue. In this case, endometrial thickness and receptivity were improved with a combination of nutritional and surgical interventions to achieve pregnancy.

Citation: Hernández-Melchor D, Palafox-Gómez C, Madrazo I, Ortiz G, Padilla-Viveros A, López-Bayghen E. Surgical and nutritional interventions for endometrial receptivity: A case report and review of literature. *World J Clin Cases* 2022; 10(33): 12295-12304

URL: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v10/i33/12295.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v10.i33.12295>

INTRODUCTION

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complicated endocrine disease that combines metabolic, reproductive, and psychological dysfunctions. Ovulation disorders are causes of PCOS-related infertility[1]. In addition, alterations in the ability of the endometrium to accept an implanting embryo and a blastocyst's entry (endometrial receptivity) are critical factors of PCOS-related infertility[2,3]. Numerous studies have proved that hormonal disturbances and metabolic changes in PCOS patients could influence endometrial receptivity[4,5]. Insulin resistance (IR) refers to the complicated pathological state of inadequate insulin action. During *in vitro* fertilization (IVF) with oocytes from IR-PCOS patients, embryo development and quality were not affected after *in vitro* culture; however, the pregnancy rate for these patients was significantly reduced, suggesting that one of influences of decreased success is caused by compromised endometrium function due to IR-associated damage[6,7]. Some treatments to correct ovulatory issues in PCOS, which resulted in reversing IR, lead to a surge of spontaneous pregnancies[8]; however, these treatments are not well explored in combination with IVF. Moreover, little attention has been paid to the exact changes in the endometrium after metabolic correction, even though the PCOS-endometrium effect may need more robust approaches to achieve implantation and pregnancy[9].

Stem cells are a powerful tool to respond to the needs of modern medicine, given their high potential in therapeutic applications[10]. Adipose tissue has become a convenient source for stem cell extraction after lipo-aspiration under local anesthesia, yielding significant quantities with a minimum invasive technique, low risk of morbidity, minimal discomfort, and almost zero chance for other possible complications[11]. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) have prolonged self-renewal

ability and the capability to differentiate into various mature somatic lineages[12]. In addition, ADMSC possesses neovascularization, immune-modulating, and anti-inflammatory properties[13]. The Stromal Vascular Fraction (SVF) is the minimum manipulated heterogeneous cell population isolated from the adipose tissue with comparable regenerative potential as cultured ADMSC. SVF contains ADMSC, endothelial precursors, T-regulatory and smooth muscle cells, macrophages, pericytes, and preadipocytes[14]. Endometrial mesenchymal stem cells (EnMSCs) are adult stem cells, similar to those found in other tissue. This endometrial niche can be colonized by autologous stem cells derived from different tissues[15]. In addition, stem cell transplantation can activate endogenous endometrial stem/progenitor cells inside the uterine cavity at the sub-endometrial zone in the junction between myometrium and endometrium. In patients with Asherman's syndrome, endometrial regeneration occurs as the EnMSCs can replace the functional layer[16], correcting the endometrium to achieve a clinical pregnancy[16,17]. Therefore, we propose a combination of a continuous nutritional intervention consisting of a well-designed ketogenic diet with daily consumption of 50 g of carbohydrates (CHO) to improve IR and the surgical placement of stem cells from SVF to improve endometrial quality and achieve pregnancy in a PCOS patient.

CASE PRESENTATION

Chief complaints

A 37-year-old woman attended the Ingenes institute in México city for secondary infertility with one previous abortion in 2008 at 11 wk of gestation.

History of present illness

The patient and her current partner had been trying to conceive a pregnancy for two years, with 1 previous attempt in which the embryo implanted but resulted in an early abortion. Her periods are normal, and she does not remember any problems with her cycle. The patient was diagnosed with PCOS according to Rotterdam criteria, presenting signs of clinical hyperandrogenism (acne and hirsutism) and the polycystic ovary phenotype, which was confirmed with ultrasound (30-40 follicles in each ovary). She was counseled for IVF.

History of past illness

There is no relevant history of past illness.

Personal and family history

The patient has had a previously failed pregnancy, which resulted in an early abortion, in 2008. Moreover, the patient had uterine synechiae in 2019, which was resolved by hysteroscopic adhesiolysis. She has no other medical history associated with reproduction and no history of alcohol or drug abuse. There was no significant history reported by the partner. Lastly, there was no relevant family history of reproductive complications.

Physical examination

Upon physical examination, the patient did not present any concerning symptoms. The patient's initial body-mass index (BMI) was 29.24 kg/m². The anthropometric parameters are shown in [Table 1](#). Due to the patient's weight and BMI, it was postulated that the patient has Metabolic Syndrome (MetS). Her waist circumference was elevated (> 80 cm for female Latinas) [18]. She was overweight and had at least one criteria of Metabolic Syndrome, according to the harmonizing definition.

Laboratory examinations

Laboratory examinations were performed to assess the patient's metabolic status with respect to the MetS harmonized definition[18]. On initial evaluation, the patient's fasting plasma glucose suggests that she is at risk for prediabetes. Two of five criteria were abnormal for MetS (waist circumference and fasting plasma glucose); systolic and diastolic blood pressure, tryglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were normal. Values are presented as Biochemical parameters in [Table 1](#).

Imaging examinations

Due to the patient's previous abortion and uterine synechiae, a sonohysterography was performed. There were no uterine synechiae or other issues associated with the uterus. However, more than 30 follicles on each ovary were detected by ultrasound (PCOS criteria).

Table 1 Cycles and interventions for the case

Categories	First cycle	Second cycle	Third cycle	Fourth cycle
Nutritional intervention	None	Caloric restriction ^a	Ketogenic diet ^b	Ketogenic diet ^c
Stem cell treatment	None	None	None	Live cells trans-myometrial injection
Anthropometric parameters (at the cycle starting point)				
Age (years)	37 (2019)	38 (2020)	39 (2021)	40 (2021)
Weight (kg)	73	69	59	59
Waist circumference (cm)	81	73	65	65
BMI (kg/m ²)	29.24	27.64	23.63	23.63
Blood pressure (mmHg)	120/80	120/78	119/80	111/74
Biochemical parameters				
Fasting glucose (mg/dL)	104	102	86	78
Urine ketones (mg/dL)	-	Negative	40-80	50
Insulin (U/mL)	-	13.89	3.20	2.4
HOMA-IR	-	2.95	0.67	0.46
Insulin resistance	-	Yes	Corrected	Corrected
Triglycerides (mg/dL)	-	89	92	82
HDL-Cholesterol (mg/dL)	-	58	62	71
IVF parameters				
Ova source	Patient	Patient	Donor	Donor
Ova collected	26	15	Not applicable	Not applicable
Own embryos frozen (day), quality	7 (day 5), BC	1 (day 5), BC 1 (day 6), BC	---	---
Endometrial intervention/treatment	None	Hysteroscopic evaluation and mild reactivation	Pentoxifylline E-Vitamin L-Arginine	Pentoxifylline E-Vitamin L-Arginine
Stem cells				
Endometrial thickness final size (mm)	3.6	4.3	5.9	6.9
Transferred thawed embryos and PGTA result	<i>n</i> = 2 Quality: BC Day 5: Euploid	<i>n</i> = 2 Quality: BC Day 5 and 6: Euploid	<i>n</i> = 2 Quality: AC and BC Day 5: Euploid	<i>n</i> = 2 Quality: AC and BC Day 5: Euploid
Transfer result	Failed	Failed	Failed	Success
β-hCG serum levels on day 14	Negative	Negative	Negative	Positive, 90.89 mUI/mL
Clinical pregnancy	-	-	-	One sac, 158 bpm week 18
Pregnancy outcome	-	-	-	Healthy baby girl, 37 wk, 2690 g; 47 cm; Apgar 9

^aStandard 1800 calorie-diet with 55% carbohydrate content.

^bNutritional intervention inducing ketosis with a maximal consumption of 50 g of carbohydrates/day (15% on an 1800 calorie diet).

^cNI controlling fasting glucose and urine ketones; carbohydrates/d: 50 g before the transfer, 100 g after embryo transfer, and 150 g during pregnancy.

MULTIDISCIPLINARY EXPERT CONSULTATION

There is no multidisciplinary expert consultation.

FINAL DIAGNOSIS

At the initial consultation, infertility associated with PCOS was diagnosed with IR.

TREATMENT

First IVF attempt

In 2019, the patient underwent standard controlled ovarian stimulation (Gonal 150 UI and Merapur 150 UI). The stimulus was prolonged until the diameter of the leading follicles was > 18 mm. Afterward, recombinant human chorionic gonadotropin was administered. After 36 h, the oocytes were retrieved with ultrasound guidance. All 14-18 mm follicles were aspirated. Ova was collected, fertilized by intracytoplasmic sperm injection with the partner's sperm, and then cultured. The yields and quality of embryos are depicted in [Table 1](#). Embryos were cryopreserved using the vitrification technique, thawed, and transferred after standard endometrial preparation. Two embryos were transferred. The endometrial mean thickness (EMT) was sub-optimal, and a thin endometrium was diagnosed (EMT = 3.6 mm). On day 14, there was no detectable amount of β -hCG.

Second IVF attempt

As the patient was overweight and following an unbalanced standard American 2000 calories diet with 45% CHO, 47% fat, and 7% protein content (direct food intake questionnaire), a caloric restriction diet (averaging a total of approximately 1800 calories) was advised with macronutrients adjustment to 55% CHO, 25% protein and 25% fat. This resulted in a 4-kg weight loss but not a BMI reduction to normal weight status. The standard controlled ovarian stimulation protocol was repeated as before. Hysteroscopy was performed because of the thin endometrium diagnosis (EMT=3.6 mm). Again, we ruled out synechiae and found a normal cervical channel, normal uterine cavity, and a visible and permeable ostium; no other abnormalities were found. Gentle endometrial reactivation was performed. Endometrial preparation was carried out using primogyn (estradiol valerate) with incremental dosing for 12 d (2 mg/d for four days, 4 mg/d for four days, and 6 mg/d for four days)[19]. Luteal phase support was carried out with utrogestan (300 mg/vaginal, three times a day). Two cryopreserved embryos were thawed and transferred. On day 14, there was no detectable amount of β -hCG.

Third attempt at IVF

Because the patient's initial BMI was 29.24 kg/m² and PCOS diagnosis, metabolic parameters were assessed ([Table 1](#)). Triglycerides and HDL-C were within the normal range. Fasting glucose was above the normal range, suggesting the patient was prediabetic. In addition, IR was calculated using HOMA-IR ([Table 1](#)). The patient had significant IR. A nutritional intervention was started to correct for IR, with a secondary goal to increase endometrium and ova quality. The patient was instructed to follow a ketogenic diet, which typical consists of 1800 calories/day, daily consumption of ≤ 50 g of total CHO (15% or less), 1.5 g of protein per kilogram of body weight (25% maximum), with the remainder being fat (approximately 60%). The patient auto-registered all food consumption in the MyFitnessPal app, and the dietician confirmed the macros every week, correcting them when needed. In addition, the patient received nutritional education (video) that focused on controlling the glucose load. The purpose was to teach food choices and avoid ultra-processed food, starches, juices, bread, sweets, sugared beverages, and CHO-rich food (rice, beans, tortilla, legumes). The patient was followed *via* electronic messaging every two to three days, inquiring about any doubts, symptoms, changes in weight, fasting glucose, ketone detection in urine, and counseling about the general guidelines. Before the start and during all nutritional interventions, the patient auto-monitored their urinary ketone levels using the Ketone Test Strips (acetoacetate), measuring at least twice a week with MUNDO-Keto reactive strips. Once, laboratory tests confirmation of improve IR and with the patient's approval, the physician and the specialist in Reproductive Medicine moved to ova donation. Donated oocytes were fertilized by ICSI with the partner's sperm, which produced four embryos (two day 5 and two day 6 embryos). Before all embryos were vitrified, Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies (PGT-A) was performed following a standardized protocol[20]. Endometrial preparation consisted of Primogyn (same as described before) while adding 400 mg of Pentoxifylline twice a day, 1 g of L-Arginine (vasodilator), and 1 g of Vitamin E daily (vascular and antioxidant effects), which improved the EMT ([Table 1](#)). Embryo transfer was performed with one embryo AC and one embryo BC. Both embryos failed to implant.

Fourth IVF attempt

Autologous mesenchymal stem cells in the SVF of adipose tissue were placed in the patient's uterine cavity to improve endometrial quality. Micro liposuction was performed to obtain 20 mL of abdominal fat. Adipose tissue was washed, mechanically disaggregated, and treated with collagenase type I to isolate SVF. A total of 6.27×10^7 live cells were isolated and transmyometrial injected. Changes in the

EMT were monitored for three months until an EMT of 6.9 mm was reached. Two Day 5, euploid-thawed embryos (from oocyte donor and partner's sperm) were transferred. The uterine transfers occurred during a controlled endometrial development cycle for frozen embryos, free of gonadotropin stimulation, but with the addition of Pentoxifylline, L-Arginine, and E-Vitamin (same as described before). The ketogenic intervention was sustained until pregnancy was achieved. Embryo implantation was determined on day 14 by serum β -hCG concentrations (>10 mUI/mL) and by the presence of a fetal heartbeat using ultrasound at six weeks (Table 1).

OUTCOME AND FOLLOW-UP

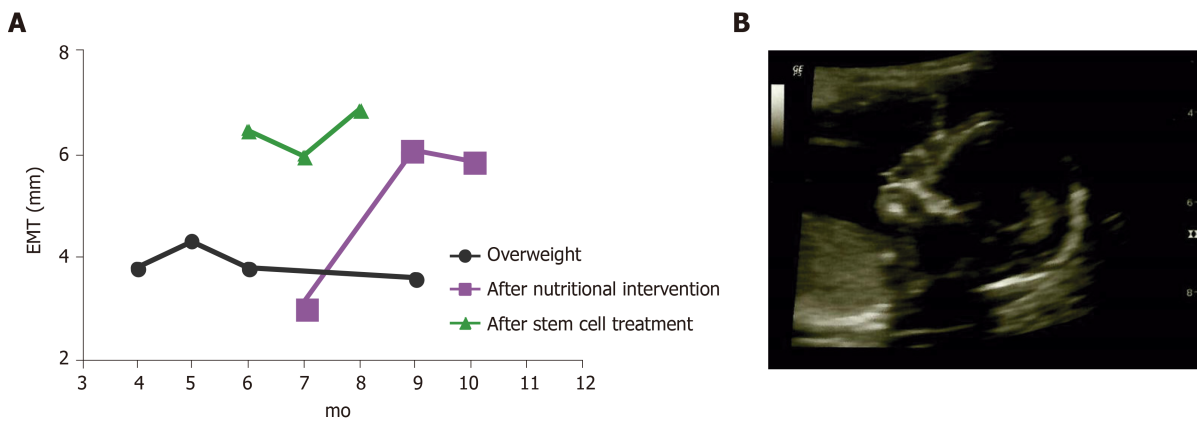
Table 1 depicts all results and details of the interventions during the four IVF cycles. After induction and maintenance of nutritional ketosis, IR was corrected. As a result, BMI decreased to 23.63 kg/m² and the final fasting glucose was 78 mg/dL. Figure 1A shows the changes in the EMT after the two major interventions: nutritional ketosis and endometrial regeneration. Pregnancy was finally achieved after a continuous dietary intervention, which resulted in metabolic normalization when complemented with endometrial reparation using mesenchymal stem cells and the transfer of euploid embryos from donated ova. One gestational sac with a fetal heartbeat was detected *via* the ultrasound at week 6. The gestational sac presented with 158 beats per minute, normal amniotic liquid, and the absence of ultrasound markers for chromosomopathies. No apparent structural alterations were detected at week 18 (Figure 1B). Metabolic control continued to avoid the risk of gestational diabetes with the proper caloric increase by trimester and 100 g - 150 g of CHO for daily consumption. Pregnancy resulted in the born of a healthy baby girl at 37 wk (2690 g; 47 cm; Apgar 9).

DISCUSSION

In a PCOS-related infertility case, a patient achieved pregnancy after combining interventions, specifically implementing a ketogenic diet, and improving the endometrium receptivity with mesenchymal stem cells. The most concerning problem with PCOS is infertility at the reproductive age, as this degenerative disease predisposes women to reproductive complications and possible infertility. Lower pregnancy rates are observed in obese PCOS compared to non-obese PCOS patients[21,22], demonstrating a crucial metabolic component for PCOS women concerning fertility. IR-PCOS patients develop sub-optimal oocytes, with fewer MII oocytes[23]. Moreover, IR-PCOS patients have lower pregnancy rates after IVF, even if oocyte development, embryo quality[7], or risk for embryonic aneuploidy was not affected[24], suggesting that the effects of IR on endometrial function and embryo implantation underlie the decreased pregnancy rates[7].

Evidence in adult women indicated that treatment of IR, either by lifestyle changes or pharmacological support, improves reproductive and metabolic abnormalities[25]. Thus, it was expected that the nutritional intervention would improve the reproduction potential of our PCOS patients. IR is mainly caused due to a constant glucose overload, leading to continuous hyperinsulinemia; therefore, restricting glucose exposure *via* dietary modifications should improve IR and reproductive outcomes for PCOS women[26]. Therefore, it is crucial to determine a subject's IR status before considering any intervention containing a diet. However, not all diet modifications are optimal for PCOS. Here, a low caloric diet with standard macro nutrients distribution improved weight but did not correct IR (Table 1). Diets with lower carbohydrate content are more likely to improve IR in PCOS women with severe IR[19, 27,28]. In this case, a diet modification with CHO limitation to a maximal daily consumption of 50 g successfully corrected IR and improved pregnancy chances. Even when Metformin is widely used for IR as an important insulin sensitizer, a recent meta-analysis shows that Metformin does not improve insulin sensitivity over hypocaloric diets in women with polycystic ovary syndrome[19]. When pre- and post-intervention values for fasting plasma glucose, fasting plasma insulin, and IR indices (HOMA-IR, ISI, and QUICKI) were compared, any benefit of using Metformin was already achieved when a diet intervention was implemented. This means that adding Metformin to hypocaloric diets did not improve serum glucose or insulin concentrations, or IR in PCOS women, but controlling the CHO intake does.

In PCOS patients, endometrial tissue function is altered due to abnormal glucose homeostasis and insulin action[29], presumably due to GLUT4 alterations. GLUT4 is the main glucose transporter in charge of glucose uptake at the cellular level, regulated by insulin through protein synthesis and translocation. Hyperinsulinemia and PCOS are conditions associated with decreased GLUT4 expression at the endometrial level[30]. Lifestyle modification (physical exercise and low CHO/high protein diet) improves glucose homeostasis in PCOS patients. Consequently, the endometrial function is restored due to GLUT4 down-regulation, resulting from the up-regulation of endometrial IRS1 and GLUT1[31]. In support of this, we show that a continuous and closely supervised nutritional intervention resulted in total correction in IR, complete normalization of metabolic parameters, and improved endometrial growth. Improving endometrial function may be a necessary approach for PCOS-related infertility[9], as for improving metabolic health was not enough to resolve the patient's reproductive issues. The uterine



DOI: 10.12998/wjcc.v10.i33.12295 Copyright ©The Author(s) 2022.

Figure 1 The endometrial mean thickness along with the two major interventions. A: Endometrial quality was assessed by determining the endometrial mean thickness, the physician performed measurements under ultrasonographic guidance; B: Current ultrasound at the time of submission of the single gestational sac due to treating the ketogenic diet with endometrium preparation with mesenchymal stem cells, the sonogram is at 16 wk after embryo transfer.

lining in our patient improved after the nutritional intervention (Figure 1), with the EMT consistently increasing above 6 mm. Nevertheless, considering past failed embryo transfers and lack of abnormalities in the uterine cavity, additional support for endometrial development and embryo implantation was explored. Generally, an endometrial thickness of 7 mm is the cut-off point for a “good endometrium, adequate for embryo transfer”, and a value below 6 mm may result in unfavorable IVF outcomes[32]. The endometrium is an exceptional tissue that monthly undergoes cyclic proliferation, differentiation, disintegration, shedding, and repair under hormonal command, going through approximately 450 regeneration cycles over women's reproductive lifetime[33]. Endometrium's regenerative ability is attributed to stem/progenitor cells residing in the basalis layer of the tissue[34]. EnMSCs exhibit immunomodulatory and anti-inflammatory functions[35]. It has been proposed that the endometrial niche can be colonized by autologous stem cells derived from other tissues when there is a lack of EnMSCs[15]. Colonizing improved endometrial quality in dysfunctional conditions in Asherman's syndrome[16,17] and refractory endometrium[11]. Sub-endometrial application of autologous ADMSC led to an endometrial thickness increase in 80% of patients, a pregnancy rate of 52%, and a live birth rate of 36%[11].

Three mechanisms of action have been proposed for stem cell therapy to improve endometrial quality in the injured uterus of murine models: (1) Stem cell engraftment followed by trans-differentiation; (2) Environment modulation through trophic factors; and (3) Angiogenesis promotion. First, mesenchymal stem cells are highly proliferative cells that can transdifferentiate into various non-hematopoietic cell types. This differentiation potential in transplanted bone marrow-derived stem cells allows stem cell engraftment in the uterus, then differentiation into an endometrial phenotype expressing vimentin and lacking CD45 expression[36]. Second, LIF and integrins are regulators of endometrial function, markers for endometrial receptivity, and essential proteins for embryo implantation. Expression of cytokeratin, vimentin, integrin $\alpha\gamma\beta 3$, and LIF significantly increased after bone marrow-derived stem cells were transplanted, mimicking levels found in normal conditions, suggesting that stem cell treatments improve endometrial thickness but also contribute to endometrial receptivity[37]. Last, human endometrial mesenchymal stem cells derived from menstrual blood (MenSCs) have been demonstrated to promote angiogenesis in treating an endometrial injury. Newly formed blood vessels were observed after MenSCs were transplanted *in vivo* under the control of the AKT and ERK signaling pathways, suggesting that revascularization and angiogenesis can improve the injured endometrium. Furthermore, this revascularization process allows paracrine signaling (cytokines and growth factors) to repair injured tissues[38]. SVF is a minimum manipulated heterogeneous cell pool containing ADMSC and is efficiently obtained *via* minimal liposuction. Its use has been extended and represents a convenient source for stem cells[39]. Considering its therapeutic potential, comparable to cultured ADSC[14], we propose a surgical intervention to implant SVF-containing stem cells into the patient's uterus to achieve minimal EMT for embryo transfer. Three months after stem cell treatment, endometrial thickness improved up to 6.9 mm, allowing successful embryo implantation and pregnancy. We assume that more than one of the proposed mechanisms for stem cell therapy helped in our case. The endometrium thickness was improved, and receptivity and paracrine signaling were boosted, allowing successful embryo implantation.

Our study has two significant limitations. First, the patient's advanced maternal age. The effect age has on the result presented here still needs to be investigated. Nevertheless, we demonstrate that for certain circumstances, the use of a ketogenic diet and stem cell treatment maybe required for even the transfer euploid embryos. Lastly, the quality of the SVF was not specifically measured, with respect to

the other components of the fluid. It is possible other components, such as endothelial precursors, macrophages, pericytes, and preadipocytes as well as the concentration of cytokine and adipokine, could improve or inhibit the effect present here.

CONCLUSION

We show that a continuous nutritional intervention resulted in correction of IR, normalization of metabolic parameters, and improved endometrial growth. Furthermore, stem cell treatment improved endometrial quality concerning endometrial thickness and receptivity. We conclude that correcting IR in PCOS patients may improve reproductive outcomes and stem cell treatment, using SVF, could become a handy intervention to improve endometrial receptivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to express our gratitude to this study's participant and the IVF and medical staff at Ingenes SC and Regenera SC. In addition, we would like to thank Dr. Leonardo M P for his critical reading of the manuscript.

FOOTNOTES

Author contributions: Hernández-Melchor D, Palafox-Gómez C, and López-Bayghen E conceived the project. Ortiz G and Madrazo I performed the surgical procedures; Hernández-Melchor D and Palafox-Gómez C performed clinical data acquisition while Ortiz G and Madrazo I handled the case as the clinicians, collecting information regarding the parental history and *in vitro* fertilization data. López-Bayghen E, Hernández-Melchor D, and Palafox-Gómez C analyzed the data. López-Bayghen E and Hernández-Melchor D drafted the article. America Padilla critically revised the manuscript; all authors have approved the final version of the manuscript.

Supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), No. 790971 (to Hernández-Melchor D), and No. 781208 to (to Palafox-Gómez C).

Informed consent statement: The patient and her partner provided written informed consent to participate in this study under the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from them for their anonymized information published in this article.

Conflict-of-interest statement: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

CARE Checklist (2016) statement: The authors have read the CARE Checklist (2016), and the manuscript was prepared and revised according to the CARE Checklist (2016).

Open-Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Country/Territory of origin: Mexico

ORCID number: Dinorah Hernández-Melchor 0000-0002-1577-7803; Cecilia Palafox-Gómez 0000-0002-7335-6740; Ivan Madrazo 0000-0001-6333-0398; Ginna Ortiz 0000-0002-7713-1004; America Padilla-Viveros 0000-0003-3438-4463; Esther López-Bayghen 0000-0002-2849-7587.

S-Editor: Xing YX

L-Editor: A

P-Editor: Xing YX

REFERENCES

- 1 Niño OMS, da Costa CS, Torres KM, Zanol JF, Freitas-Lima LC, Miranda-Alves L, Graceli JB. High-refined carbohydrate diet leads to polycystic ovary syndrome-like features and reduced ovarian reserve in female rats. *Toxicol Lett* 2020; **332**: 42-55 [PMID: 32629074 DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.07.002]
- 2 Bai X, Zheng L, Li D, Xu Y. Research progress of endometrial receptivity in patients with polycystic ovary syndrome: a

- systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2021; **19**: 122 [PMID: 34362377 DOI: 10.1186/s12958-021-00802-4]
- 3 **Lopes IM**, Baracat MC, Simões Mde J, Simões RS, Baracat EC, Soares JM Jr. Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2011; **57**: 702-709 [PMID: 22249553 DOI: 10.1590/s0104-42302011000600020]
 - 4 **Ejzenberg D**, Gomes TJO, Monteleone PAA, Serafini PC, Soares-Jr JM, Baracat EC. Prognostic factors for pregnancy after intrauterine insemination. *Int J Gynaecol Obstet* 2019; **147**: 65-72 [PMID: 31242330 DOI: 10.1002/ijgo.12898]
 - 5 **Giordano MV**, Giordano LA, Gomes RC, Simões RS, Nader HB, Giordano MG, Baracat EC, Soares Júnior JM. The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2015; **31**: 278-281 [PMID: 25434369 DOI: 10.3109/09513590.2014.989980]
 - 6 **Qi J**, Wang W, Zhu Q, He Y, Lu Y, Wang Y, Li X, Chen ZJ, Sun Y. Local Cortisol Elevation Contributes to Endometrial Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; **103**: 2457-2467 [PMID: 29618067 DOI: 10.1210/je.2017-02459]
 - 7 **Chang EM**, Han JE, Seok HH, Lee DR, Yoon TK, Lee WS. Insulin resistance does not affect early embryo development but lowers implantation rate in in vitro maturation-in vitro fertilization-embryo transfer cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; **79**: 93-99 [PMID: 23176069 DOI: 10.1111/cen.12099]
 - 8 **Liu Y**, Li J, Yan Z, Liu D, Ma J, Tong N. Improvement of Insulin Sensitivity Increases Pregnancy Rate in Infertile PCOS Women: A Systemic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; **12**: 657889 [PMID: 33859621 DOI: 10.3389/fendo.2021.657889]
 - 9 **Jiang NX**, Li XL. The Disorders of Endometrial Receptivity in PCOS and Its Mechanisms. *Reprod Sci* 2022; **29**: 2465-2476 [PMID: 34046867 DOI: 10.1007/s43032-021-00629-9]
 - 10 **Andrzejewska A**, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells* 2019; **37**: 855-864 [PMID: 30977255 DOI: 10.1002/stem.3016]
 - 11 **Sudoma I**, Pylyp L, Kremenska Y, Goncharova Y. Application of autologous adipose-derived stem cells for thin endometrium treatment in patients with failed ART programs. *J Stem Cell Ther Transplant* 2019; **3**: 1-8 [DOI: 10.29328/journal.jsctt.1001013]
 - 12 **Dominici M**, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315-317 [PMID: 16923606 DOI: 10.1080/14653240600855905]
 - 13 **Feist V**, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning* 2015; **8**: 149-162 [PMID: 26586955 DOI: 10.2147/SCCAA.S64373]
 - 14 **Nguyen A**, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, Paydar KZ, Evans GR, Widgerow AD. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016; **69**: 170-179 [PMID: 26565755 DOI: 10.1016/j.bjps.2015.10.015]
 - 15 **Ogawa R**. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; **1**: 13-20 [PMID: 18220849 DOI: 10.2174/157488806775269043]
 - 16 **Singh N**, Mohanty S, Seth T, Shankar M, Bhaskaran S, Dharmendra S. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy. *J Hum Reprod Sci* 2014; **7**: 93-98 [PMID: 25191021 DOI: 10.4103/0974-1208.138864]
 - 17 **Santamaria X**, Cabanillas S, Cervelló I, Arbona C, Raga F, Ferro J, Palmero J, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Hum Reprod* 2016; **31**: 1087-1096 [PMID: 27005892 DOI: 10.1093/humrep/dew042]
 - 18 **Alberti KG**, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; **120**: 1640-1645 [PMID: 19805654 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644]
 - 19 **Garcia-Hernandez SC**, Porchia LM, Pacheco-Soto BT, López-Bayghen E, Gonzalez-Mejia ME. Metformin does not improve insulin sensitivity over hypocaloric diets in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review of 12 studies. *Gynecol Endocrinol* 2021; **37**: 968-976 [PMID: 33899646 DOI: 10.1080/09513590.2021.1913114]
 - 20 **Schaeffer E**, López-Bayghen B, Neumann A, Porchia LM, Camacho R, Garrido E, Gómez R, Camargo F, López-Bayghen E. Whole Genome Amplification of Day 3 or Day 5 Human Embryos Biopsies Provides a Suitable DNA Template for PCR-Based Techniques for Genotyping, a Complement of Preimplantation Genetic Testing. *Biomed Res Int* 2017; **2017**: 1209158 [PMID: 28717645 DOI: 10.1155/2017/1209158]
 - 21 **Tziomalos K**, Dinas K. Obesity and Outcome of Assisted Reproduction in Patients With Polycystic Ovary Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; **9**: 149 [PMID: 29670581 DOI: 10.3389/fendo.2018.00149]
 - 22 **Bailey AP**, Hawkins LK, Missmer SA, Correia KF, Yanushpolsky EH. Effect of body mass index on in vitro fertilization outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2014; **211**: 163.e1-163.e6 [PMID: 24657792 DOI: 10.1016/j.ajog.2014.03.035]
 - 23 **Hassani F**, Oryan S, Eftekhari-Yazdi P, Bazrgar M, Moini A, Nasiri N, Ghaheeri A. Association between The Number of Retrieved Mature Oocytes and Insulin Resistance or Sensitivity in Infertile Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Fertil Steril* 2019; **12**: 310-315 [PMID: 30291692 DOI: 10.22074/ijfs.2019.5422]
 - 24 **Weghofer A**, Munne S, Chen S, Barad D, Gleicher N. Lack of association between polycystic ovary syndrome and embryonic aneuploidy. *Fertil Steril* 2007; **88**: 900-905 [PMID: 17433813 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.018]
 - 25 **Marshall JC**, Dunaif A. Should all women with PCOS be treated for insulin resistance? *Fertil Steril* 2012; **97**: 18-22 [PMID: 22192137 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.036]
 - 26 **Hajishafiee N**, Ghiasvand R, Feizi A, Askari G. Dietary patterns and ovulatory infertility: a case-control study. *Journal of Nutritional Sciences and Dietetics* 2017; **3** [DOI: 10.21203/rs.3.rs-19352/v1]

- 27 **Alwahab UA**, Pantalone KM, Burguera B. A ketogenic diet may restore fertility in women with polycystic ovary syndrome: a case series. *AAE Clin Case Rep* 2018; **4**: e427-e431 [DOI: [10.4158/accr-2018-0026](https://doi.org/10.4158/accr-2018-0026)]
- 28 **Mavropoulos JC**, Yancy WS, Hepburn J, Westman EC. The effects of a low-carbohydrate, ketogenic diet on the polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Nutr Metab (Lond)* 2005; **2**: 35 [PMID: [16359551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16359551/) DOI: [10.1186/1743-7075-2-35](https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-35)]
- 29 **Oróstica L**, Astorga I, Plaza-Parrochia F, Vera C, García V, Carvajal R, Gabler F, Romero C, Vega M. Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2016; **40**: 1715-1722 [PMID: [27569685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27569685/) DOI: [10.1038/ijo.2016.154](https://doi.org/10.1038/ijo.2016.154)]
- 30 **Mioni R**, Chiarelli S, Xamin N, Zuliani L, Granzotto M, Mozzanega B, Maffei P, Martini C, Blandamura S, Sicolo N, Vettor R. Evidence for the presence of glucose transporter 4 in the endometrium and its regulation in polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 4089-4096 [PMID: [15292352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292352/) DOI: [10.1210/jc.2003-032028](https://doi.org/10.1210/jc.2003-032028)]
- 31 **Ujvari D**, Hulchiy M, Calaby A, Nybacka Å, Byström B, Hirschberg AL. Lifestyle intervention up-regulates gene and protein levels of molecules involved in insulin signaling in the endometrium of overweight/obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2014; **29**: 1526-1535 [PMID: [24842895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842895/) DOI: [10.1093/humrep/deu114](https://doi.org/10.1093/humrep/deu114)]
- 32 **Liu KE**, Hartman M, Hartman A, Luo ZC, Mahutte N. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers. *Hum Reprod* 2018; **33**: 1883-1888 [PMID: [30239738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30239738/) DOI: [10.1093/humrep/dey281](https://doi.org/10.1093/humrep/dey281)]
- 33 **Jabbour HN**, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev* 2006; **27**: 17-46 [PMID: [16160098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16160098/) DOI: [10.1210/er.2004-0021](https://doi.org/10.1210/er.2004-0021)]
- 34 **Cousins FL**, Pandoy R, Jin S, Gargett CE. The Elusive Endometrial Epithelial Stem/Progenitor Cells. *Front Cell Dev Biol* 2021; **9**: 640319 [PMID: [33898428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33898428/) DOI: [10.3389/fcell.2021.640319](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640319)]
- 35 **Bozorgmehr M**, Gurung S, Darzi S, Nikoo S, Kazemnejad S, Zarnani AH, Gargett CE. Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 497 [PMID: [32742977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32742977/) DOI: [10.3389/fcell.2020.00497](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00497)]
- 36 **Lee YJ**, Yi KW. Bone marrow-derived stem cells contribute to regeneration of the endometrium. *Clin Exp Reprod Med* 2018; **45**: 149-153 [PMID: [30538944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30538944/) DOI: [10.5653/cerm.2018.45.4.149](https://doi.org/10.5653/cerm.2018.45.4.149)]
- 37 **Zhao J**, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reprod Sci* 2015; **22**: 181-188 [PMID: [24947483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24947483/) DOI: [10.1177/1933719114537715](https://doi.org/10.1177/1933719114537715)]
- 38 **Zhang Y**, Lin X, Dai Y, Hu X, Zhu H, Jiang Y, Zhang S. Endometrial stem cells repair injured endometrium and induce angiogenesis via AKT and ERK pathways. *Reproduction* 2016; **152**: 389-402 [PMID: [27486270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27486270/) DOI: [10.1530/REP-16-0286](https://doi.org/10.1530/REP-16-0286)]
- 39 **Zuk PA**, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; **7**: 211-228 [PMID: [11304456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11304456/) DOI: [10.1089/107632701300062859](https://doi.org/10.1089/107632701300062859)]



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton, CA 94566, USA
Telephone: +1-925-3991568
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
Help Desk: <https://www.f6publishing.com/helpdesk>
<https://www.wjgnet.com>



Anexo 2: Consentimiento Informado para la Intervención Nutricional dirigido a las pacientes con síndrome de ovario poliquístico

INSTITUTO DE INFERTILIDAD Y GENÉTICA MÉXICO S.C.

INGENES



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL

NHC: _____

Yo, la abajo firmante de este consentimiento y desde ahora denominada PACIENTE me identifico como:

Sra.: _____ de _____ años de edad.

Con domicilio en: _____

Teléfono: _____ Correo: _____

Con este documento certifico que he sido informada de las alternativas de tratamiento que me han sido expuestas por:

Dr(a): _____

Con domicilio en: _____

Cédula Dietista No: _____

Me ha explicado la posibilidad de mejorar la calidad ovocitaria como consecuencia de la Intervención Nutricional, resultando finalmente en un procedimiento de Fertilización *in vitro* exitoso.

La infertilidad femenina es un problema que ha ido en aumento, las causas son muy variadas, sin embargo, en recientes años ha surgido la preocupación de que los problemas metabólicos podrían ser la causa del desarrollo de infertilidad.

I. Objetivo: Este estudio tiene la finalidad de mejorar la calidad ovocitaria de la PACIENTE para un procedimiento de Fertilización *in vitro* exitoso mediante la INTERVENCIÓN NUTRICIONAL.

II. ¿En qué consiste?

Antes de iniciar el proceso de Fertilización *in vitro*, se analizarán los parámetros relacionados con el estado metabólico de la PACIENTE y se continuará en comenzar la INTERVENCIÓN NUTRICIONAL. Cada semana se analizarán los parámetros metabólicos. Al término de la INTERVENCIÓN, se iniciará la Fertilización *in vitro*.

III. Beneficios

La INTERVENCIÓN NUTRICIONAL es un programa para modificar la dieta de la PACIENTE que le permitirá mejorar los parámetros relacionados con su estado metabólico. Al mismo tiempo, la PACIENTE obtendrá una óptima calidad ovocitaria para una Fertilización *in vitro* exitoso.

IV. Procedimiento

El programa de INTERVENCIÓN NUTRICIONAL consiste en tres fases:

1. Evaluación del estado metabólico de la PACIENTE con Síndrome de Ovario Poliquístico.

2. Inicio y seguimiento de la INTERVENCIÓN NUTRICIONAL de la PACIENTE. Análisis de los parámetros metabólicos.
3. Inicio de la Fertilización *in vitro*.

V. Resultados

Los resultados de este estudio contribuirán al avance del conocimiento de la participación de los problemas metabólicos dentro del desarrollo de la infertilidad.

VI. Riesgos y limitaciones

- Puede ocurrir que la PACIENTE no siga las indicaciones que se encuentran dentro de la INTERVENCIÓN NUTRICIONAL.
- Se puede dar el caso de no contar con los datos completos requeridos para el análisis de los parámetros relacionados con el estado metabólico de la PACIENTE.

VII. Información económica

El programa de INTERVENCIÓN NUTRICIONAL no genera costo.

VIII. Aspectos particulares sobre el programa de Intervención Nutricional

Que la PACIENTE haya sido rigurosamente informada sobre el programa, procedimiento, posibilidades y riesgos de la terapéutica propuesta y que la haya aceptado previamente.

IX. Disponibilidad de volver a preguntar

La PACIENTE tienen derecho a recibir cualquier respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca del procedimiento, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la INTERVENCIÓN NUTRICIONAL. Por lo que, si desea más información de la que está en este consentimiento, puede solicitarla en cualquier momento.

X. Posibilidad de modificar o retirar el consentimiento otorgado

La firma de este documento no compromete a la PACIENTE de forma definitiva, es totalmente libre de retirar su consentimiento por cualquier motivo, para lo cual deberá informarlo de manera formal y anticipada al Médico Tratante.

XI. Confidencialidad

Aseguramos mantener la confidencialidad de la información que proporcione a INGENES, cuidando en todo momento su identidad y respetando su privacidad.

XII. Aspectos éticos de la investigación

Con el compromiso constante de INGENES en la generación de nuevas y mejores opciones de tratamiento para nuestras pacientes, es posible que se utilice la información generada de la intervención aplicada para fines de investigación documental retrospectiva sin modificación intencionada en las variables biológicas o para estudios prospectivos con la posibilidad de modificar la intervención utilizada buscando la implementación de nuevas técnicas vanguardistas, así como de mejorar los resultados.



Considerando que:

- a. En ninguna circunstancia se realizarán procedimientos o medidas sin beneficio terapéutico, ni se pondrá en riesgo mayor al existente a la PACIENTE.
- b. En ningún momento se identificará al sujeto de Investigación, teniendo la seguridad de que se respetará la privacidad y confidencialidad de la PACIENTE.

Una vez leído el presente consentimiento y comprendido lo anterior, declaro que:

- Toda la información que se nos ha preguntado para la INTERVENCIÓN NUTRICIONAL que se llevará a cabo, es veraz.
- He comprendido toda la información que nos ha sido proporcionada, la cual considero adecuada y suficiente, teniendo oportunidad de aclarar mis dudas al respecto, por lo que manifiesto estar satisfecha con la información recibida, y comprendo el alcance y riesgo de dicha intervención.
- La información me ha sido facilitada con antelación suficiente para poder reflexionar con calma y decidir libre y responsablemente.
- Conozco la disposición del personal sanitario de INGENES para ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente claro.
- He sido informada de la posibilidad de revocar este consentimiento, revocación que deberá solicitarse, anticipadamente y de manera formal.
- Existe la posibilidad de usar la información de la intervención, procedimiento utilizado, resultados y demás datos necesarios para realizar Investigación de tipo documental o prospectiva.

Autorización

En este acto, de manera libre, consciente, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi condición de PACIENTE y con fundamento en los artículos 80, 81, 82 y 83 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de prestación de Servicios de Atención Médica y del artículo 56 del mismo reglamento en Materia de Investigación para la Salud, autorizamos a INGENES y a su personal para que lleve a cabo la Intervención Nutricional.

NHC: _____

Nombre de la PACIENTE
Firma

En _____ a _____ del mes de _____ del año _____

Anexo 3: Consentimiento Informado para análisis de células de la cúmula.



Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANÁLISIS DE CÉLULAS DE LA CUMULA Y LIQUIDO FOLICULAR

Sr.^a _____

(NOMBRE Y DOS APELLIDOS DE LA PACIENTE) DE _____ AÑOS DE EDAD.

CON DOMICILIO EN _____

Sr. _____

(NOMBRE Y DOS APELLIDOS DEL PACIENTE) DE _____ AÑOS DE EDAD.

CON DOMICILIO EN _____

La infertilidad femenina es un problema que ha ido en aumento, las causas son muy variadas, sin embargo en recientes años ha surgido la preocupación de que diversos químicos presentes en diversos productos de uso personal puedan tener alguna participación en el desarrollo de infertilidad.

Objetivo: Este estudio tiene la finalidad de determinar las alteraciones causadas por la exposición a contaminantes ambientales sobre la expresión de genes de la cumula considerados biomarcadores de calidad ovular, el cual se ve reflejado en un embarazo exitoso. Así como determinar la presencia de contaminantes ambientales en liquido folicular.

¿En qué consiste?

Se emplearan muestras de células de la cumula y liquido folicular. Durante el proceso de retiro de óvulos, el ovocito va rodeado de una capa de células llamadas "células de la cumula", las cuales durante los procedimientos de fertilización in vitro en el Instituto Ingenes son desechados ya que no son de utilidad. Del mismo, el líquido folicular es recuperado junto con los ovocitos, sin embargo debido a que no es útil también es desechado. Las muestras se manejaran en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDMOL). El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Instituto.



¿Cuándo se dona la muestra?

Se tomará las muestras de células de la cumula y liquido folicular que normalmente se colectan durante el procedimiento de recuperación de óvulos. Dichas muestras son desechadas.

Procedimiento

No se agrega ningún procedimiento que comprometa al paciente ni al proceso de fertilización *in vitro*. Las muestras para este estudio se transfieren al LIDMOL una vez que se ha finalizado el procedimiento de recuperación de óvulos.

Resultados

Los resultados de este estudio contribuirán al avance de nuestro conocimiento acerca de los factores ambientales que afectan la calidad ovocitaria y contribuir a dar una explicación a problemas de infertilidad inexplicables.

Limitaciones

En el presente no se generará algún resultado directo al paciente.

Información económica

El estudio no tiene costo.

Una vez leído y comprendido lo anterior quedo informado de:

- No representa algún riesgo para la paciente ni para el procedimiento de fertilización
- Que la información de este estudio será confidencial, manejada con folio numérico y solo se utilizará con fines de la investigación.
- La disposición del personal que realiza esta investigación para ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente clara.

Autorización

Autorizo al personal del área médica llevar a cabo el uso de células de la cumula y liquido folicular para este estudio.

En _____ a _____ de _____ de _____

Fdo. El Médico

Firma de la paciente

Firma del paciente

Investigador Responsable


Anexo 4: Presentación en foros internacionales

Este trabajo fue presentado en dos foros internacionales:

1. Congreso de la American Society of Reproductive Medicine, 2022.

C. Palafox-Gómez, G. Milena Ortiz, I. Madrazo, L.M. Porchia, E. López-Bayghen. **Reproductive and Metabolic Effects of a Nutritional Intervention for Ketosis Induction added to IVF in Patients with Polycystic Ovary Syndrome.**

P-247 6:45 AM Tuesday, October 25, 2022

REPRODUCTIVE AND METABOLIC EFFECTS OF A NUTRITIONAL INTERVENTION FOR KETOSIS INDUCTION ADDED TO IVF IN PATIENTS WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. Cecilia Palafox-Gómez, MsC,¹ Ginna Milena Ortiz, MD,² Ivan Madrazo, M.D.,² Leonardo M. Porchia, PhD,³ Esther Lopez-Bayghen, PhD¹ ¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México City 07360, México., México, DF, Mexico; ²Ingenes Mexico, Mexico City, DF, Mexico; ³Instituto Regenera SC, México City 05320, México, Mexico.

ASRM 2022

Scientific Congress, Anaheim, California, October 22-26, 2022
Fertility and Sterility, Vol. 118, Issue 4, e214

OBJECTIVE: High-carbohydrate diets (glucotoxicity) and hyperinsulinemia contribute to PCOS disturbances and infertility; a ketogenic diet could mitigate the harmful effects of insulin resistance (IR) and improve PCOS women's fertility results when combined with IVF.

MATERIALS AND METHODS: 20 PCOS patients recruited from Ingenes México signed informed consent. Inclusion criteria: failure in the previous IVF cycle; IR as HOMA-IR >1.96, signs of Metabolic Syndrome (elevated waist circumference, triglycerides \geq 150 mg/dL, HDL-C <50 mg/dL, blood pressure systolic \geq 130, and diastolic \geq 85 mm Hg or fasting glucose \geq 100 mg/dL); exclusion: previous endocrine pathologies. Patients were instructed to follow a ketogenic diet, daily consumption of 50g of total carbohydrates, 1.5 grams of protein per kg of ideal body weight, adjusting with fat, 15, 25, and 60%, respectively in an 1800 to 2000 calories/day diet. Nutritional education (video) focused on controlling glucose load and avoiding processed food, starches, juices, bread, sweets, sugared beverages, and carbohydrate-rich food. Every third day, the patient reported all food consumption to the dietician to calculate and correct macronutrients consumption. The presence of ketones in urine was auto-monitored twice a week with reactive strips. Once ketosis and correction of IR in more than 50% were achieved, patients proceeded to IVF. Pregnancy achievement was recorded, and the reproductive results were analyzed and compared against the previous cycle.

RESULTS: 20 patients included in the study were closely followed and constantly advised and monitored throughout the nutritional intervention of five months (average); the decrease in carbohydrate consumption was consistently lowered from an average of 194 g/day to less than 50 g/day (measured by a dietitian). Weight loss ranged from 4 to 14%, with an average of 10% (+/-1%, SE). Urine ketones appeared in all patients in nine days (average); positive ketosis was considered at 40 mg/dL and was recorded in all patients following the nutritional program (15 to 160 mg/dL). We found an average of 60% +/- 12.19 decrease in HOMA-IR values (20.7 to 4.7 as maximal change). Metabolic parameters improve in all patients being the Triglyceride/HDL-C ratio the most consistent change (1.69 to 1.08 on average). Considering the implantation rate in the previous cycle as zero, after the nutritional intervention, 90% of treated patients achieved biochemical pregnancy (beta-HCG positive), and 20% had an early loss; 70% progressed to clinical pregnancy, 57% presented an ongoing pregnancy, 43% delivered a live newborn.

CONCLUSIONS: Through a carefully followed restriction in the consumption of carbohydrates as the only additional intervention, it is possible to improve insulin resistance, decrease the waist-to-height and triglycerides/HDL-C ratios, and achieve ongoing pregnancy in 70% of the PCOS cases.

IMPACT STATEMENT: In IR-PCOS patients, pregnancy achievement through *in vitro* fertilization can be enhanced by over 70%, focusing on lowering insulin resistance via ketosis induction.

SUPPORT: None to declare

2. Symposium for Metabolic Health – San Diego 2023, del 17 al 20 de agosto, 2023
C. Palafox-Gómez, G. Milena Ortiz, I. Madrazo, E. López-Bayghen. **Adding a ketogenic dietary intervention to IVF treatment in patients with polycystic ovary syndrome improves implantation and pregnancy.**