

Trabajo Fin de Máster en Biología y Tecnología Aplicada a la  
Reproducción Humana Asistida

## **ESTERILIDAD DE ORIGEN DESCONOCIDO**

Autor: Mónica Vera Matas

Tutor: David Agudo Garcillán

Cotutor: David Sanz

## ÍNDICE

1. Resumen y palabras clave.....	3
2. Introducción.....	4
3. Objetivos.....	6
4. Materiales y métodos.....	6
5. Resultados.....	7
5.1 Factores nutricionales: vitamina D.....	7
5.2 Factores psicológicos: ansiedad y estrés.....	9
5.3 Factores inmunológicos.....	12
5.4 Factores ambientales: metales pesados.....	15
5.5 Hábitos de vida: alcohol y tabaco.....	20
6. Discusión.....	22
7. Conclusiones.....	25
8. Bibliografía.....	27

## 1. Resumen y palabras clave

### Resumen

La esterilidad es una enfermedad que implica a una gran cantidad de parejas en todo el mundo. Y por las condiciones de vida actuales, cada vez afecta a más personas. La mayoría de las veces el origen de esta enfermedad es conocido, siendo el principal factor condicionante la edad de la mujer. Pero aún hay un porcentaje, entre un 10 y 17%, de pacientes diagnosticados con esterilidad de origen desconocido. Esta puede deberse a múltiples factores desde inmunológicos, nutricionales, hormonales, y ambientales. A causa del estilo de vida que seguimos actualmente el porcentaje de parejas diagnosticadas con esterilidad de origen desconocido no para de crecer. Tras las investigaciones realizadas en varios campos para intentar dar un diagnóstico a estas parejas a muchas de ellas se les ha asociado a algunos de estos factores desencadenantes de la esterilidad, pero a otras muchas, debido al amplio rango de posibilidades aún no.

---

### Abstract

Infertility is a disease that affects a large number of couples all over the world. And due to current living conditions, it is affecting more and more people. Most of the time the origin of this disease is known, the main conditioning factor being the woman's age. But there is still a percentage, between 10 and 17%, of patients diagnosed with sterility of unknown origin. This can be due to multiple factors ranging from immunological, nutritional, hormonal and environmental. Due to our current lifestyle, the percentage of couples diagnosed with infertility of unknown origin is constantly increasing. Following research carried out in various fields to try to diagnose these couples, many of them have been associated with some of these factors that trigger sterility, but many others, due to the wide range of possibilities, have not yet been diagnosed.

**Palabras clave:** esterilidad, infertilidad, origen desconocido, infertilidad, vitamina D, disruptores endocrinos, células Treg.

## 2. Introducción

La esterilidad o infertilidad siempre se ha considerado un gran estigma social y cada día son más las parejas que la sufren.

Actualmente, implica a millones de personas en todo el mundo, unos 48 millones de parejas y unos 186 millones de personas, y afecta a ambos géneros por igual.

La esterilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo tras doce meses de relaciones sexuales regulares sin protección. Podemos hablar de esterilidad primaria o secundaria. Primaria cuando una mujer no es capaz de tener un recién nacido vivo, y secundaria cuando ya se ha tenido un hijo previo, pero no consiguen tener otra gestación viable. La evaluación puede iniciarse antes en pacientes que tienen factores de riesgo de infertilidad o si la pareja femenina es mayor de 35 años.

Las causas de esterilidad de origen femenino suponen un 30% total de los casos. Pueden clasificarse en: ovulatorias, uterinas, tubáricas y cervicales, siendo la principal condición la edad. Las de origen masculino suelen deberse a una azoospermia obstructiva o secretoria, disfunción sexual o calidad seminal.

La mayoría de las causas de infertilidad se conocen, pero existen un 15% de estos casos en los cuales no se puede determinar una causa exacta. Las mujeres diagnosticadas de esterilidad de origen desconocido son entre un 10 y 17%.

La prevalencia de las parejas que acuden a una clínica de reproducción asistida con un diagnóstico de esterilidad de origen desconocido es del 21% entre mujeres menores de 35 años y del 26% en mujeres mayores de 35 años.

Antes de hacer un diagnóstico de infertilidad desconocida se realizan varias pruebas previas. En muchos casos, los resultados de estas pruebas son normales y la pareja se tranquiliza al saber que los nuevos intentos de embarazo pueden tener éxito. De hecho, en muchas se produce sin mayor intervención. En aquellas parejas que no lo consiguen, se realiza una investigación muy exhaustiva antes de diagnosticar infertilidad de origen desconocido. Entre las que se incluyen gráficos de temperatura corporal basal, concentraciones séricas de prolactina y progesterona, así como histerosalpingografía o laparoscopia de la pelvis.

La variabilidad de causas que pueden ser relacionadas con la infertilidad pueden ser muy diversas, pueden deberse a factores psicológicos (ansiedad y estrés), nutricionales (vitamina D), inmunológicos y ambientales. Entre otros muchos.

A pesar de la cantidad de parejas que hoy en día sufren de infertilidad, la mayoría de estas no comparten su caso con sus allegados, lo cual puede provocarles sentimientos negativos que aumentan su vulnerabilidad psicológica provocándoles estrés, ansiedad e incluso depresión. Esto plantea una pregunta: ¿la infertilidad causa el estrés o el estrés causa la infertilidad? ¿o quizá sean ambas cosas?, la dirección de causa-efecto no está muy clara aún. Lo que si podemos deducir es que el diagnóstico de infertilidad provoca un malestar importante en los pacientes, sin embargo, el impacto del estrés en la infertilidad es menos conocido.

Por otro lado, los efectos de la contaminación ambiental pueden ejercer efectos negativos sobre la salud tanto a corto como a largo plazo. Una de las consecuencias más importantes y subestimada es la infertilidad. Las exposiciones ambientales al tabaco, tóxicos, metales pesados y estrés de mujeres embarazadas pueden producir cambios epigenéticos sobre la impronta genómica. Un patrón de metilación inadecuado sobre la impronta genómica puede afectar al crecimiento del bebé.

Por otro lado, existen los factores inmunológicos. La presencia del sistema inmunitario inmunológico decidual (innato o adaptativo) es esencial para el éxito del embarazo. La fertilidad esta mediada por los linfocitos T helper (Th) y anticuerpos. Los niveles alterados de estos linfocitos y anticuerpos pueden causar fallos en el embarazo y fertilidad. Por lo tanto, la revisión del sistema inmune en las mujeres diagnósticas de esterilidad de origen desconocido puede ayudarnos a determinar una posible causa para esta.

### **3. Objetivos**

El objetivo de este trabajo es sintetizar y analizar algunas de las posibles causas de origen desconocido de la esterilidad.

### **4. Materiales y métodos**

Esta revisión se ha realizado a través de una búsqueda en PubMed de estudios realizados entre el 2015 y 2022, con texto completo y libres de pago. En el apartado de resultados se han incluido estudios publicados entre el 2018 y 2022. Para poder centrar nuestra búsqueda se han utilizado palabras clave y operadores booleanos como: infertility AND unknown origin, infertility AND vitamin D, infertility AND anxiety, infertility AND immune system, infertility AND heavy metals, infertility AND pesticides, infertility AND plasticizers. Se excluyeron los estudios que no tenían resultados relevantes sobre la manera en que estos factores pueden afectar a la esterilidad.

## 5. Resultados

### 5.1 Factores nutricionales: vitamina D

La vitamina D es una hormona esteroidea que se produce en la piel tras la exposición a la luz solar. También la podemos obtener a través de la dieta, pero solo un 20% de esta proviene de los alimentos. Tiene un papel fundamental en la homeostasis del calcio y mineralización de los huesos.

El receptor de la vitamina D (VDR) está relacionado con muchas enfermedades crónicas ya que se encuentra en la mayoría de las células humanas. Esto incluye también a órganos reproductores como los ovarios, el útero, la placenta, los testículos, el hipotálamo y la hipófisis.

La implicación de la vitamina D en los resultados de embarazos clínicos y nacimientos vivos se ha examinado en numerosos estudios. Se ha observado un impacto positivo de la vitamina D en los resultados de la fecundación *in vitro*. Esto puede deberse a la relación entre la vitamina D y la hormona antimülleriana (AMH) o la FSH, ya que se ha encontrado al VDR en la membrana de las células de la granulosa.

La vitamina D, suministrada por la irradiación UV de la piel o en la dieta es biológicamente inactiva y requiere de hidroxilaciones tanto en el hígado como en el riñón para convertirse en su forma biológicamente activa, la 1,25- hidroxivitamina D o calcitriol.

Un estudio experimental, en células de la granulosa de gallina comprobó que a medida que aumentaban los niveles de vitamina D, disminuía la expresión de ARNm de la AMH, y aumentaba el ARNm del receptor de la FSH y la proliferación celular. Sin embargo, en células de la granulosa humanas, tanto la expresión del ARNm del receptor de la AMH, como el receptor de la FSH disminuyen conforme van aumentando los niveles de vitamina D.

Se realizó un metaanálisis en el que se incluyeron 18 estudios observacionales y 6 estudios de intervención. En los estudios observacionales se obtienen resultados muy dispares respecto a la relación entre la vitamina D y la AMH. Sin embargo, los

estudios de intervención indican una relación causa-efecto entre la vitamina D y la AMH.

Además, las investigaciones realizadas asocian la vitamina D al síndrome del ovario poliquístico (PCOS), ya que en mujeres con PCOS los niveles de vitamina D son menores.

Los resultados obtenidos mostrados en la figura 1, muestran los niveles de AMH obtenidos en las mismas seis cohortes de pacientes (tres con SOP y tres sin SOP), un total de 140 mujeres. Los niveles medios de AMH en los grupos con SOP oscilaban entre 5,30 y 10,04 ng/ml y como era de esperar eran más altos que los niveles medios de AMH en los grupos sin SOP, que oscilaban entre 0,39 y 4,48 ng/ml. Las concentraciones medias de AMH en suero después de los tratamientos con vitamina D oscilaron entre 3,9 y 9.59 ng/ml en las cohortes de mujeres con SOP, mientras que en el grupo sin SOP oscilaban valores entre 0,92 y 4,94 ng/ml. Se observaron cambios significativos en los niveles séricos de AMH en mujeres sin SOP tras la administración de suplementos de la vitamina D.

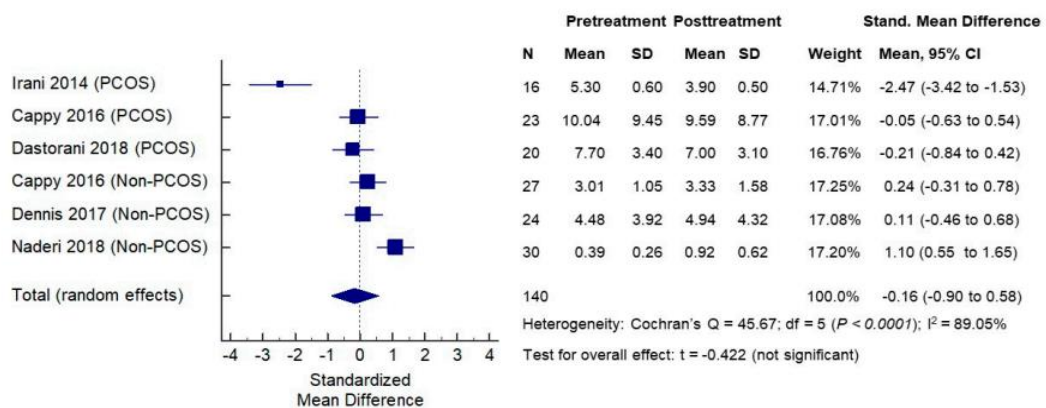


Figura 1. Efectos de la suplementación con vitamina D sobre los niveles de AMH. La figura muestra los niveles medios de AMH en las mismas seis cohortes (tres con SOP y tres sin SOP) antes y después de la suplementación con vitamina D (1).

La vitamina D también está asociada al resultado clínico del embarazo en los ciclos de FIV/ICSI. Se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar la asociación entre el nivel de vitamina D y los resultados clínicos tras la reproducción asistida.



Dos estudios de metaanálisis han evaluado la asociación entre el nivel de vitamina D y los resultados tras los ciclos de FIV/ICSI. Uno de ellos fue el realizado por Vanni *et al.*, este estudio comparó el embarazo clínico con la deficiencia de vitamina D, esto se asoció con una menor probabilidad de embarazo. Otro metaanálisis en el que se incluyen 1238 mujeres comparó la tasa de embarazo clínico y la de recién nacido vivo con los niveles de vitamina D. Los resultados mostraron que el déficit de vitamina D no estaba relacionado con la tasa de embarazo clínico, pero sí se relacionaba con la probabilidad de tener un recién nacido vivo.

En el estudio realizado por Zhao *et al.*, se incluyeron 9 estudios en los que participaron 2254 parejas, para evaluar el nivel de vitamina D en relación con los resultados clínicos de embarazo. De estos 9 estudios, 5 eran retrospectivos y 4 prospectivos. Todos los estudios miden el nivel de vitamina D en suero y líquido folicular. Hay una tendencia, sin significación estadística, hacia una menor tasa de embarazo en mujeres deficientes de vitamina D (<20 ng/ml).

En este metaanálisis también se evalúa la tasa de recién nacido vivo, en él se incluyen 3 estudios. Estos mostraron una tasa significativamente menor en el grupo de mujeres con déficit de vitamina D en comparación con el grupo de mujeres que tenían un nivel suficiente (1).

## 5.2 Factores psicológicos: ansiedad y estrés.

Sabemos que el estrés es uno de los causantes de la esterilidad, si a esto le unimos que el diagnóstico de infertilidad a la pareja les provoca un gran estrés y someterse a una terapia de reproducción asistida puede aumentarlo, estamos ante una población muy sensible a este factor.

Se han analizado muchos estudios que investigan la relación entre los síntomas psicológicos antes y durante los tratamientos de reproducción asistida. Algunos de estos estudios han demostrado que cuantos más sentimientos negativos tienen las pacientes más bajas son las tasas de embarazo, mientras que otros estudios no han confirmado esta teoría.

En un metaanálisis realizado por Rooney *et al.*, el cual reunía un estudio sobre la fecundidad que incluía a 339 mujeres de Reino Unido que intentaban quedarse

embarazadas, los síntomas que estas presentaban de depresión, ansiedad y estrés no se asociaron de manera significativa al embarazo.

En otro estudio similar realizado en Estados Unidos en 501 mujeres, los niveles de  $\alpha$ -amilasa salival, un biomarcador del estrés, se relacionaron con el tiempo que tardaban las mujeres en quedarse embarazadas. Cuanto más alto fuesen los niveles de  $\alpha$ -amilasa, más probabilidades tenían de ser infértiles al final del estudio. Además, en otro estudio, que incluía a 135 pacientes de FIV se midieron los niveles de cortisol a través de muestras de cabello, estos se relacionaron con la tasa de embarazo, concluyendo que es estrés crónico afecta en mucha mayor medida a la fertilidad que el estrés traumático a corto plazo. Estos estudios coinciden con que los síntomas psicológicos tienen un impacto negativo en la fertilidad (2).

En otro estudio realizado por Ramezanzadeh *et al.*, el cuál incluía a 370 mujeres, el 60.2% tenían ansiedad y el 40,8% depresión. Había una relación entre la ansiedad, la depresión y la duración de la infertilidad. Los trastornos eran más frecuentes entre los 4 y 6 años desde su diagnóstico de infertilidad.

Los modelos actuales tienen en cuenta el estrés y su posible influencia en la fertilidad a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA). Uno de estos estudios incluyó la relación del eje HPA, la ansiedad y la eficacia del tratamiento de FIV. El grupo de estudio estaba formado por 264 mujeres sometidas a un tratamiento FIV. Se encontró un aumento significativo de norepinefrina y cortisol el día de la punción en relación con el día de inicio del tratamiento. También hubo una relación entre el nivel de cortisol en suero y la ansiedad descrita en los cuestionarios psicométricos por parte de los pacientes. También se comprobó que las mujeres que antes de la punción de ovocitos no sufrían ansiedad, tenían una mayor tasa de embarazo tras su tratamiento de FIV en comparación con las que si declararon niveles de ansiedad y estrés.

Otro estudio realizado sobre la población danesa reveló que las mujeres con un diagnóstico depresivo tenían un menor número de recién nacidos vivos tras el tratamiento de reproducción asistida, en comparación con mujeres sin depresión. Este estudio también tuvo sus limitaciones ya que solo se incluyeron mujeres hospitalizadas.

Un metaanálisis que incluía 31 estudios prospectivos no encontró relación entre los niveles de ansiedad y la tasa de embarazo. Sin embargo, estos estudios presentaban mucha heterogeneidad entre los grupos de estudio y un número bastante bajo de estudios incluidos en el metaanálisis (3).

Es importante también recordar que la depresión y el estrés también pueden tener efectos sobre la salud a nivel genético y/o epigenético. Los datos recientes demuestran que la placenta tiene un papel fundamental y sus alteraciones a nivel funcional pueden afectar a factores psicológicos de la madre. En el estudio de Litzky *et al.*, sintetizaron investigaciones recientes sobre el estrés causado por un tratamiento de reproducción asistida sobre la epigenética placentaria, especialmente sobre la impronta genómica, ya que estos genes están muy implicados en el desarrollo del bebé, y sus resultados en la descendencia y en el peso del bebé al nacer.

La impronta genómica es un sistema de regulación de la expresión génica presente en especies de gestación intrauterina. La impronta genómica marca diferencialmente mediante modificaciones epigenéticas determinados genes según su origen parental, dando lugar a la expresión monoalélica. Existen unas regiones de control de la impronta (ICRs), las cuáles no sufren desmetilación global tras la fecundación, ya que se encuentran metiladas. Si estas regiones, ICRs, sufriesen una metilación inadecuada como consecuencia de una exposición al estrés puede producirse una mala regulación de la impronta genómica, lo que lleva a un crecimiento inadecuado del feto y de la placenta. Por ejemplo, los genes impresos H19, que inhiben el crecimiento de la placenta y trofoblasto. Y el factor de crecimiento IGF2, que favorece el crecimiento del feto y la placenta. Estos genes están regulados por ICR1.

La desmetilación de este ICR1 dará lugar por tanto a un recién nacido con bajo peso, como sucede en el síndrome de Russell-Silver.

El peso de los bebés al nacer fruto de un tratamiento de FIV en poblaciones infértiles es menor comparado con los bebés nacidos de manera natural. Aunque tanto los embarazos de parejas infértiles como los de FIV tienen un mayor riesgo de parto prematuro, este es un 20% mayor en mujeres infértiles. Las comparaciones entre los bebés concebidos con ovocitos de donante y propios sostienen que la infertilidad materna puede deberse a un componente del ambiente uterino.

En un estudio de Salud Infantil de Rhode Island (RICHS), el cuál contenía datos de más de 800 madres que tuvieron un recién nacido sano entre 2009 y 2014, se analizó la expresión de RNA de la placenta. Se separaron los grupos por embarazos conseguidos por FIV (n=18), parejas diagnosticadas de infertilidad que no realizaron FIV (n=79) y controles (n=158). Cinco genes se expresaron de forma diferencial entre los niños concebidos por FIV y los niños con padres diagnosticados de infertilidad. Pero cuatro de estos también se expresaron de forma diferencial entre el grupo infértil y los controles. Dentro de las cohortes estudiadas, las tasas de depresión y ansiedad en las mujeres que se sometían a un tratamiento FIV y las diagnosticadas de infertilidad eran un 20% más altas que en el grupo control (5).

### 5.3 Factores inmunológicos

El reconocimiento del feto como antígeno semialogénico es crucial para la implantación y desarrollo del embrión, lo que conduce a la tolerancia inmunológica en la interfase materno-fetal. Es un evento por el cual el sistema inmune materno no rechaza a los antígenos semialogénicos fetales.

Que el sistema inmune decidual sea adaptativo es esencial para la fertilidad, y los niveles alterados de este podrían afectar a la tolerancia materna provocando una infertilidad. El sistema inmune adaptativo decidual incluye el sistema inmune celular y humoral. En concreto el sistema inmune celular, incluye a los linfocitos T helper (Th) como Th1, Th2, Th17, T folicular helper (Tfh), CD8+, CD28- T, y células reguladoras T (Treg). Y el sistema inmune humoral incluye a anticuerpos antifosfolípidos (SAF), anticuerpos antitiroideos (ATA), anticuerpos antiováricos (AOA), y citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (tabla 1) (6).

*Tabla 1. Niveles de los componentes del sistema inmune decidual en mujeres con esterilidad de origen desconocido.*

Component	Level/proportion in females with UI	Reference
<b>Cellular</b>		
Th subsets		
Th1/Th2	Increase (increased numbers of Th1 cells and decreased numbers of Th2 cells)	[8]
Th17	Increase in number	[8]
Tfh/CD4 T cell	Increase (increased numbers of Tfh cells and decreased numbers of CD4 T cells)	[10]
Suppressor T cells	Decrease in number of CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> T cells	[9]
Treg	Decrease in number	[25]
<b>Molecular</b>		
Autoantibody		
APA		
APA-LA b. ACA	Increase in level	[33,39]
ATA		
Anti-TPO	Increase in level	[31,43,44]
Anti-TG		
AOA	Increase in level	[50,51]
<b>Cytokines</b>		
Pro-inflammatory		
IFN- $\gamma$	Increase in level	[8,10]
IL-2		
TNF		
IL-17		

El ratio Th1/Th2 se encuentra incrementado en las mujeres diagnosticadas de infertilidad de origen desconocido. Durante el embarazo los linfocitos Th1 inhiben la invasión del trofoblasto y los Th2 modulan la respuesta de Th1, promueven la invasión del trofoblasto y mantienen al feto.

Las Th17 también se encuentran incrementadas, estas son las responsables de la respuesta inmune contra bacterias y hongos extracelular. Algunos estudios sugieren que tienen un papel fundamental en la fertilidad y su aumento puede provocar el rechazo del feto. Ya que junto con las células del cito y sincitiotrofoblasto secretan IL-17, una citocina pro-inflamatoria que participa en el proceso de neovascularización, producción de moléculas pro-angiogénicas, y en el proceso invasor del trofoblasto.

Un estudio realizado por Ozkan ZS *et al.*, analizó el papel de las células Th17 sobre el rechazo del feto. Se observaron que los niveles de IL-17 en suero aumentaban en mujeres con esterilidad de origen desconocido.

Las células Th17 también aparecen en los abortos espontáneos recurrentes. Saifi *et al.*, demostraron que el nivel de Th17 en suero y en la decidua aumentaba en

comparación con mujeres con un embarazo normal. Existe una relación inversa entre las células Th17 y las células Treg, en los linfocitos de la sangre periférica (PBL) y la decidua.

La elevación de hormonas relacionadas con el embarazo como los estrógenos, progesterona y la gonadotropina coriónica humana promueve el reclutamiento y expansión de las Tregs, lo que las implica directamente con la tolerancia materno-fetal. Las células Treg tienen una función reguladora a la hora de promover la tolerancia a antígenos propios y ajenos, por lo tanto, tienen una implicación en el mantenimiento de la tolerancia materna a los alógenos fetales (5).

Las células Tfh/CD4 se encuentran incrementadas en mujeres con esterilidad de origen desconocido en sangre periférica. Estas células participan en la respuesta autoinmune contra el feto.

Por otro lado, en la respuesta humoral participan los anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos antitiroideos y anticuerpos antiováricos. La producción de estos anticuerpos está relacionada positivamente con el número de células Tfh y la citoquina IL-21.

Según los estudios más recientes los SAF tienen un impacto directo en la fertilidad, estos se encuentran incrementados en mujeres con esterilidad desconocida. El incremento de estos supone una respuesta inmunitaria materna desfavorable sobre la implantación embrionaria.

Los antígenos antiováricos se liberan en mayores cantidades tras los tratamientos de FIV. Estos antígenos pueden provocar la producción de AOA. Estos anticuerpos tienen un efecto citotóxico sobre el crecimiento de las células de la granulosa. Luborsky *et al.*, evaluaron los niveles de los AOA en mujeres infértiles y mujeres fértiles. Los niveles de AOA en mujeres infértiles eran significativamente mayores.

#### 5.4 Factores ambientales: disruptores endocrinos

Las sustancias químicas disruptoras endocrinas (EDCs) tienen propiedades inhibitorias a nivel endocrino en los seres vivos. Actualmente se han convertido en un tema de interés por sus efectos nocivos sobre la salud humana. Algunos de estos EDCs son naturales, pero otros, son sintéticos y se liberan en el medio ambiente. La reproducción es un proceso regulado por hormonas y, por lo tanto, es susceptible de sufrir los efectos de los disruptores endocrinos. Las alteraciones que estos producen sobre la reproducción humana pueden dar lugar a una infertilidad. Estos disruptores endocrinos pueden ser: metales pesados, pesticidas y plastificantes.

##### **Metales pesados**

La acumulación de metales pesados en la cadena alimenticia y su resistencia a la descomposición es un grave problema para la salud. Metales como el cadmio, mercurio y plomo, no tienen ninguna función metabólica y son tóxicos a cualquier concentración.

Aunque los metales pesados pueden afectar a ambos sexos, las mujeres se ven más afectadas debido a la reserva no renovable de ovocitos.

Los estudios más recientes indican que los metales pesados pueden influir en la expresión genética, especialmente sobre los microRNAs. Además, la exposición crónica puede causar una disfunción esteroidogénica, anomalías fetales y embriotoxicidad.

Se ha demostrado que la exposición a metales pesados durante el embarazo está relacionada con el parto prematuro, debido al exceso de ROS en el tejido placentario trofoblástico (figura 3). Los niveles bajos de ROS estimulan el crecimiento y supervivencia celular. Y los niveles altos estimulan procesos degenerativos mediante la activación de genes pro-apoptóticos, como HIF (factor inducible por hipoxia) y NfκB (factor nuclear kappa potenciador de las células B).

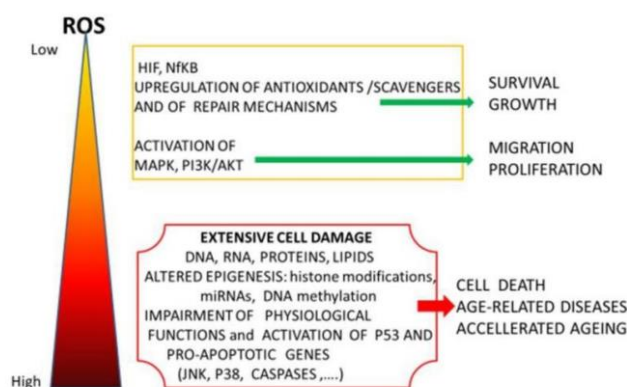


Figura 2. Representación de los efectos celulares a la exposición de ROS.

La placenta actúa transportando los nutrientes de la madre al feto, sin embargo, no bloquea el paso de todos los elementos tóxicos y los metales no esenciales pueden atravesarla debido a su tamaño y carga (6).

Se realizó un estudio que incluía a un total de 124 mujeres de las cuales, 42 embarazas y 82 infértiles. La tabla 2 muestra las características sociodemográficas de los participantes en el estudio. Las mujeres infértiles eran de mayor edad.

La media (IC del 95%) en los niveles de plomo y cadmio en sangre para la población total era de 0,50  $\mu\text{g/dL}$  (IC 95%: 0,43, 0,57) y 0,26  $\mu\text{g/L}$  (IC 95%: 0,22, 0,31) respectivamente (7).

Tabla 2. Características de la población de estudio (n=124) (14).

Table 1. Characteristics of the study population (n = 124).

Characteristics	Infertile <sup>1</sup> n (%)	Pregnant <sup>2</sup> n (%)	p-Value
<b>Total subjects</b>	82 (66.13)	42 (33.87)	
Age (year)			0.0001
20-24	14 (45.16)	17 (54.84)	
25-29	15 (51.72)	14 (48.28)	
30-34	18 (69.23)	8 (30.77)	
35-39	35 (92.11)	3 (7.89)	
Ethnicity			0.4522
Non-Hispanic white	21 (67.74)	10 (32.26)	
Non-Hispanic black	23 (63.89)	13 (36.11)	
Hispanic	28 (73.68)	10 (26.32)	
Others	10 (52.63)	9 (47.37)	
Annual Family Income			0.4153
Less than \$20,000	18 (60)	12 (40)	
\$20,000 and over	64 (68.09)	30 (31.91)	
Education			0.9313
Less than high school	13 (65)	7 (35)	
High school graduate	18 (69.23)	8 (30.77)	
More than high school	51 (65.38)	27 (34.62)	
Marital status			0.6897
Married	46 (67.65)	22 (32.35)	
Never married	16 (59.26)	11 (40.74)	
Widowed/divorced/separated	20 (68.97)	9 (31.03)	
Smoking history			0.8661
Never smoked	16 (66.67)	8 (33.33)	
Ex-Smoker	9 (60)	6 (40)	
Current Smoker	57 (67.06)	28 (32.94)	
Alcohol consumption <sup>3</sup>			0.5427
Yes	59 (67.82)	28 (32.18)	
No	23 (62.16)	14 (37.84)	
Physical Activity <sup>4</sup>			0.6232
Yes	35 (68.63)	16 (31.37)	
No	47 (64.38)	26 (35.62)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )			0.0882
Underweight (<18.5)	2 (66.67)	1 (33.33)	
Normal weight (18.5-24.9)	21 (70)	9 (30)	
Overweight (25.0-29.9)	10 (43.48)	13 (56.52)	
Obesity (>30)	49 (72.06)	19 (27.94)	



La figura 4 muestra el número de eventos (infertilidad y embarazo) según los terciles de plomo en sangre (figura 4a) y cadmio en sangre (figura 4b). La proporción de mujeres infértiles respecto a las embarazadas aumenta del primer al segundo tercil y disminuye un poco del segundo al tercero. El número de mujeres infértiles aumenta significativamente con los niveles de plomo en sangre ( $p=0,0145$ ). Sobre los niveles de cadmio hubo un aumento en la proporción de mujeres infértiles siendo el primer tercil el que tenía una cantidad menor. Con los grupos de mujeres embarazadas ocurrió el efecto contrario, iban disminuyendo. No se observó ninguna tendencia estadísticamente significativa ( $p= 0,1954$ ).

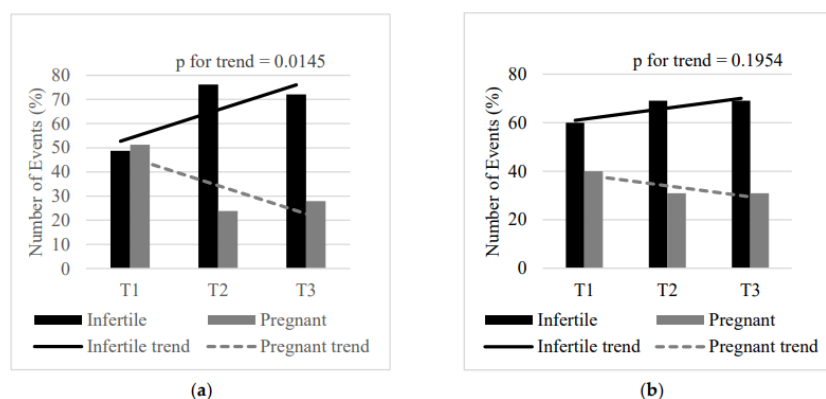


Figura 3. Cantidad de plomo (a) y cadmio (b) en los niveles de sangre sobre los grupos de mujeres infértiles y embarazadas (14).

## Pesticidas

Los pesticidas se utilizan habitualmente en la agricultura y en los hogares domésticos. Podemos contaminarnos a través de la ingestión, inhalación o absorción cutánea a través de los alimentos, el agua, el aire, el polvo o el suelo. Pueden ejercer sus efectos sobre el hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero. Sobre el hipotálamo se observó que algunos pesticidas, aumentaban los niveles de ARNm de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y otros redujeron la frecuencia del pulso de la LH.

Sobre el ovario algunos estudios en animales han demostrado que la presencia de pesticidas reduce el peso de los ovarios, el crecimiento de los folículos y la viabilidad de los ovocitos y/o aumentando la atresia.

Además, en los estudios realizados se ha visto que la exposición de los ovarios a estos puede afectar a su capacidad para producir hormonas sexuales, ya que algunas de estas moléculas son capaces de unirse y bloquear los receptores de FSH, LH y estrógenos.

En cuanto a su efecto sobre el útero, varios estudios han indicado que los pesticidas pueden alterar la estructura o función del útero. Algunos disminuían el peso del útero, mientras que otros lo aumentaban.

La información que existe actualmente sobre los efectos de los pesticidas en el hipotálamo y la hipófisis es escasa. Se observó que algunos de los pesticidas aumentaron los niveles de expresión de ARNm de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Un pesticida como el carbamato molinato, inhibió la frecuencia del pulso de LH en ratas, por lo que retrasó su ovulación (8).

Se realizó un estudio sobre 394 parejas en las cuales se detectó que había disminuido la fertilidad debido a la exposición de estas a los pesticidas.

Otro estudio reciente prospectivo sobre el medio ambiente y la salud reproductiva encontró una asociación entre la ingesta de pesticidas procedentes de los alimentos y los resultados de mujeres que se sometían a un TRA (Técnicas de Reproducción Asistida).

En una cohorte de 325 mujeres sometidas a 541 ciclos de TRA, las mujeres que habían tenido una dieta con una ingesta de frutas y verduras con un contenido mayor de pesticidas vieron reducida la probabilidad de embarazo en un 18% y la probabilidad de recién nacidos vivos en un 26%. Por el contrario, otro estudio realizado en 99 mujeres no encontró ninguna asociación entre la exposición al insecticida diclorodifeniltricoloetano (DDT) y las TRA. Niveles mayores de DDT en el líquido folicular no fueron asociados significativamente a una disminución del número o calidad de los ovocitos, tasa de fecundación, calidad de los embriones o tasa de embarazo (9).

Múltiples estudios apoyan una asociación entre los pesticidas y la pérdida temprana de embarazo, pero están muy limitados por los retrasos sustanciales entre los embarazos, de 2 a 6 años, entre los embarazos y la medición de niveles séricos de pesticidas.

Un análisis más sólido y prospectivo midió los niveles de DDT en suero antes de la concepción en trabajadores textiles chinos entre 1996 y 1998; tras ajustar la edad, IMC, y otras exposiciones laborales. La regresión logística reveló una probabilidad relativa de 2,12% de pérdida de embarazo temprana en el grupo textil que presentaba mayores niveles de DDT en suero en comparación con el que presentaba menos.

## **Plásticos**

Los plásticos son sustancias que se añaden a un material para aumentar su flexibilidad. Pueden estar presentes en alimentos, envases, dispositivos médicos, cosméticos, productos farmacéuticos y juguetes. La exposición puede producirse por ingestión, inhalación y absorción cutánea.

Un estudio realizado por Buck Louis *et al.*, no encontraron ninguna asociación significativa entre las concentraciones de plásticos en la orina de mujeres y el tiempo requerido para lograr el embarazo.

Otro estudio realizado por Vélez *et al.*, en una cohorte de 2.001 mujeres embarazadas, tampoco encontró ninguna asociación entre los niveles de plásticos en la orina y el tiempo de embarazo. Pero este estudio presentaba sus limitaciones, las mujeres ya estaban embarazadas cuando se recogió la orina para medir los niveles de plásticos, esta se recogió en el primer trimestre. Por lo tanto, las mujeres infértiles que podrían haber estado expuestas a estas sustancias químicas quedaron excluidas.

Después, se realizaron múltiples estudios que demostraban una asociación entre los plásticos y la infertilidad. Estos estudios se centran en analizar los efectos que ejercían los plásticos sobre los ovocitos en mujeres sometidas a TRA.

Mok-lin *et al.*, en un estudio que incluía a 84 mujeres sometidas a TRA, hallaron una correlación negativa entre los niveles de plástico en orina y la calidad de los

ovocitos. Conforme aumentaban los niveles de plástico en la orina, empeoraba la calidad de los ovocitos. Ehrlich *et al.*, detectaron que, al aumentar los niveles de plástico en orina, disminuía la producción de ovocitos.

Por el contrario, otro estudio de cohorte prospectivos que incluía a 256 mujeres sometidas a fecundación in vitro no encontró ninguna asociación entre los niveles de plástico en la orina y la cantidad de embriones de buena calidad, tasa de implantación, embarazo clínico o tasa de recién nacido vivo. La carencia que presentaba este estudio es que estos plásticos, por ejemplo, el BPA (bisfenol A), en muestras de orina o suero, pueden no reflejar correctamente la ventana de exposición en relación con la foliculogénesis, implantación de embriones o durante el embarazo.

Si que se encontraron diferencias en los resultados sobre la tasa de aborto espontáneo (AR). Las mujeres que presentaban mayor tasa de AR tenían también mayor cantidad de BPA en suero, medido durante el ciclo menstrual perdido (9).

#### 5.5 Hábitos de vida: tabaco y alcohol

El abuso en el consumo de alcohol y tabaco puede tener efectos sobre la fertilidad de una persona. Un estudio realizado por Burton *et al.*, que evaluó a las parejas que intentaban concebir de forma natural durante 12 meses, reveló que las parejas que juntaban 4 factores de estilos de vida adversos lograron un 38% de tasa de recién nacido vivo. Frente al 52% que mostraban las parejas que tenían 3 factores de estilo de vida adversos, el 62% con 2 y el 71% con uno. Y cuando no había ningún hábito de vida adverso la tasa fue del 82%.

Entre los varones se ha demostrado que el tabaquismo reduce la concentración, morfología y motilidad de los espermatozoides. Así como puede producir la fragmentación del ADN. El humo del tabaco contiene varias sustancias como nicotina, metales pesados, y ROS (sustancias reactivas del oxígeno) que como hemos mencionado anteriormente afectan negativamente a la fertilidad.

En mujeres, el tabaquismo según un estudio realizado por Ilacqua *et al.*, puede provocar el engrosamiento de la zona pelúcida lo que dificulta el paso al espermatozoide. Además, se ha demostrado también que en mujeres fumadoras se

ve adelantada la menopausia con respecto a las no fumadoras. El tabaco contiene nicotina y cadmio, los cuales pueden alterar los niveles hormonales en la fase lútea. El tabaquismo en las mujeres altera la función ovárica llegando incluso a agotar su reserva.

En el estudio realizado por Sansone M. *et al.*, en el año 2021 analizaron los niveles hormonales de AMH, FSH e inhibina B (tabla 3) en mujeres fumadoras y no fumadoras. Se incluyeron un total de 401 mujeres de las cuales: 147 fumadoras, 91 no fumadoras que declararon haber dejado de fumar hace más de un año, 69 que no habían fumado nunca y 94 que no habían fumado durante un año. De las fumadoras se excluyeron 13, por lo tanto, quedaron 134 pacientes.

*Tabla 3. Resultados de los niveles de Inhibina B, FSH, AMH y BMI en el grupo de mujeres fumadoras y no fumadoras (10).*

<b>Recurrent miscarriage (350)</b>	<b>Smokers (70)</b>	<b>Non-smokers (91)</b>	<b>p</b>
Inibina B	35.4 ± 3,5 64.4 (53.5-77.8)	35.7 ± 2.5 79.8 (72.8-87.3)	0.431
FSH	5.3 (4.7-6.0)	5.1 (4.8-5.5)	0.781
BMI	21.8 ± 2.4	27.1 ± 3.3	0.058
AMH	0.987 (0,748-1.243)	1.171 (1.035-1.325)	0.047
<b>Infertile (166)</b>	<b>Smokers (70)</b>	<b>Non-smokers (91)</b>	<b>p</b>
Inibina B	34.6 ± 2.1 65.7 (52.3-77.8)	34.8 ± 2.6 76.4 (72.8-87.3)	0.527
FSH	5.3 (4.7-6.0)	4.8 (4.8-5.5)	0.843
BMI	21.8 ± 2.4	27.1 ± 3.3	0.058
AMH	0.995 (0.738-1.253)	1.165 (1.025-1.305)	0.049

No hubo diferencias significativas entre los dos grupos analizados. Sin embargo, los niveles de AMH fueron diferentes. En las fumadoras que habían sufrido abortos recurrentes se encontró un valor de AMH menor, en comparación con las no fumadoras (10) .

El alcoholismo también afecta de forma negativa al embarazo, ejerce efectos perjudiciales sobre el feto como el aborto espontáneo, o los trastornos del espectro alcohólico fetal (TEAF). El alcohol ejerce un efecto de agotamiento sobre muchos nutrientes esenciales en el cuerpo, como la vitamina B, zinc, hierro, magnesio, calcio, etc., muchos de los cuales son esenciales para la función reproductiva.

Además, el alcohol produce un aumento en la síntesis de estrógenos y una disminución en la síntesis de testosterona.

Los efectos que el alcohol puede tener sobre nuestro cuerpo son múltiples. Este disminuye los niveles de hormonas sexuales y la calidad del espermatozoides,

Se ha observado que el consumo crónico de alcohol disminuye los niveles de hormonas sexuales y la calidad del espermatozoides. Y puede modificar la absorción de los aminoácidos, lípidos y azúcares. Un estudio realizado por Emokpae *et al.*, demostró que el consumo crónico de alcohol por encima del 12% aumenta el estrés oxidativo.

Si una mujer durante su embarazo abusa de la ingesta de alcohol, puede sufrir riesgo de aborto, bajo peso al nacer o diversas anomalías congénitas si el embarazo progresa.

Sobre el consumo de alcohol y los tratamientos FIV, existen estudios que han demostrado que el consumo de alcohol perjudica los resultados de los tratamientos de FIV (11).

## **6. Discusión**

En esta revisión se analizan algunas de las probables causas de esterilidad de origen desconocido. Por lo general, si no se identifica una causa conocida debida a una malformación o disfunción física, edad, o enfermedad, se diagnóstica al paciente con esterilidad de origen desconocido. Esta puede deberse al estilo de vida, el cual es muy diferente de un paciente a otro, algo que puede aumentar el sesgo de selección de la población a la hora de realizar un estudio. A la hora de analizar las posibles distintas causas que pueden provocar la esterilidad en una persona, nos fijamos en los factores nutricionales, psicológicos, inmunológicos y ambientales. En el caso de los aspectos nutricionales en esta revisión se analiza el papel de la vitamina D sobre la fertilidad, ya que se ha encontrado al receptor de la vitamina D (VDR) en la membrana de las células de la granulosa.

Los estudios en animales sobre el papel de la vitamina D en la fertilidad, han determinado que esta actúa aumentando la expresión de la FSH y disminuyendo la

de la AMH. Por lo tanto, se ve favorecido el reclutamiento y crecimiento de los folículos. Pero en estudios humanos se vio un efecto inhibitor de la vitamina D sobre ambas hormonas, estos niveles están relacionados con un nivel folicular de maduración, por lo que se disminuye el efecto inhibitor de la AMH y se favorece la independencia de la FSH. La AMH para poder realizar sus funciones tiene que fosforilarse, la vitamina D evita esta fosforilación, impidiendo la acción de la AMH.

Existen pruebas sustanciales, tanto en estudios animales como en humanos que sugieren el papel de la vitamina D en la fisiología reproductiva femenina. La existencia de elementos que responden a la vitamina D en el promotor del gen de la AMH proporciona una base científica que estipula que la vitamina D ejerce sus efectos sobre los niveles de expresión del gen de la AMH.

Sin embargo, los estudios transversales han informado de resultados muy contradictorios en cuanto a la asociación entre la vitamina D en suero y los niveles de AMH sérica. Estos resultados contradictorios probablemente se deban a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, así como a la relación aparentemente no lineal que existe entre la vitamina D y la AMH. En cambio, en la mayoría de los estudios de intervención que examinaron los efectos de la vitamina D sobre los niveles séricos de AMH indican una relación causa-efecto entre la vitamina D y la AMH. La gran conclusión es que los efectos de la vitamina D sobre la AMH dependen del estado ovulatorio de la mujer. Curiosamente, los suplementos de vitamina D parecen disminuir los niveles de AMH en las mujeres anovulatorias con SOP.

En cuanto a los factores psicológicos también muestran discrepancias. Una de ellas es que los individuos pueden no informar con exactitud de su estado mental al completar los cuestionarios psicológicos.

Hubo muchas investigaciones cuyos resultados si mostraban una menor tasa de embarazo en mujeres que sufrían ansiedad o estrés. Esto consiguió demostrarse por ejemplo a través del marcador de estrés  $\alpha$ -amilasa. Este estaba sobreexpresado en mujeres que sufrían estrés, y además tenían una menor tasa de embarazo.

A nivel genético la ansiedad y el estrés pueden causar cambios, hubo diferencias notables en la expresión génica de algunos genes en mujeres que sufrían de estrés

e infertilidad, respecto al grupo control. Esto afecta de manera directa al embarazo, disminuyendo su tasa.

En cuanto a la relación entre el sistema inmune y la maternidad, los estudios han demostrado que los desequilibrios en la inmunidad materna afectan al feto durante el embarazo, pueden iniciarse procesos inflamatorios e infertilidad, especialmente la infertilidad de origen desconocido. Las funciones autoinmunes probablemente influyen en todos los pasos de la fertilidad, desde el fallo ovárico o testicular hasta los fallos de implantación.

Como hemos observado la fertilidad de la mujer depende de que las funciones ováricas y hormonales funcionen de manera correcta. Cualquier desequilibrio a nivel fisiológico puede provocar dificultades para conseguir un embarazo. Las mujeres, como la población en general, se ven afectadas por la contaminación ambiental. Esta provoca la liberación al ambiente de disruptores endocrinos como pueden ser los metales pesados, pesticidas y plastificantes. Los estudios realizados han demostrado que la exposición a metales pesados como, el cadmio y el níquel, son capaces de alterar la producción y función de las hormonas y sus receptores. También incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), afectando así en procesos como la homeostasis hormonal y la calidad de las células germinales y embriones. Por lo tanto, afecta de manera directa al embarazo.

Las consecuencias de la contaminación ambiental para la salud humana siguen siendo objeto de debate y merecen un estudio más profundo.

En cuanto a los pesticidas y los plásticos los resultados son contradictorios. Esto puede deberse a que se han seleccionado diferentes poblaciones de estudio, creando un sesgo de selección (raza/etnia, exposiciones ambientales concurrentes no medidas, mujeres/parejas fértiles frente a infértiles, diagnósticos de infertilidad), métodos de evaluación de la exposición (medición directa vs. recuerdo del sujeto), y/o estudio de diferentes compuestos de pesticidas.

A modo general los hábitos de vida son algo que influye de manera directa sobre nuestra salud, por lo tanto, no queda excluido el tabaquismo y alcoholismo. Se ha demostrado que el consumo de tabaco es uno de los parámetros asociados al agotamiento prematuro de los folículos ováricos, los niveles de AMH son menores en las pacientes fumadoras. El humo del tabaco afecta de manera directa a la



calidad de los ovocitos y, por tanto, a la fertilidad. Con el alcohol, ocurre lo mismo, al disminuir los niveles hormonales, disminuye la reserva ovárica y, por tanto, las posibilidades de conseguir un embarazo. Al disminuir el rendimiento de los ovocitos, disminuye también la tasa de éxito de los tratamientos de FIV.

Con lo anteriormente expuesto se puede afirmar que, aunque los factores analizados en este trabajo que pueden afectar a la fertilidad son importantes, existen numerosas incógnitas que tienen su origen tanto en el diseño de los estudios, como en el escaso conocimiento que aún tenemos de los mecanismos que pueden causar la esterilidad. Por lo que es cada vez más clara la importancia que tiene realizar más y nuevos estudios, que nos permitan aclarar la relación de estos y otros factores con la esterilidad humana de manera independiente o mediante complejos mecanismos de interrelación entre dos o más factores tanto conocidos como nuevos factores aún no descritos por la literatura.

## 7. Conclusiones

- La vitamina D ejerce un efecto inhibitor sobre la expresión del receptor de la AMH y FSH en las células de la granulosa. Por lo que disminuye el efecto inhibitor de la AMH, pero también el crecimiento y reclutamiento de folículos. Algo que tiene un efecto positivo sobre las mujeres que padecen el síndrome del ovario poliquístico.
- Se ha relacionado a las mujeres que sufrían estrés y ansiedad con una menor tasa de embarazo. De hecho, se han encontrado diferencias en la expresión genética, lo cual afecta de manera directa.
- Las células Treg tienen una función reguladora a la hora de promover la tolerancia a antígenos propios y ajenos, por lo tanto, tienen una implicación en el mantenimiento de la tolerancia materna a los alógenos fetales.
- Los disruptores endocrinos como son los metales pesados, pesticidas y plastificantes pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y bloquearse ciertos receptores hormonales. La generación de ROS se ha asociado con alteraciones reproductivas y del embarazo. En los hombres se ha asociado ROS a una baja motilidad espermática.
- El alcoholismo y el tabaquismo influye de manera negativa sobre la tasa de embarazo y de recién nacido vivo. Tanto en mujeres que se han sometido a tratamientos FIV como en las que no.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Moridi I, Chen A, Tal O, Tal R. The Association between Vitamin D and Anti-Müllerian Hormone: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2020 May 28;12(6):1567. doi: 10.3390/nu12061567. PMID: 32481491; PMCID: PMC7352921 (1).
2. Zhao J, Huang X, Xu B, Yan Y, Zhang Q, Li Y. Whether vitamin D was associated with clinical outcome after IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Feb 9;16(1):13. doi: 10.1186/s12958-018-0324-3. PMID: 29426322; PMCID: PMC5807754.
3. Rooney KL, Domar AD. The relationship between stress and infertility. *Dialogues Clin Neurosci*. 2018 Mar;20(1):41-47. doi: 10.31887/DCNS.2018.20.1/klooney. PMID: 29946210; PMCID: PMC6016043.
4. Gdańska P, Drozdowicz-Jastrzębska E, Grzechocińska B, Radziwon-Zaleska M, Węgrzyn P, Wielgoś M. Anxiety and depression in women undergoing infertility treatment. *Ginekol Pol*. 2017;88(2):109-112. doi: 10.5603/GP.a2017.0019. PMID: 28326521.
5. Litzky JF, Marsit CJ. Epigenetically regulated imprinted gene expression associated with IVF and infertility: possible influence of prenatal stress and depression. *J Assist Reprod Genet*. 2019 Jul;36(7):1299-1313. doi: 10.1007/s10815-019-01483-0. Epub 2019 May 24. PMID: 31127477; PMCID: PMC6642239.
6. Ehsani M, Mohammadnia-Afrouzi M, Mirzakhani M, Esmaeilzadeh S, Shahbazi M. Female Unexplained Infertility: A Disease with Imbalanced Adaptive Immunity. *J Hum Reprod Sci*. 2019 Oct-Dec;12(4):274-282. doi: 10.4103/jhrs.JHRS\_30\_19. Epub 2019 Dec 17. PMID: 32038075; PMCID: PMC6937763.

7. Huang N, Chi H, Qiao J. Role of Regulatory T Cells in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Healthy Pregnancies and Reproductive Diseases. *Front Immunol.* 2020 Jun 26;11:1023. doi: 10.3389/fimmu.2020.01023. PMID: 32676072; PMCID: PMC7333773.
8. Szkodziak F, Krzyżanowski J, Szkodziak P. Psychological aspects of infertility. A systematic review. *J Int Med Res.* 2020 Jun;48(6):300060520932403. doi: 10.1177/0300060520932403. PMID: 32600086; PMCID: PMC7328491.
9. Lorzadeh N, Kazemirad N, Kazemirad Y. Human immunodeficiency: Extragonadal comorbidities of infertility in women. *Immun Inflamm Dis.* 2020 Sep;8(3):447-457. doi: 10.1002/iid3.327. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32621331; PMCID: PMC7416027.
10. Otani-Matsuura A, Sugiura-Ogasawara M, Ebara T, Matsuki T, Tamada H, Yamada Y, Omori T, Kato S, Kano H, Kaneko K, Matsuzaki K, Saitoh S, Kamijima M; Japan Environment and Children's Study Group. Depression symptoms during pregnancy and postpartum in patients with recurrent pregnancy loss and infertility: The Japan environment and children's study. *J Reprod Immunol.* 2022 Aug;152:103659. doi: 10.1016/j.jri.2022.103659. Epub 2022 Jun 26. PMID: 35803114.
11. Singh L, Anand M, Singh S, Taneja A. Environmental toxic metals in placenta and their effects on preterm delivery-current opinion. *Drug Chem Toxicol.* 2020 Sep;43(5):531-538. doi: 10.1080/01480545.2018.1515216. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30257569.
12. Adam, K. M., Abdaltam, S. A., Noreldeen, A. M., & Alseed, W. A. (2015). Relationship between maternal blood lead, cadmium, and zinc levels and spontaneous abortion in Sudanese women. *Public Health Research*, 5(6), 171-176.

13. Canipari R, De Santis L, Cecconi S. Female Fertility and Environmental Pollution. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Nov 26;17(23):8802. doi: 10.3390/ijerph17238802. PMID: 33256215; PMCID: PMC7730072.
14. Lee S, Min JY, Min KB. Female Infertility Associated with Blood Lead and Cadmium Levels. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Mar 10;17(5):1794. doi: 10.3390/ijerph17051794. PMID: 32164251; PMCID: PMC7084729.
15. Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, Flaws JA. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J Endocrinol*. 2017 Jun;233(3):R109-R129. doi: 10.1530/JOE-17-0023. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28356401; PMCID: PMC5479690.
16. Vessa B, Perlman B, McGovern PG, Morelli SS. Endocrine disruptors and female fertility: a review of pesticide and plasticizer effects. *F S Rep*. 2022 Apr 15;3(2):86-90. doi: 10.1016/j.xfre.2022.04.003. PMID: 35789730; PMCID: PMC9250118.
17. Manouchehri A, Shokri S, Pirhadi M, Karimi M, Abbaszadeh S, Mirzaei G, Bahmani M. The Effects of Toxic Heavy Metals Lead, Cadmium and Copper on the Epidemiology of Male and Female Infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2022 Aug 1. doi: 10.5935/1518-0557.20220013. Epub ahead of print. PMID: 35916450.
18. Sansone M, Zaami S, Cetta L, Costanzi F, Signore F. Ovotoxicity of smoking and impact on AMH levels: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Aug;25(16):5255-5260. doi: 10.26355/eurrev\_202108\_26545. PMID: 34486701.
19. De Angelis C, Nardone A, Garifalos F, Pivonello C, Sansone A, Conforti A, Di Dato C, Sirico F, Alviggi C, Isidori A, Colao A, Pivonello R. Smoke, alcohol and drug addiction and female fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020 Mar 12;18(1):21. doi: 10.1186/s12958-020-0567-7. PMID: 32164734; PMCID: PMC7069005.

20.Emokpae MA, Brown SI. Effects of lifestyle factors on fertility: practical recommendations for modification. *Reprod Fertil.* 2021 Jan 8;2(1):R13-R26. doi: 10.1530/RAF-20-0046. PMID: 35128442; PMCID: PMC8812443.