



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**“EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL ÉXITO  
EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LOS  
TRATAMIENTOS DE REPRODUCCION  
ASISTIDA”**



**AUTOR DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER:**

**Sandra Rodríguez Rodero**

**TUTOR:**

**Miguel García Fernández**

**Dra. Paula Núñez Martínez**

**Julio 2022**

## INDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	4
AGRADECIMIENTOS .....	6
ABREVIATURAS .....	8
INTRODUCCION .....	10
1.Fisiología del Estrés .....	14
2.Papel del eje HHA en la Reproducción.....	19
3.Efecto Biológico del Estrés en los ejes neuroendocrinos de la reproducción	20
Influencia de CRH en la supresión del eje HHG por estrés.....	21
Papel del GABA en la inhibición de la liberación de GnRH por estrés. ....	23
Kisspeptina e inhibición del eje HHG en respuesta al estrés. ....	23
Papel de la hormona inhibidora de Gonadotropinas (GnIH) en la supresión de la vía de señalización de GnRH por estrés.....	24
Efecto del estrés sobre la hipófisis y las gónadas. ....	24
Efecto de las catecolaminas sobre las gónadas. ....	26
4.Prolactina y Estrés.....	27
Expresión de prolactina por el ovario .....	29
Expresión de prolactina por la decidua .....	29
Prolactina & Sistema Inmune.....	30
5.Estrés, Sistema Inmune & Fertilidad .....	32
Acción de las hormonas sexuales femeninas sobre el sistema inmunológico .....	33
HIPÓTESIS & OBJETIVOS .....	39
JUSTIFICACION .....	39

---

HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS .....	39
MATERIAL & MÉTODOS.....	40
1.Cohorte del Estudio.....	40
2. Consideraciones Éticas.....	41
3. Estimulación & Punción Ovárica.....	41
4.STAI: State-Trait Anxiety Inventory/Self Evaluation Questionnaire.....	42
5.Determinacion de los niveles de hormonas en sangre y liquido folicular.....	43
6.Analisis Estadístico de los datos .....	44
RESULTADOS.....	45
1.Estudio descriptivo de las variables analizadas en la población.....	45
2.Efecto de la determinación de los valores de estrés y ansiedad sobre el resultado de los ciclos.....	48
3.Efecto de la determinación de los valores de estrés y ansiedad sobre los valores hormonales en folículos y sangre.....	54
4.Relación entre los resultados del ciclo de estimulación y los valores hormonales en folículos y sangre. ....	58
DISCUSION .....	61
LIMITACIONES .....	68
CONCLUSIONES .....	69
ANEXOS .....	70
BIBLIOGRAFIA .....	71

---

## RESUMEN

La infertilidad implica una carga mental muy pesada al exigir un equilibrio con el trabajo, las citas médicas, realización de pruebas, los tratamientos (inyecciones, punciones), toma de decisiones importantes, a veces no compartidas por la pareja, que afectan a puntos cruciales de la vida. Esta situación, lleva asociada una elevada carga mental que no suele ser comunicada y que trae mucha angustia, preocupación, por lo que frecuentemente vendrá acompañada del desarrollo de trastornos psicológicos como son la ansiedad y la depresión. En el presente trabajo, a un grupo de 11 mujeres sometidas a tratamiento de estimulación ovárica y posterior punción, se les cuantificó el nivel de estrés-ansiedad mediante el test STAI E/R y se analizaron los resultados del ciclo, así como los niveles de cortisol y prolactina en sangre y líquido folicular. Se han encontrado asociaciones estadísticamente significativas entre las variables que determinaban el grado de estrés y algunos de los parámetros de resultados del ciclo, así como en los valores de las hormonas analizadas. Los resultados de este trabajo si bien manifiestan influencia entre el grado de estrés y algunos de los parámetros que determinan el resultado del ciclo, se pone de manifiesto la necesidad de ampliar estos análisis a grupos poblacionales más extensos.

Palabras Clave: Cortisol, estrés, infertilidad, líquido folicular, prolactina

## ABSTRACT

Infertility involves a very heavy mental burden. Assisted reproduction treatments require a balance with work, medical appointments, tests that can be endless, the treatments themselves (injections, punctures) or making important decisions, sometimes not shared by the couple, which affect crucial points in life. This is associated with a high mental burden that is not usually shared and brings a lot of anguish and worry, which is often associated with the development of psychological disorders such as anxiety and depression. In this study, a group of 11 women undergoing ovarian stimulation treatment and subsequent puncture, the stress-anxiety level was quantified by means of the STAI E/R test and the results of the IVF cycle were analysed. Cortisol and prolactin values in blood and follicular fluid were also quantified. Statistically significant associations were found between the variable that determined the degree of

---

stress and some of the parameters of the cycle results, as well as in the values of the hormones analysed. Although the results of this study show an influence between the level of stress and certain parameters that determine the outcome of the cycle, these analyses need to be extended to larger population groups.

Key words: Cortisol, stress, infertility, follicular fluid, prolactin.

---

## AGRADECIMIENTOS

• A la Dra. Alicia Francos, Miguel, Carmen, Lucia, Marian, Arancha, Elena y Matilde, personal de la Clínica EMBY por su contribución a la realización de este TFM y el haberme permitido el desarrollo de este en su centro: Además de sus enseñanzas durante las practicas, me llevo un grato recuerdo del trabajo en equipo y de cada uno de ellos.

• A la Dra. Paula Núñez que junto con Miguel García han tutorizado este TFM.

• A todas las pacientes que han colaborado de manera voluntaria en este estudio.

• Se agradece el apoyo recibido por parte de la Unidad de Consultoría Estadística de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

• A mi familia y a mis amigos porque me han dado la fuerza para continuar.

---

*” Casi todas las mujeres suponen que van a poder tener hijos algún día, aun cuando no estén seguras de desearlo; la capacidad de tenerlos es importante incluso para mujeres que no tienen la intención de utilizarla nunca. La capacidad de concebir y parir puede influir enormemente en cómo se siente la mujer consigo misma en un plano muy profundo. Así pues, cuando una mujer descubre que es incapaz de tener un hijo, suele caer en una gran desesperación y lo siente como una injusticia: “¿Por qué yo?”*

**CUERPO DE MUJER, SABIDURÍA DE MUJER (Northrup, 2007, págs. 459-460)**

*“Ser una mujer infértil es ser madre primero con el corazón y con el alma antes que con el cuerpo”*

*A todas las madres invisibles*

---

## ABREVIATURAS

**A:** Adrenalina

**ACTH:** Adrenocorticotropic hormone. Adrenocorticotropina

**AMH:** anti-Müllerian hormone. Hormona antimülleriana

**CBG:** Corticosteroid binding globulin. Globulina fijadora de corticosteroides

**CMN:** células mononucleares

**CRF o CRH:** Corticotropin releasing factor/hormone. Hormona/Factor liberador de Corticotropina

**CRH-R1/ CRH-R2:** Receptor para CRH tipo 1/ receptor para CRH tipo 2

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**Gal-1:** Galectina 1

**GM-CSF:** Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos

**GnIH:** Hormona inhibidora de gonadotropinas

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**hCG :** Gonadotropina coriónica humana

**HHA:** Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

**HHG:** Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal

**IGF:** Factores de crecimiento tipo insulina

**IL-1:** Interleuquina 1

**MHC-I:** Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

**MHC-II:** Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

**NKT:** Células T natural killer

**20 $\alpha$ -HSD:** 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

**IDO:** Enzima indolamina 2, 3-dioxigenasa

**iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible

**IRF-1:** Factor de transcripción regulador del interferón 1

**LAK:** Actividad asesina inducida por linfoquinas

**LH:** hormona luteinizante

**NA:** Noradrenalina

---

**NCRs:** Natural cytotoxicity receptors. Receptores naturales de citotoxicidad

**PIBF:** Progesterone-induced blocking factor. Factor de bloqueo inducido por progesterona

**PIGF:** Factor de crecimiento de placenta

**PP14:** Proteína endometrial asociada a Progesterona 14. Glicodelina A

**PRL:** Prolactina

**RA:** Reproducción asistida

**SMA:** Eje simpático-médulo-adrenal

**TGF- $\beta$ 1:** Transforming growth factor  $\beta$ . Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$

**Th:** Linfocitos T-helper

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alpha

**Treg:** Células T reguladoras

**TRA:** Tratamientos de reproducción asistida

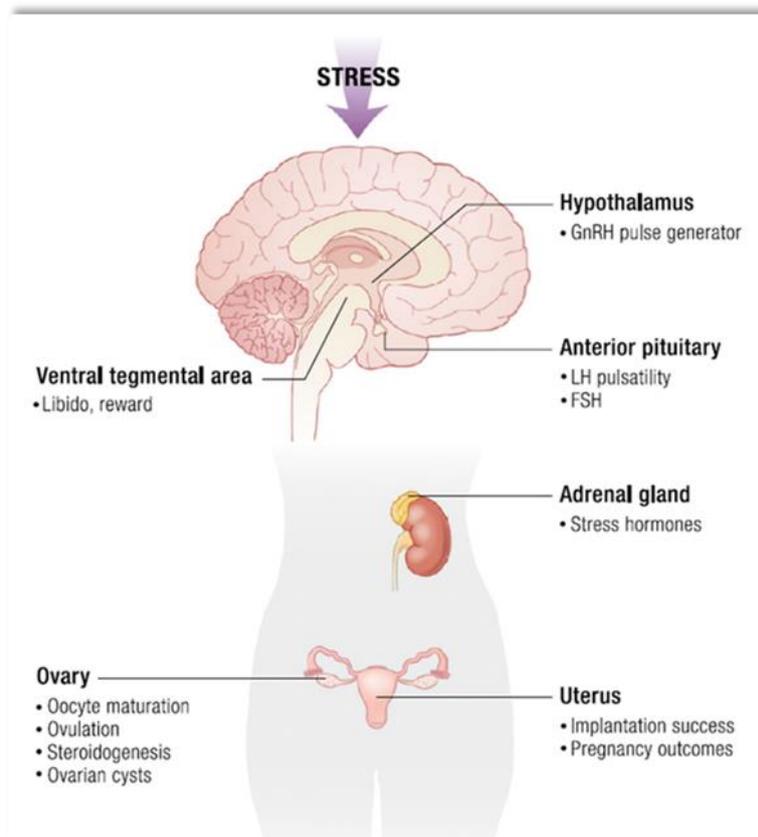
**TSH:** Thyroid-Stimulating Hormone. Hormona tiroestimulante, tirotropina.

**uNK:** Células Natural Killer especializadas del útero

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular

## INTRODUCCION

¿El estrés materno está relacionado con el fracaso reproductivo? Esta pregunta está en el centro de un debate científico enmarcado entre los que consideran que las pérdidas reproductivas (fallo de implantación, aborto espontáneo o muerte fetal) son puramente biológicas o, por el contrario, se pueden prevenir, porque una proporción importante de estas pérdidas ocurren con cariotipos fetales normales que están expuestos a problemas ambientales y psicosociales adversos. Por lo que la hipótesis de que la exposición al estrés podría conducir al fracaso del embarazo cada vez adquiere más importancia (**Figura 1**).



**Figura 1. El estrés influye en la función reproductiva en diferentes niveles.** *El estrés puede interferir en la función reproductiva en todos los niveles del eje reproductivo. Puede suprimir la libido, la recompensa y el comportamiento de apareamiento a nivel del cerebro, especialmente en el área tegmental ventral. Interfiere con el generador de impulsos hipotalámicos, el generador de impulsos de GnRH y la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior. Suprime la maduración de los ovocitos, la ovulación a nivel de las gónadas, incrementa la probabilidad de desarrollar quistes ováricos y afecta a la síntesis de hormonas sexuales (esteroidogénesis) a nivel de ovario y testículos. El estrés también es perjudicial para los resultados de la gestación, reduciendo la probabilidad de implantación exitosa del blastocisto. Adaptado de Sominsky et al<sup>1</sup>*

Los tratamientos de reproducción asistida (TRA) representan para muchas parejas o mujeres solteras diagnosticadas con infertilidad, la oportunidad de tener un hijo; no obstante, estos procedimientos médicos representan un viaje largo y difícil que a menudo pueden implicar múltiples fallos y la no consecución del resultado esperado<sup>2-4</sup>. Vienen acompañados de procesos estresantes puntuales como: inyecciones diarias, extracción de muestras de sangre, cambios hormonales, pruebas invasivas (histeroscopias, histerosalpingografías, punciones ováricas, cirugías laparoscópicas) y espera de resultados. Pero la infertilidad también puede manifestar consecuencias psicológicas negativas y una disminución de la calidad de vida y bienestar<sup>5</sup>. Este estado psicológico inadecuado no sólo puede reducir la tasa de embarazo tras una FIV y posterior transferencia embrionaria, también puede tener efectos adversos en el resultado del embarazo<sup>6</sup>. La mujer es quien lleva el mayor peso de todo el proceso. Suele ser quien presenta una reducción de su calidad de vida, mayor estrés psicológico (angustia emocional, ansiedad y depresión) lo que provoca en la mayoría de los casos junto con la causa económica, el abandono de los tratamientos tras los repetidos fracasos<sup>7,8</sup>.

Además de los estresores asociados a estas técnicas de reproducción asistida, hemos de tener en cuenta otros factores que se suman a los anteriores. El avance de nuestra sociedad donde la mujer se ha incorporado a la vida laboral, incrementándose sus posibilidades de formación y desarrollo profesional, se enfrenta con la realidad de que la fisiología femenina no ha evolucionado de igual manera. Las mujeres seguimos naciendo con una reserva ovárica limitada que a partir de los 35-38 años empieza a descender. Edad, en la que las mujeres nos encontramos en nuestro mejor momento personal, social, laboral y familiar pero no la más adecuada para concebir hijos. Los hombres también se ven afectados emocionalmente por la incapacidad de no tener hijos. Las técnicas actuales de diagnóstico nos han permitido conocer que el origen de la infertilidad recae en un 40% sobre cada miembro de la pareja y el 20% restante son otras causas, a menudo identificadas como infertilidad de origen desconocido o una combinación de factor masculino y femenino de manera simultánea<sup>9,10</sup>. Todo esto tiene una enorme repercusión en la relación de pareja, donde se incrementan las discusiones, se alteran las relaciones sexuales que pierden la espontaneidad para ser destinadas principalmente a la procreación, aparición de disfunciones sexuales o pérdida de deseo.

Todo ello contribuye aún más al incremento de la carga emocional y a una pérdida de autoestima, que se eleva a medida que se alargan los TRA. La angustia, la inquietud y los pensamientos repetitivos acerca de la incapacidad para tener hijos, la invalidez como hombre o mujer y la culpabilidad reducen considerablemente el equilibrio emocional y el autoconcepto personal y de la pareja. Si a lo anterior sumamos acontecimientos pasados, como el retraso de la maternidad por una carrera profesional, abortos voluntarios, que no tendrían relación con la fertilidad pero que contribuyen a generar ideas irracionales, son factores que suman más presión a la situación en la que se encuentran quienes padecen infertilidad.

A medida que se avanza en el tiempo y en el número de tratamientos, sentimientos que forman parte de las etapas del duelo como: la frustración, impotencia, pena, ira, culpa, irán surgiendo en los pacientes de reproducción asistida (RA) como una repercusión emocional de todo el proceso por el que están atravesando y que a menudo desembocan en estados de ánimo ansioso-depresivos que conducen a la pérdida de la capacidad de disfrutar de cualquier actividad cotidiana o puntual<sup>11</sup>. La dificultad para quedarse embarazada o llevar un embarazo a término, desencadena la aparición de otras patologías asociadas a una somatización de los procesos de estrés como: alteraciones del sueño, del apetito, dolores musculares, dolor de espalda, bruxismo, alteraciones gastrointestinales, infecciones recurrentes, sensación de cansancio generalizado, todos ellos síntomas y signos de un estrés prolongado en el tiempo (distrés)<sup>12,13</sup>.

A los condicionantes anteriores, hemos de sumar los sociales, la presión ejercida por las familias de la pareja o de las mujeres solteras. Generalmente las familias suelen ser un apoyo cuando se les involucra en los procesos de RA, algo que las parejas suelen tardar en hacer, pero en ocasiones pueden ser causa de más estrés porque no entienden los plazos de los tratamientos, las pruebas y en ocasiones vienen acompañados de reproches o de peticiones de abandono del proceso por parte de la pareja.

Frecuentemente la infertilidad es un tabú que sólo se comparte con un número reducido de personas e incluso queda limitado al ámbito de la pareja exclusivamente. Las amistades, que son el apoyo social necesario en el proceso, también son el motivo de aislamiento de muchas parejas que al compartir proyectos similares vitales les es difícil lidiar con el éxito reproductivo de estas, las preguntas incómodas por su parte y

el recuerdo constante de su “incapacidad” por conseguir algo que aparentemente es sencillo.

El trabajo puede ser otro elemento estresor. Suele generar bastante tensión a las mujeres, dado que se considera que en el momento que sean madres no van a poder seguir siendo igual de profesionales que antes de serlo, no dispondrán de la dedicación exclusiva que a menudo se les pide en determinados puestos de trabajo y generalmente planea el miedo del despido, con la consecuencia presión de la inestabilidad económica. Este miedo se acentúa en mujeres que se acercan a la maternidad sin pareja. El trabajo es necesario para tener una casa, comer, vestirse y también para tener un hijo. Además, cuando se inician las pruebas diagnósticas y los tratamientos, es frecuente la necesidad de ausentarse del trabajo de manera reiterada para acudir a las unidades de reproducción, lo que repercute negativamente a nivel laboral, dado que algunas empresas no están de acuerdo con esas ausencias, por lo que las parejas frecuentemente lo ocultan e intentan cuadrar horarios en periodos de vacaciones o recuperando los días solicitados con largas jornadas laborales que conducen al agotamiento físico. Aspecto este que tampoco ayuda en la posibilidad de procrear, puesto que muchas parejas manifiestan que después de largas jornadas de trabajo cuando llegan a casa no tienen ganas de mantener relaciones aun cuando los días sean los propicios. El deseo de tener un hijo puede convertirse en una tarea más a realizar en el día, y como podemos suponer, no es la mejor manera para conseguirlo.

Hemos de ser conscientes que la infraestructura material y emocional de las personas que recurren a los TRA está afectada por una gran variedad de elementos, no sólo los propios tratamientos, sino también la presión social, económica, la necesidad de combinar el éxito profesional con el éxito personal. Todos ellos, factores que contribuyen al desarrollo de un estrés en los pacientes de RA y que frecuentemente no es tenido en cuenta en las primeras citas con los profesionales de las unidades, puesto que si algo es necesario para incrementar las probabilidades de consecución de un embarazo es energía, una buena relación afectiva con las personas que constituyen tu red social o familiar y las necesidades básicas aseguradas durante los siguientes nueve meses. Si esto no está equilibrado las probabilidades de éxito se reducen considerablemente<sup>14-18</sup>.

## 1. Fisiología del Estrés

Un factor estresante puede considerarse a un estímulo intenso, que desafía nuestra homeostasis y que desencadena una respuesta no específica que incluye la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) que será responsable de la liberación de glucocorticoides y la activación del eje simpático-médulo-adrenal (SMA), que da lugar a la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Existen innumerables tipos de estrés en función de cómo se clasifiquen: el estrés físico (mediado por factores: interoceptivos, homeostáticos, sistémicos) que implica una perturbación inmediata de la integridad del tejido y una activación específica de la amígdala central, de las células noradrenérgicas del tronco encefálico rostral, del eje HHA y del SMA. El estrés psicológico (neurogénico, psicógeno, emocional) basado en respuestas innatas programadas o en experiencias previas, implica una amenaza a la alteración de los tejidos en lugar de una lesión directa y una activación de las células noradrenérgicas de la amígdala media y caudal<sup>19</sup>.

Con relación a la intensidad o duración, podemos distinguir entre estresores agudos (intensos y de corta duración) o un estrés crónico (cuya presencia se extiende en el tiempo). El primero suele tener manifestaciones alérgicas (asma, urticarias, eccemas, síntomas gastrointestinales), mientras que el segundo puede cursar con manifestaciones físicas como las anteriormente citadas, pero también con alteraciones del comportamiento (ansiedad, depresión), trastornos metabólicos (obesidad, diabetes mellitus tipo 2), cardiovasculares (hipertensión, infarto de miocardio) y trastornos del sueño<sup>20</sup>.

Ante un estímulo estresante, en cuestión de segundos, tanto el estrés físico como el psicológico activan el SMA, que conduce a la liberación adrenalina (A) y noradrenalina (NA) que aumentan la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la respiración y los niveles de glucosa en sangre para dar respuesta a esa situación. A continuación, se produce la activación del eje HHA (**Figura 2**), el procesamiento del estímulo tiene lugar en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. Este núcleo alberga las neuronas clave que controlan el nivel de activación del eje HHA, la regulación del metabolismo, el crecimiento y las funciones inmunes, así como el control preautonómico de las funciones gastrointestinales, cardiovasculares y renales<sup>21</sup>. En el

NPV, se localizan neuronas que envían sus axones al sistema portal-hipofisario que inducen la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF o CRH: corticotropin releasing factor/hormone) desde el hipotálamo al sistema portal hipofisario, para ser conducidos a la hipófisis anterior, donde estimulará la síntesis y liberación de otra hormona, la adrenocorticotropina (ACTH; adrenocorticotropic hormone) que viajará a través de la circulación sanguínea hasta las glándulas suprarrenales, actúa sobre los receptores de melanocortina-2 induciendo la liberación de corticosterona (cortisol en humanos, corticosterona en ratas y ratones) a los 20 min de la exposición al estímulo por la corteza adrenal y de catecolaminas (A y NA) por la medula adrenal, que constituyen las denominadas “hormonas del estrés”<sup>22</sup>.

Este cortisol liberado, contribuirá al incremento de la frecuencia cardiaca, la presión arterial y los niveles de glucosa en sangre como se ha indicado anteriormente<sup>23</sup>. Los glucocorticoides ejercen su acción a través de receptores específicos: los receptores de mineralocorticoides (MR) o de alta afinidad (tipo I) y receptores de glucocorticoides (GR) de baja afinidad (aproximadamente 10 veces inferior a los MR) (tipo II). En condiciones basales donde los niveles de corticoides son bajos, estos ejercen sus efectos principalmente activando receptores MR, mientras que cuando los niveles son altos (durante la respuesta a estrés) se unen a receptores de tipo GR<sup>19</sup>. Al tener una naturaleza lipofílica, los corticoides pueden atravesar la barrera hematoencefálica y acceder a diferentes regiones del cerebro donde ejercerán sus funciones a través de sus receptores citoplasmáticos modificando la transcripción de genes específicos<sup>24,25</sup>.

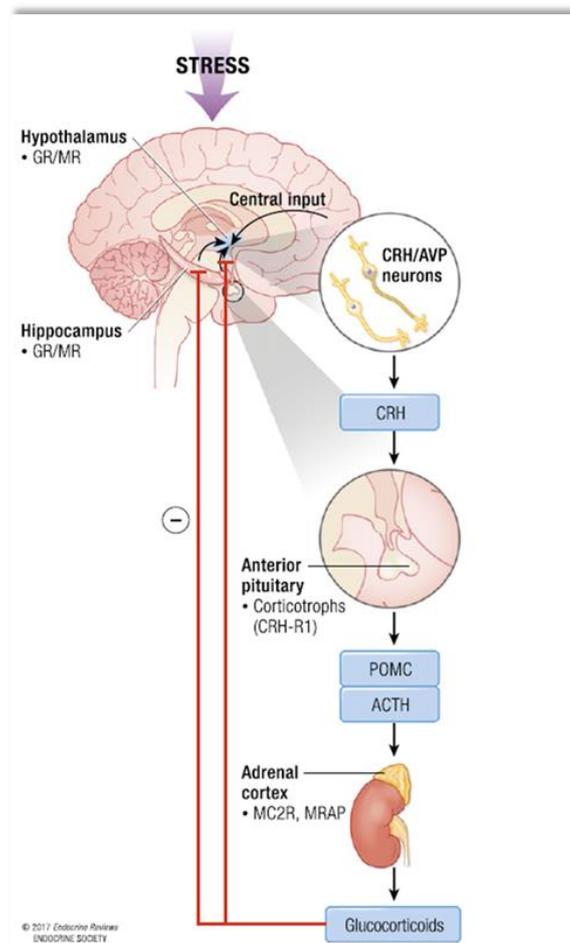
La acción de los glucocorticoides a corto plazo es beneficiosa para los organismos por sus efectos sobre la respuesta adaptativa a estrés, favoreciendo la supervivencia. Sin embargo, la exposición prolongada a estas hormonas puede causar diversas alteraciones conductuales y cognitivas (depresión, ansiedad), además de patologías relacionadas con el sistema inmunológico y estrés crónico. Los glucocorticoides ejercen una inhibición sobre el eje HHA a nivel de la hipófisis anterior, el NPV y determinadas estructuras extra-hipotalámicas, como la formación hipocampal y la corteza prefrontal medial, para volver a la situación de reposo inicial<sup>22</sup>.

En ratas existen diferencias de sexo con relación a la respuesta del eje HHA frente al estrés. Las hembras suelen manifestar una respuesta neuroendocrina más robusta

frente a un estrés agudo, con una mayor liberación de cortisona y ACTH que los machos, tras la exposición a diferentes factores estresantes<sup>26-28</sup>. Este sesgo sexual se observa a todos los niveles del eje HHA, a nivel del NPV, su activación como respuesta a factores estresantes se determina por la expresión de genes tempranos como c-fos, siendo esta superior en hembras que en machos<sup>29,30</sup>. Se ha demostrado que las ratas hembra, presentan mayores niveles de mRNA mensajero de CRH y de vasopresina en el NPV, así como del precursor de la ACTH, la proopiomelanocortina (POMC) en respuesta a estrés<sup>29-31</sup>. Además de esta respuesta hormonal superior por parte de las hembras, también presentan mayor retraso en alcanzar los niveles basales de ACTH y de cortisona tras una situación de estrés agudo, lo que pone de manifiesto diferencias con relación a la regulación por retroalimentación negativa del eje HHA. Esto parece ser consecuencia de una menor activación de las regiones inhibitoras en la corteza frontal, corteza cingulada, corteza piriforme e hipocampo que participan en esta retroalimentación negativa<sup>29,30,32</sup>. Se han observado diferencias en relación con los mecanismos de retroalimentación por los glucocorticoides en ratas hembra y macho lo que implicaría diferencias en los mecanismos de retroalimentación negativa. La unión a glucocorticoides es más baja en el hipotálamo de las ratas hembra frente a las ratas macho, lo que sugiere que estas tienen menor densidad de receptores hipotalámicos para corticosteroides<sup>33</sup>. A nivel de hipófisis también se observa una expresión reducida en las hembras de receptores hipotalámicos de corticosteroides<sup>33</sup> (receptores MR y GR) en comparación con los machos<sup>34</sup>, de manera que los machos en respuesta a estrés incrementan los niveles de mRNA de estos receptores pero no en las hembras<sup>35</sup>.

La disponibilidad de corticosteroides en las regiones del cerebro que modulan la función del eje HHA también presenta diferencias entre machos y hembras. Después de su liberación de la glándula suprarrenal, la mayoría de los corticosteroides están unidos a la globulina fijadora de corticosteroides (CBG), una glicoproteína producida por el hígado<sup>36</sup>. El papel del CBG es la de proteger a los corticosteroides de la degradación durante su transporte por el plasma hacia los tejidos diana<sup>36</sup>. Al llegar al su destino, la CBG libera corticosteroides<sup>37</sup>, para que estos puedan unirse a sus receptores intracelulares<sup>37</sup>, regulándose de este modo la cantidad de corticosteroides disponibles para ejercer sus funciones mediante la proteína CBG. Es importante hacer la distinción entre la cantidad de cortisol total y cortisol “libre” en plasma al considerar las

diferencias de sexo en la actividad del eje HHA<sup>37</sup>. En el caso de las hembras el aumento en los niveles de CBG (aproximadamente el doble) como respuesta al estrés puede ser la causa de que exista menos cortisol libre para ejercer el efecto de retroalimentación negativa sobre el HHA<sup>38</sup>. Por el contrario, en los machos la proteína CBG está regulada negativamente por la acción del estrés, lo que permite que el cortisol se encuentre en forma libre y pueda llevar a cabo el proceso de retroalimentación negativa en comparación con las hembras<sup>38</sup>.



**Figura 2. Eje HHA.** La acción de un agente estresor, las neuronas CRH y AVP (arginina vasopresina) del hipotálamo reciben información de diferentes regiones del cerebro (la amígdala, el tronco encefálico y la corteza prefrontal) estimulándose la liberación de CRH por el hipotálamo. Este CRH, actúa sobre la adenohipófisis a través del receptor CRH tipo 1 (CRH-R1), que conduce a la liberación de ACTH en la circulación, una hormona peptídica derivada de la pro-opiomelanocortina (POMC). Esta ACTH viaja a través del sistema circulatorio hacia las glándulas suprarrenales donde estimula la liberación de glucocorticoides que ejercerán funciones sobre la regulación de los niveles de glucosa sanguíneos, movilización o almacenamiento de las reservas de grasa, efectos sobre la memoria, incremento de la actividad cardiovascular y represión del sistema inmune, reproductivo y digestivo, además de otras estrategias para afrontar la situación de estrés. Estos glucocorticoides ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre el propio eje HHA y los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides en el hipotálamo e hipocampo para suprimir la acción de este y recuperar el equilibrio previo al estrés. Adaptado de Sominsky et al<sup>1</sup>.

En humanos, como en los modelos murinos también se han observado diferencias de sexo en la respuesta al eje HHA frente al estrés y son dependientes de la edad. Aunque los hallazgos no son siempre consistentes. Antes de la pubertad, los ratones macho y hembra presentan diferencias en relación a su respuesta al estrés, al igual que ocurre en los niños y niñas<sup>39,40</sup>. Mientras que en la adolescencia y la edad adulta, los ratones macho presentaban una respuesta menor del eje HHA frente al estrés en comparación con las hembras, en humanos estos hallazgos son menos consistentes<sup>36,41</sup>. Algunos estudios proponen una mejor respuesta al estrés del eje HHA en mujeres adultas en comparación con los varones y otros manifiestan lo contrario<sup>42,43</sup>. Estas diferencias podrían ser consecuencia del tipo de factores estresante, la edad, el estado de salud general o la fase del ciclo menstrual de la mujeres<sup>44</sup>. Diversos trabajos han analizado la respuesta al estrés de las mujeres en las diferentes fases del ciclo menstrual, en comparación con los hombres. Así pues, se ha observado que en la fase folicular del ciclo menstrual con menor nivel de estrógenos las mujeres presentaban valores diferentes de cortisol en saliva que los hombres cuando eran sometidas a situaciones de estrés, sin embargo, estas diferencias no se observaban si la exposición tenía lugar en la fase lútea del ciclo<sup>45</sup>. Lo que parece sugerir el posible papel de los estrógenos y a progesterona en la regulación de la respuesta al estrés de las mujeres a lo largo del ciclo menstrual, algo que se había observado en ratas anteriormente<sup>46,47</sup>.

Es importante destacar que este efecto diferencial de la respuesta al estrés en las mujeres puede tener consecuencias a nivel de descendencia, dado que se ha demostrado que durante el inicio de la gestación, exposición al estrés materno y/o ambiental produce más resultados adversos en la descendencia masculina que en la femenina<sup>48,49</sup>, por lo que será más frecuente trastornos del neurodesarrollo, del espectro autista e hiperactividad por déficit de atención en los niños que en las niñas, mientras que en estas últimas, la exposición a eventos adversos en edades tempranas las predispone a un mayor riesgo de trastornos de tipo afectivo como pueden ser la depresión o la ansiedad<sup>50</sup>. Esto pone de manifiesto la necesidad, a la hora de abordar los problemas derivados del estrés, la diferente respuesta que las mujeres presentan en el eje HHA y su mayor nivel de expresión de glucocorticoides en respuesta a factores estresantes agudos, pero mucho más cuando nos encontramos con una paciente que ha superado esa barrera y la situación es de un estrés crónico o distrés.

## 2. Papel del eje HHA en la Reproducción.

El embarazo se caracteriza por el incremento de la actividad del eje HHA y la elevación progresiva en el suero de las hormonas del estrés, como el cortisol y la ACTH a partir de la semana 12 de gestación<sup>51</sup>. El momento en que se produce la liberación de estas hormonas del estrés, así como su localización en los tejidos periféricos, son críticos para el desarrollo fetal y el mantenimiento del embarazo. Sin embargo, en aquellas situaciones donde los niveles de cortisol circulantes y de andrógenos suprarrenales son elevados, pueden suprimir a nivel hipofisario el eje HHG<sup>51</sup>. Esta elevada concentración de las hormonas del estrés puede interferir con el proceso de la ovulación y acortar la fase lútea. Un descenso de los niveles de progesterona durante esta fase, disminuyen la probabilidad de que tenga lugar la implantación con éxito. Se requiere unos mínimos de 12 días de duración de la fase lútea y un grosor endometrial  $\geq 8$  mm para que esta implantación tenga lugar<sup>52</sup>. Por lo que niveles elevados de hormonas del estrés durante el periodo de preconcepción y las primeras semanas del embarazo podrían dar fallos de implantación o abortos como consecuencia de estos fallos en la fase lútea.

La CRH es la principal reguladora del eje HHA. Su expresión no se limita de manera exclusiva al hipotálamo. Se ha encontrado presente en la mayoría de los tejidos reproductivos femeninos, incluyendo el útero, la placenta y el ovario<sup>53</sup>. La CRH sintetizada en el endometrio parece estar involucrada en los procesos de decidualización, implantación y tolerancia materna a un embrión que es diferente a la madre, mediante la inactivación de las células T activadas vía interacción Fas-FasL<sup>54</sup>. La CRH producida en el ovario estaría involucrada en la maduración folicular, ovulación y luteolisis; la placentaria modularía la función endocrina de los trofoblastos placentarios, incluyendo la síntesis de ACTH, prostaglandinas, estrógenos y participaría en la inducción al parto<sup>55-57</sup>.

A pesar de la función reguladora de CRH en el embarazo y en el parto, se sabe que elevados niveles de glucocorticoides tienen efectos nocivos sobre el útero y el feto, además de inhibir la secreción de la hormona LH, los estrógenos en los ovarios y la secreción de progesterona<sup>58</sup>. El efecto inhibitor de las hormonas del estrés sobre la reproducción femenina son los responsables de lo que hoy en día conocemos como

amenorrea hipotalámica como consecuencia del estrés, de los niveles inadecuados de progesterona durante el embarazo y las pérdidas fetales<sup>59</sup>. Estos datos fueron puestos de manifiesto en modelos murinos, donde la exposición a diferentes estímulos estresores inducía el aborto en hembras preñadas, junto con una reducción significativa de los niveles de progesterona y de su receptor en la interfaz materno-fetal<sup>60-62</sup>. La tolerancia inmune materna en las etapas más tempranas del embarazo requiere de adaptaciones inmunes selectivas para prevenir el rechazo de las células trofoblásticas semialogénicas. Esta adaptación requiere: la presencia de linfocitos T reguladores CD4+CD25+, expresión de TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor  $\beta$ ), así como un balance adecuado entre las citoquinas Th2 y Th1. En todo este proceso la progesterona juega un papel crítico junto con la actuación sinérgica de la galectina-1 (proteína perteneciente a la familia de proteínas de unión a glicanos) en el rescate de una respuesta inmune adaptativa al embarazo que ha fallado como consecuencia del estrés en modelos murinos<sup>63</sup>. Los niveles adecuados de progesterona son importantes para el mantenimiento del embarazo y mucho más en situaciones de estrés. Su efecto en el mantenimiento del embarazo es mediado por la interacción con su receptor y la inducción de la liberación de la proteína PIBF (progesterone-induced blocking factor) por los linfocitos, lo que contribuye al desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th2 ejerciendo una actividad antiabortiva<sup>60,64</sup>. Esta actividad de la proteína PIBF se puso de manifiesto al revertir el efecto de la píldora abortiva RU486, demostrando que los abortos por esta píldora no son consecuencia de un colapso de la decidua sino por un proceso de inmunomodulación. Además, la administración de progesterona exógena reduce los niveles de citoquinas abortivas, favoreciendo la protección del embarazo mediado por linfocitos T CD8<sup>62,65-67</sup>.

### **3.Efecto Biológico del Estrés en los ejes neuroendocrinos de la reproducción**

La relación causal entre estrés e infertilidad ha sido demostrada principalmente en modelos animales. Se ha visto que ratones sometidos a situaciones de estrés presentaban alteraciones en el desarrollo ovocitario mediante la activación de estrés oxidativo y apoptosis<sup>68-71</sup>. También el estrés psicológico parece tener efecto a nivel reproductivo en modelos murinos, dado que se ha observado una disminución de los procesos de apareamiento y de los niveles hormonales en la fase de celo, así como alteraciones a nivel de los procesos de gametogénesis<sup>72-75</sup>. Si un factor estresante se vuelve crónico,

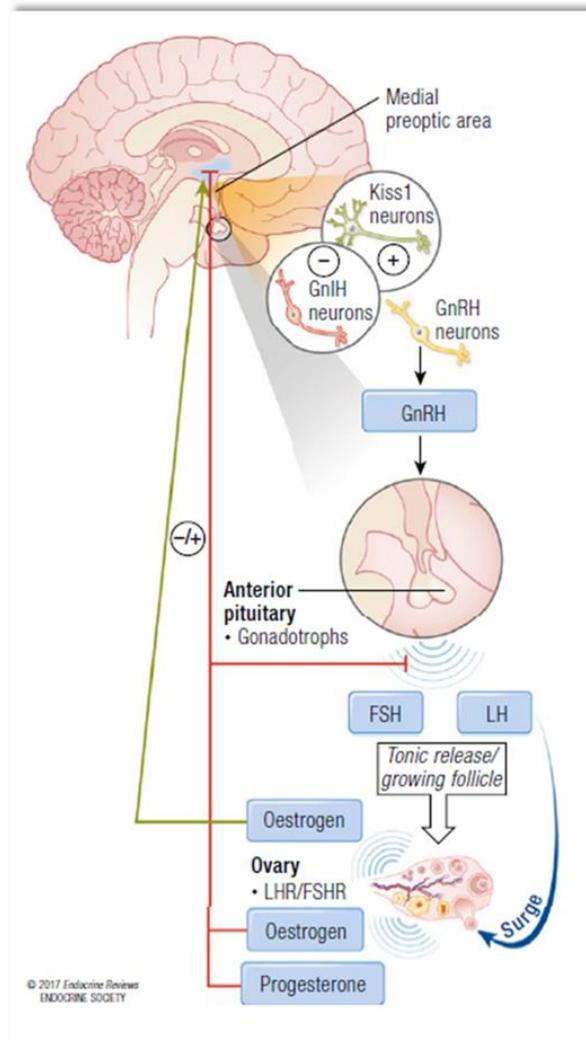
como una infección prolongada o la exposición a desafíos sustanciales de la vida como puede ser la infertilidad, puede tener complicaciones.

La reproducción es una función esencial para la perpetuación de la especie por lo que está controlada por una sofisticada red de señales neuroendocrinas integradas por el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG). La cascada hormonal comienza en el hipotálamo (área preóptica del hipotálamo anterior, POA) con la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por las neuronas GnRH. Esta colección de neuronas, conocida como el generador de pulsos GnRH, envía axones a la eminencia media, desde donde liberan la GnRH de forma pulsada y sincronizada<sup>76</sup>. Este péptido GnRH se liberado al sistema portal hipotálamo-hipófisis, donde estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH) por la adenohipófisis<sup>77</sup>. La FSH y la LH también son liberadas en forma de pulsos al torrente sanguíneo por donde viajaran hasta llegar a las gónadas (ovarios y testículos) para inducir la producción de gametos, la síntesis y liberación de hormonas sexuales (estrógenos, progesterona, testosterona)<sup>78</sup>. Los niveles de las hormonas en cada una de las partes de estos ejes se encuentran estrechamente regulados por mecanismos de retroalimentación positiva y negativa y por diferentes señales neuroendocrinas (**Figura 3**).

#### Influencia de CRH en la supresión del eje HHG por estrés.

Los efectos inhibidores del estrés iniciados por la CRH tienen lugar a nivel del generador de pulsos de GnRH, que disminuyen la liberación de gonadotropinas en ratas, ovejas, primates y humanos<sup>79-81</sup>. La CRH interactúa a través de dos receptores: receptor para CRH tipo 1 (CRH-R1) o receptor para CRH tipo 2 (CRH-R2), presentando mayor afinidad por el primero. Este CRH-R1 es expresado en el cerebro, la hipófisis y en menor medida en los tejidos periféricos y es quien media en la inducción del eje HHA en respuesta al estrés, sin embargo, el efecto inhibidor sobre el generador de pulsos GnRH como consecuencia del estrés, puede ser llevado a cabo por los dos tipos de receptores<sup>82-84</sup>. Se ha sugerido que este efecto de CRH sobre la liberación pulsátil de GnRH podría ser consecuencia de la conectividad sináptica existente el área preóptica del hipotálamo anterior, POA, entre CRH, las neuronas GnRH y la expresión de CRH-R1 observada en ratones<sup>85</sup>.

En ratas se ha observado una alteración del comportamiento sexual, aumento significativo de la ACTH plasmática, prolactina (PRL), corticosterona y progesterona y disminución de FSH en respuesta al estrés agudo<sup>85</sup>. Lo que conduce a la reducción de la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, LH y al retraso del pico de LH mediado por inhibición de la síntesis del receptor para GnRH, supresión de la liberación de LH y aumento de la secreción de la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH)<sup>86</sup>



**Figura 3. Eje HHG.** En el área mPOA del hipotálamo, las neuronas Kiss1, liberan kisspeptina, estimulando de este modo a las neuronas sintetizadoras de GnRH, la cual activa la cascada del eje HHG. Por otro lado, se encuentran las neuronas inhibitoras de la liberación de GnRH (GnIH) que inhiben la liberación pulsátil de GnRH en la eminencia media. La liberación de GnRH conduce a la síntesis de gonadotropinas (LH y FSH) por la adenohipófisis que en el ovario inducen la liberación de estrógenos y progesterona, los cuales pueden tener un efecto de retroalimentación negativa o positiva sobre el eje, en función de la etapa del ciclo ovárico en la que nos encontremos. En los hombres, la liberación de testosterona tiene efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH y gonadotropinas (retroalimentación negativa). Adaptado de Sominsky et al<sup>1</sup>.

### Papel del GABA en la inhibición de la liberación de GnRH por estrés.

Además de la inhibición de pulsos de la GnRH por la CRH, esta inhibición también puede ser mediada por el GABA (ácido gamma-aminobutírico). Diferentes trabajos han puesto de manifiesto este efecto inhibitor sobre la secreción pulsátil de GnRH y de LH<sup>87</sup>. En primates el bloqueo del receptor GABA aumenta la liberación de GnRH y adelanta el desarrollo de la pubertad<sup>88</sup>. Los receptores GABA-A y GABA-B presentes en el área hipotalámica POA, parecen mediar los efectos inhibidores del estrés sobre la secreción pulsátil de LH. El empleo de antagonistas para ambos receptores ocasiona la reversión del bloqueo en la liberación de LH por CRH<sup>89,90</sup>.

### Kisspeptina e inhibición del eje HHG en respuesta al estrés.

Otro elemento clave en la señalización de GnRH que puede verse afectado por el estrés es la Kisspeptina. Es un neuropéptido que regula los procesos de fertilidad, recibe la información de los niveles de hormonas sexuales (estrógenos) en sangre y controla la secreción pulsátil de GnRH. Las kisspeptinas son un eslabón fundamental del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal al activar la secreción de GnRH para iniciar la pubertad y mantener la función reproductiva del adulto. La acción de las kisspeptinas en el núcleo arcuato está principalmente vinculada con el feedback negativo que ejercen los esteroides gonadales regulando el eje gonadal. En el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), en cambio, se vinculan con el feedback positivo de los estrógenos, responsable del inicio de la pubertad y de la generación del pico de LH preovulatorio<sup>91-93</sup>. También se halló un aumento de la expresión de Kiss1 cerebral durante la pubertad independientemente de la concentración de hormonas sexuales, lo que sugiere que las kisspeptinas actúan como gatillo del despertar gonadal. La estimulación de GPR54 (receptor para la Kisspeptina) por la Kisspeptina constituye el más potente estímulo fisiológico para la secreción de GnRH y es indispensable para alcanzar los elevados niveles de éste, necesarios para procesos como pubertad y ovulación; sin embargo, la falta del estímulo de la Kisspeptina no anula totalmente la secreción de GnRH y permite un cierto nivel de gonadotropinas<sup>94</sup>. Se origina en neuronas del AVPV, núcleo periventricular, núcleo preóptico anterodorsal y núcleo arqueado. Aunque las neuronas de estos núcleos que controlan a las neuronas secretoras de GnRH (área preóptica o de la región hipotalámica anterior) están en los núcleos arqueado y AVPV. Se ha observado que la supresión de liberación de GnRH por acción

del estrés también viene acompañada de una reducción de la expresión de Kisspeptina y de su receptor en el hipotálamo<sup>95</sup>.

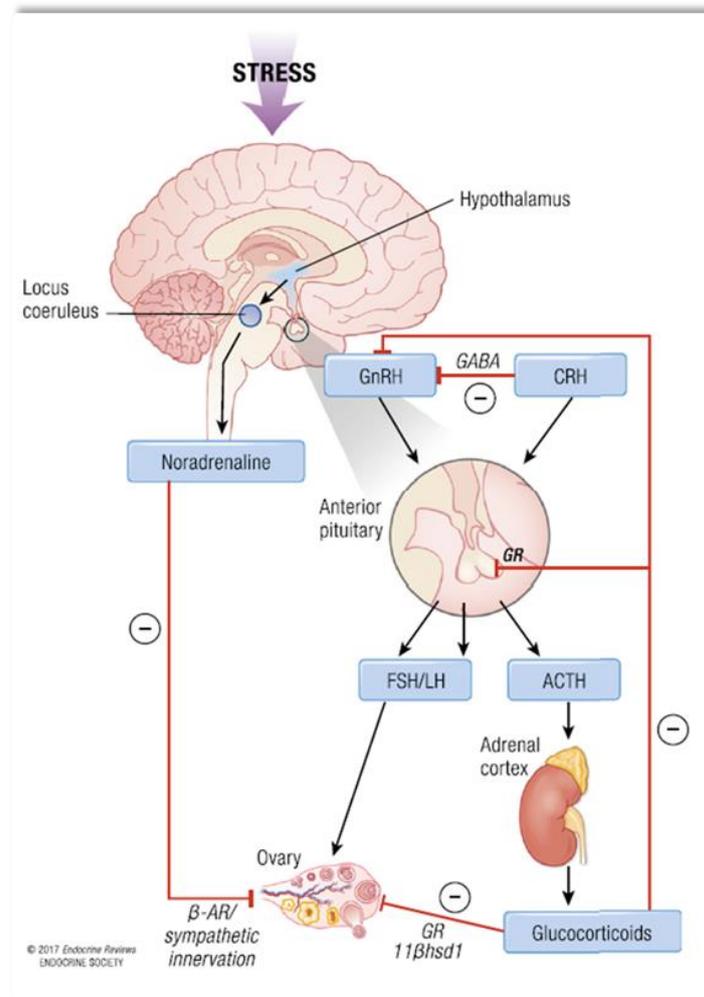
Papel de la hormona inhibidora de Gonadotropinas (GnIH) en la supresión de la vía de señalización de GnRH por estrés.

Un regulador negativo del eje HHG es la hormona inhibidora de Gonadotropinas (GnIH o RFamide related peptide) que también parece estar implicada en la inhibición de este eje por la acción del estrés. En ratas sometidas a situaciones de estrés se produce un incremento en los niveles de esta hormona y a una reducción de los niveles de LH circulantes<sup>96-98</sup>.

Las hormonas liberadoras de GnIH coexpresan receptores CRH-R1 y receptores para glucocorticoides. Además, CRH incrementa la expresión del gen del receptor para GnIH (Gpr147), mientras que reduce los niveles de mRNA de GnRH en modelos in vitro. Gpr147 también es expresado por las neuronas Kiss, de manera que inhibe la inducción de la liberación de GnRH por la kisspeptina<sup>99,100</sup>. Los hallazgos sugieren que la hormona inhibidora de la gonadotropina actúa directa e indirectamente en la red GnRH para mediar los efectos inhibitorios del estrés sobre la reproducción. También es evidente la extrema complejidad de las redes neuronales implicadas en el control de la reproducción.

#### Efecto del estrés sobre la hipófisis y las gónadas.

Aunque el principal efecto del estrés en la disminución de la secreción de gonadotropinas tenga lugar a nivel del hipotálamo al actuar sobre el centro generador de pulsos de liberación de la GnRH, se han observado también cambios a nivel de la hipófisis (**Figura 4**). En diferentes especies, incluida la humana, los glucocorticoides actúan de manera directa sobre la hipófisis inhibiendo su capacidad de respuesta a la GnRH, reduciendo de ese modo la liberación de gonadotropinas<sup>101-103</sup>. Los efectos de los glucocorticoides sobre la hipófisis son diferentes sobre la LH y la FSH. En estudios in vitro con modelos murinos, la liberación de FSH se incrementa cuando las células hipofisarias eran tratadas con glucocorticoides, por el contrario, la liberación de LH se suprime<sup>104</sup>. Este efecto directo es mediado por la presencia de receptores para los glucocorticoides en las células gonadotropas de la hipófisis en rata y ratón, a través de la supresión de la expresión de la subunidad  $\beta$  de la LH inducida por la GnRH<sup>105,106</sup>.



**Figura 4. Relación entre los ejes HHA & HHG.** CRH puede inhibir directamente el generador de pulsos GnRH lo que lleva a la supresión de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH), lo que a su vez resulta en una disminución maduración de ovocitos y la esteroidogénesis. Los glucocorticoides pueden actuar directamente a nivel de la hipófisis para suprimir la liberación de gonadotropinas, así como para ejercer efectos supresores dentro de las gónadas. La liberación de CRH por el núcleo paraventricular del hipotálamo activa las neuronas del locus coeruleus (LC) que aumentan la producción de noradrenalina. Este aumento inducido por el estrés en la actividad simpática puede entonces aumentar la inervación simpática del ovario, contribuyendo al desarrollo de quistes ováricos. Adaptado de Sominsky et al<sup>1</sup>

Respecto al posible papel que el estrés tiene a nivel de las gónadas (ovarios y testículos), se ha podido comprobar que este se encuentra asociado frecuentemente a una reducción de la producción de hormonas sexuales. Esto puede ser causado por el efecto a niveles superiores del eje HHG, como hemos explicado anteriormente, pero también puede ser consecuencia de un efecto directo de los glucocorticoides o las catecolaminas sobre las gónadas<sup>107</sup>. Se sabe que la exposición a diferentes tipos de estrés como puede ser un duelo, una guerra reduce la calidad espermática, aunque estos cambios vienen condicionados por la percepción del grado estrés de cada individuo. En

algunos individuos la exposición a un trabajo estresante ocasionaba una reducción en la calidad del semen y de los niveles de testosterona, mientras que a otros no les afectaba<sup>108,109</sup>. Situaciones como el desempleo también se encuentran relacionados con una menor calidad espermática y reducción de los niveles de testosterona, aunque en este caso el descenso puede ser consecuencia del incremento de la ansiedad y la depresión asociados a esta situación laboral<sup>110</sup>. El impacto del estrés en los niveles de testosterona en hombres adultos también estaría influenciado por la exposición en los primeros años de vida de manera que les hace más vulnerables a los efectos del estrés en su etapa adulta<sup>110</sup>. En los testículos, los glucocorticoides actúan directamente sobre las células de Leydig, que expresan receptores para estos. El acceso de los glucocorticoides a su receptor esta mediado por la isoforma 1 de la enzima 11- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa que, al asociarse con el receptor de glucocorticoides, se asegura que dichos esteroides tengan acceso al mismo, dado que su afinidad por el cortisol es relativamente baja. Esta enzima amplifica los niveles intracelulares de glucocorticoides mediante la reducción de la cortisona (inactiva en los seres humanos) a cortisol (metabolito activo). También es bidireccional al actuar como deshidrogenasa inactivando los glucocorticoides. En los testículos, esta enzima se expresa de manera exclusiva y abundantemente en células de Leydig donde cataliza la inactivación oxidativa de glucocorticoides. Sin embargo, en situaciones de estrés severo, esta enzima puede estar saturada ocasionando una represión de la síntesis de testosterona<sup>111</sup>.

Ha sido descrito un efecto directo de los glucocorticoides sobre la maduración de los ovocitos en diferentes especies. En modelos de ratón sólo niveles suprafisiológicos de glucocorticoides suprimían la diferenciación de los folículos y la maduración de los ovocitos<sup>112</sup>, mientras que en ovejas no tenían ningún efecto sobre la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados<sup>113</sup>. En humanos se han encontrado niveles más elevados de cortisol en el líquido folicular de ovocitos que no fueron fertilizados en comparación con los fertilizados, asociándose también a una mayor actividad de la enzima 11- $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa ovárica con mayores tasas de fertilización<sup>114-116</sup>.

#### Efecto de las catecolaminas sobre las gónadas.

Además de los efectos locales de los corticoides sobre los ovarios, las catecolaminas y en particular la Noradrenalina, tienen un papel importante en la maduración folicular y la esteroidogénesis<sup>117-119</sup>. Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son

sintetizados por las células de la teca interna en los ovarios y su activación conduce a la síntesis de andrógenos<sup>120</sup>. En condiciones de estrés se incrementa la actividad simpática en el ovario que en modelos murinos se traduce en la formación de quistes en el ovario<sup>121</sup>. En la patología denominada como síndrome de ovario poliquístico (SOP) la presencia de niveles elevados de andrógenos es característico de esta y el bloqueo de estos receptores reduce la formación de estos quistes en modelos murinos<sup>122</sup>, siendo frecuente en estas pacientes procesos como la ansiedad y la depresión, situaciones de estrés que contribuyen a alimentar el círculo vicioso de los altos niveles de andrógenos<sup>123,124</sup>.

#### 4.Prolactina y Estrés

La acción de las hormonas del estrés sobre el eje HHG, además del aumento de la secreción de cortisol también provoca incremento de prolactina (PRL)<sup>125</sup>. La prolactina se sintetiza en las células lactotropas de la adenohipófisis, pero también se produce en otras células y tejidos del cuerpo humano, entre los que destacan: el cerebro, el timo, los nódulos linfáticos, la glándula mamaria, el bazo, el miometrio, la decidua, la médula ósea y algunas células del sistema inmune<sup>126,127</sup>. Es una de las hormonas más versátiles puesto que modula múltiples funciones en el organismo que pueden agruparse en grandes categorías: agua y balance electrolítico, crecimiento y desarrollo endocrino y metabólico, cerebro y conducta, reproducción, embarazo, lactancia, inmunorregulación y protección. En su función como neuropéptido, además de poder atravesar la barrera hematoencefálica, su síntesis en la hipófisis le permite ejercer su función moduladora en diferentes regiones del cerebro.

En particular, la PRL contribuye a la regulación de las respuestas al estrés a través de la inhibición del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HPA). Se ha comprobado en ratas hembra que la administración de PRL exógena a nivel cerebral, de manera aguda o crónica, reduce la activación neuronal de la amígdala y la expresión hipotalámica de CRH en respuesta al estrés<sup>128</sup>. Además, PRL modula la ansiedad y comportamientos depresivos<sup>128</sup>. Sin embargo, en humanos, en condiciones de hiperprolactinemia, algunos pacientes exhiben síntomas depresivos<sup>129</sup>. Dado que PRL modula la expresión de sus propios receptores, se ha planteado la hipótesis de que los pacientes hiperprolactinémicos pueden expresar más PRL-R en el cerebro. Sin embargo, se desconoce si los receptores se activan funcionalmente. Los niveles excesivos de PRL

pueden prevenir la formación de los homodímeros necesarios para las funciones de PRL y la hiperprolactinemia a largo plazo reduce la capacidad de las neuronas tuberoinfundibulares para sintetizar dopamina<sup>130</sup>. En general, la prolactina atenúa los efectos de estrés, y por lo tanto es probable que al menos de manera parcial medie en la disminución de la respuesta al estrés en los procesos de embarazo y lactancia, cuando los niveles de prolactina son más elevados<sup>130</sup>.

La hiperprolactinemia anula la pulsatilidad GnRH/LH, suprimiendo así la liberación de gonadotropinas FSH y LH y alteración de la esteroidogénesis gonadal en mujeres y hombres, lo que es una causa importante de infertilidad<sup>131</sup>. Es capaz de inhibir el desarrollo folicular y la actividad aromatasas de las células de la granulosa lo que conduce a un hipoestrogenismo y a una ausencia de ovulación. También tiene un efecto luteolítico puesto que acorta la fase lútea del ciclo menstrual. En hombres, al reducir la expresión de LH, descende los niveles de testosterona y dificulta los procesos de espermatogénesis. El control de la secreción de PRL es a través de su inhibición por la dopamina, que se une sus receptores (Pituitary dopamine type 2 receptors) en la hipófisis lo que impide la síntesis y secreción de esta hormona. Por el contrario, la infusión intravenosa de la TRH (la hormona liberadora de tirotropina) provoca la liberación de prolactina a los 15-30 minutos de ser administrada<sup>131</sup>. La función tiroidea y la PRL están estrechamente relacionadas. Un incremento en la producción de TRH podría ser consecuencia de la hipersecreción de TSH y prolactina asociada al hipotiroidismo<sup>132</sup>. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), la oxitocina o la serotonina estimulan la liberación de prolactina, junto con las citoquinas IL-1, IL-2, and IL-6, mientras que los glucocorticoides, las hormonas tiroideas, GABA y la somatostatina suprimen débilmente la liberación de la PRL<sup>131,133</sup> y la anulan de manera más eficaz el INF- $\gamma$  y la endotelina-3<sup>134</sup>.

En situaciones de estrés, la PRL induce la secreción de ACTH, hipertrofia suprarrenal y aumenta el almacenamiento de esteres de colesterol<sup>135,136</sup>. Es capaz de inducir de manera directa la esteroidogénesis suprarrenal al incrementar los niveles de andrógenos suprarrenales, dehidroepiandrosterona y sulfato de dehidroepiandrosterona, cortisol y aldosterona y estimular la síntesis de catecolaminas suprarrenales<sup>137,138</sup>.

### Expresión de prolactina por el ovario

La expresión de prolactina a nivel de RNA y proteína ha sido puesta de manifiesto en diferentes especies. En ovarios de ratón su expresión comienza a reducirse desde el día 10 de vida hasta el día 40, alcanzando valores mínimos en el día 80. En humanos se ha observado el mismo descenso en la producción ovárica de PRL, detectándose niveles 4-5 veces menores de esta hormona en los ovarios de mujeres posmenopáusicas que premenopáusicas<sup>139,140</sup>. La PRL también se detectó en folículos ováricos recuperados durante los procesos de fertilización in vitro en humanos, siendo significativamente mayor la expresión en líquido folicular que en el plasma, cuya procedencia podría ser consecuencia de la síntesis local o de la circulación sistémica<sup>141,142</sup>. Esta hormona también se encontró en el cuerpo lúteo en modelos bovinos<sup>143,144</sup>. Queda aún por identificar como se regula la expresión de esta hormona en estos tejidos, así como su posible función junto a la PRL hipofisaria en el control de la esteroidogénesis, el desarrollo de los folículos ováricos y del cuerpo lúteo.

### Expresión de prolactina por la decidua

En los mamíferos, el revestimiento endometrial del útero se transforma en un revestimiento secretor para permitir la implantación del embrión. Después de la implantación, este revestimiento se desarrolla aún más para formar la decidua, que interactúa con la placenta y participa en el intercambio de nutrientes, gases y residuos. La expresión de PRL por las células deciduales ha sido reconocida durante mucho tiempo como un marcador definitivo para el inicio de la decidualización. Tanto la distribución como la expresión de PRL en la decidua exhiben cambios espaciotemporales a lo largo del embarazo. Usando sondas marcadas, Tanaka et al<sup>145</sup> observaron señales de hibridación más intensas en los tejidos en las primeras etapas del embarazo que en el embarazo a término. Al principio del embarazo, las células marcadas en la decidua capsular (parte superficial de la decidua que cubre al embrión) eran más abundantes cerca de la cavidad amniótica, mientras que, a término, se concentraban más cerca de la superficie materna de la membrana fetal. En la decidua parietal (cubre el resto cavidad uterina), casi todas las células fueron marcadas, pero no se encontró un marcado específico en las glándulas endometriales o el endotelio capilar. En la decidua basal (parte de la decidua situada profundamente al embrión y membranas que forma la parte materna de la placenta) la mayoría de las células deciduales

mostraron expresión de PRL, mientras que no se observó hibridación sobre las células trofoblásticas. Durante el embarazo, se ha demostrado que la prolactina de la decidua desempeña un papel importante en la represión de la expresión de IL-6 y 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 $\alpha$ -HSD) a nivel de transcripción. La enzima 20 $\alpha$ -HSD cataboliza la progesterona a su forma inactiva y es clave para disminuir los niveles de progesterona antes del parto. Sin embargo, durante el embarazo, es crucial que la 20 $\alpha$ -HSD permanezca silenciosa tanto en el ovario (la fuente de la progesterona) como en la decidua (el sitio principal de acción de la progesterona), lo que indica el papel de la PRL en estos tejidos durante este período<sup>145</sup>. Otras funciones pueden ser actividad autocrina para limitar el grado de diferenciación durante la decidualización<sup>145</sup>. En todas las funciones anteriores, la PRL probablemente actúa uniéndose al receptor PRL (PRL-R), que está altamente expresado en la decidua, así como en el amnios y el corion<sup>146,147</sup>. El aumento de la expresión de la PRL-R durante el trabajo de parto y el parto en estos compartimentos apoya aún más un papel autocrino/paracrino para la PRL en esos procesos. En la placenta, específicamente en el endometrio decidual, la PRL es regulada por factores autocrinos y paracrinos de la unidad fetoplacentaria, como son la progesterona, la insulina y la interleucina-1 (IL-1), mientras que los reguladores clásicos de la PRL hipofisaria como la dopamina y la TRH no modifican la transcripción del gen<sup>148</sup>.

#### Prolactina & Sistema Inmune.

El sistema inmunológico está conformado por distintos tipos de células que provienen de una célula progenitora común o célula madre. Esta célula es generada en la médula ósea y posteriormente, en la misma médula o bien en el timo, sufre procesos de diferenciación que dan origen a distintas estirpes celulares con características y funciones específicas. Dentro de estas estirpes celulares se encuentran las células mononucleares (CMN), que se caracterizan por tener un solo núcleo. Los linfocitos T, los linfocitos B y los monocitos forman parte de este grupo celular. Los linfocitos son células que se pueden encontrar tanto en la circulación como en los tejidos donde maduran o se activan como el bazo o los nódulos linfáticos. La PRL es expresada en todos los tejidos del sistema inmunitario humano: timo, bazo, amígdalas y ganglios linfáticos, así como timomas y linfomas<sup>149</sup>.

El empleo de anticuerpos frente a la PRL inhibe de manera particular la proliferación de células linfoides en presencia tanto de mitógenos específicos de células B y T, como de citoquinas (como la IL-2 y la IL-4), que actúan como factores de crecimiento<sup>150,151</sup>. Esta inhibición era revertida cuando se administraba PRL de manera exógena. Si se combinaba la PRL junto con IL-2, y fitohemaglutinina (lectina, agente mitogénico) se inducía la mitosis de linfocitos T, B y de células NK en cultivos *in vitro*<sup>150,152</sup>. Por lo que la PRL parece actuar como un agente mitogénico que incrementa la eficacia de lectinas y citoquinas en la estimulación de la proliferación de los linfocitos. Sin embargo, en modelos murinos “knockout” para la PRL o su receptor, la funcionalidad de las células inmunológicas no estaba alterada en: la hematopoyesis linfoide, la inmunidad innata, en la capacidad de producir anticuerpos o de proliferar en presencia de estímulos mitogénicos<sup>153</sup>. Esta diferencia podría ser consecuencia de la redundancia funcional que tienen las citoquinas, por lo que las acciones de la PRL quizás son sustituidas por otras moléculas y no verse afectadas por la ausencia de la molécula o sus receptores.

La PRL también está implicada en la diferenciación celular y la expresión de distintos factores. Durante la diferenciación de las células NK la PRL es requerida para conducir a una respuesta LAK (actividad asesina inducida por linfoquinas)<sup>154,155</sup>. Además, la PRL, en concentraciones fisiológicas, colabora con el factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) en la promoción de la diferenciación de monocitos circulantes a células dendríticas y aumenta la efectividad de la presentación del antígeno por estas células induciendo la síntesis de receptores para el GM-CSF<sup>156,157</sup>. En los granulocitos, los linfocitos y el endometrio, la PRL tiene la capacidad de inducir la expresión del factor de transcripción regulador del interferón (IRF-1)<sup>158</sup>, con un papel importante como regulador de la diferenciación y la maduración de los linfocitos T y B. Igualmente, en los granulocitos, la PRL regula la síntesis de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), enzima que produce óxido nítrico que media la respuesta inmunológica y la inflamación<sup>158</sup>. Esta hormona también estimula la síntesis de la IL-2 y de su receptor en esplenocitos y timocitos, además de colaborar en las acciones de la IL-2 e IL-12 estimulando la síntesis de IFN- $\gamma$  en los linfocitos T y en las células NK<sup>159-161</sup>. Otra de las acciones de la PRL consiste en mediar el tránsito de IgA a través del epitelio celular durante el desarrollo de la glándula mamaria<sup>159</sup>.

La PRL es considerada un agente antiapoptótico en los sistemas reproductor e inmunológico<sup>159</sup>. Previene la apoptosis inducida por el óxido nítrico y la dexametasona en la línea celular Nb2 y modula tanto la expresión de genes implicados en la apoptosis (bax y bcl-2), como la activación de la caspasa-3<sup>162-164</sup>. Esta hormona tiene un papel fisiológico importante en el mantenimiento de la supervivencia y funcionalidad del sistema inmune en estados de estrés, en los que tanto las concentraciones de PRL como de glucocorticoides se elevan, pero sus funciones se contrarrestan, ya que la PRL previene la apoptosis inducida por los glucocorticoides en los linfocitos<sup>162</sup>. Por lo que puede ser considerada como un modulador de la supervivencia celular.

### 5.Estrés, Sistema Inmune & Fertilidad

El embarazo constituye un problema inmunológico complejo para la madre. Las células y las moléculas del sistema inmunitario materno interactúan para prevenir el rechazo del feto semialogénico y favorecer su crecimiento y desarrollo. La tolerancia inmunológica del embarazo es mantenida por una serie de mecanismos que incluyen factores fetales, maternos y placentarios; por ejemplo, la expresión reducida de moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-I) por las células del trofoblasto. Los trofoblastos muestran una expresión única de moléculas del MHC diferente a la de la madre y el niño. Estas células no expresan MHC de clase II, pero sí expresan HLA-C, E, F y G, con funciones que incluyen el control de la invasión en profundidad de los trofoblastos y la unión a receptores inhibidores de las células NK. Igualmente, tiene lugar la inhibición de las respuestas citotóxicas de células Natural Killer especializadas del útero (uNK) y la expresión de un perfil de citocinas característico de células T-cooperadoras de tipo 2 (Th2)<sup>165,166</sup> y la presencia de células T (Treg) reguladoras CD4+CD25bright, que suprimen una respuesta alogénica dirigida contra el feto<sup>167,168</sup>. También se incrementa la expresión de la enzima indolamina 2, 3-dioxigenasa (IDO), inducida por la señal de IFN- $\gamma$ , con dos funciones claves para el éxito del embarazo. Por una parte, participa en el establecimiento de la tolerancia materna frente al feto, mientras que confiere protección al feto frente a infecciones debido a la actividad antimicrobiana y antiparasitaria de los productos derivados de su actividad catalítica. Además, tiene un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo en la placenta y la decidualización, por sus efectos sobre las células del estroma endometrial<sup>169-171</sup>.

Los mecanismos relacionados con la tolerancia inmunológica del embarazo comprenden una secuencia sincronizada de eventos que se inicia desde la concepción y fertilización para dar lugar a la implantación y progresa hasta alcanzar un embarazo a término con éxito.

Las citoquinas sintetizadas por los linfocitos T-helper (Th) son claves para la respuesta inmunitaria materna frente al embrión o el feto<sup>172-175</sup>. Un embarazo a término requiere un equilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias secretadas por las células Th1 y Th2. Es importante en las primeras etapas de la implantación embrionaria una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas, pero ha de ser posteriormente regulada por las células T reguladoras (Treg) a través de las moléculas HLA y la hCG (Gonadotropina coriónica humana) soluble para que tenga lugar una dominancia de la respuesta Th2<sup>172,173</sup> y aunque no existen aún bibliografía suficiente para demostrar la implicación del balance Th1/Th2 y su desregulación en los fallos de implantación o los abortos de repetición, si he han notificado mejoras en las tasas de embarazo en pacientes con desequilibrios Th1/Th2 y fallos de implantación recurrentes o abortos de repetición cuando estos son corregidos con tratamientos inmunológicos<sup>174,176-181</sup>.

#### Acción de las hormonas sexuales femeninas sobre el sistema inmunológico

El sistema endocrino y el sistema inmunológico están estrechamente relacionados de modo que las hormonas y las citoquinas actúan como mediadores en ambos sistemas. Las células inmunes y las células endocrinas pueden sintetizar y expresar receptores para citoquinas y hormonas y a su vez, dichas moléculas pueden estimular o suprimir la actividad de estas células.

En condiciones normales, en las mujeres y en hembras de otras especies, los estrógenos y la progesterona, favorecen que predomine la respuesta inmune humoral lo que resulta beneficioso para la gestación<sup>182</sup> (**Tabla 1**).

Los estrógenos estimulan la producción de anticuerpos, modifican la actividad de los linfocitos T periféricos hacia un incremento de linfocitos Treg, reducen el número y la actividad de células NK, incrementan el número y la actividad de granulocitos y macrófagos, disminuyen la estimulación osteoclástica mediante la reducción de interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF $\alpha$ ), descienden la

presentación antigénica por las células dendríticas e incrementan las citoquinas de tipo Th2<sup>183,184</sup>.

La progesterona inhibe la activación y proliferación linfocitaria, incrementa los procesos de apoptosis de linfocitos T y B, impide la generación y la actividad de células T natural killer (NKT), bloquea la producción de anticuerpos y reduce las citoquinas de tipo Th1<sup>185,186</sup>. Induce la producción del Factor Bloqueante Inducido por Progesterona (PIBF), la Proteína endometrial asociada a Progesterona 14 (PP14, Glicodelina A) y Galectina 1 (Gal-1) todos ellos con un papel inmunomodulador<sup>186</sup>. La Glicodelina A es producida y secretada por las células del tejido glandular del endometrio, del ovario, mama, médula ósea y vesículas seminales. Aumenta su producción a partir del período preimplantacional y alcanza su pico durante el primer trimestre de embarazo. Se sabe que impide el reconocimiento y unión del ovocito con el espermatozoide por lo tanto si se produjera un pico de esta proteína cercano a la ovulación, esto impediría la fecundación. También puede impedir el reconocimiento antigénico por las células inmunocompetentes e inhibir la proliferación de linfocitos, la producción de citoquinas tipo Th1, la actividad de LT citotóxicos y de células NK<sup>187</sup>. Gal-1 actúa por distintos mecanismos: regula la proliferación y supervivencia de linfocitos T efectoras, favorece el recambio leucocitario, bloquea la secreción de citoquinas proinflamatorias Th1 y aumenta las citoquinas Th2. Se ha demostrado la expresión de Gal-1 en endometrio en fase secretoria y en tejido decidual y ha sido comprobada una interregulación entre esta proteína y las hormonas sexuales femeninas, ya que tanto el estradiol como la progesterona aumentan la producción de Gal-1 y esta induce la producción de progesterona. En hembras de rata preñadas y sometidas a estrés, el tratamiento con progesterona produjo un aumento de los niveles de Gal-1. Asimismo, si estas hembras eran tratadas con Gal-1 se producía un aumento en los niveles de progesterona, de PIBF, IL-10 y en el número de linfocitos T reguladores<sup>188,189</sup>

Los niveles de estrógenos y progesterona están aumentados durante el embarazo, y sus funciones inmunomoduladoras, favorecen el no rechazo materno-fetal al inhibir la acción de células citotóxicas y aumentar la producción de citoquinas antiinflamatorias (**Tabla 2**).

Etapas Ciclo Menstrual	Actividad Hormonal	Sistema Inmune Innato	Sistema Inmune Adaptativo
<b>Fase Folicular</b>	↓ Estrógenos, posteriormente ↑ ↓ Progesterona	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disminución de la Inflamación</li> <li>▪ Reducción de la presentación antigénica</li> <li>▪ Descenso del numero de células NK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de la actividad humoral y niveles de Inmunoglobulinas</li> <li>• Disminución de la actividad de linfocitos TCD8+</li> <li>• Transición hacia una respuesta tipo Th2</li> </ul>
<b>Ovulacion</b>	↑ Estrógenos ↓ Progesterona ↑ FSH	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mecanismos de inflamación locales para la ruptura del folículo ovárico y reparación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de la respuesta inmune humoral</li> </ul>
<b>Fase Lútea</b>	↑ LH ↑ Estrógenos, posteriormente ↓ ↑ Progesterona, posteriormente ↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reducción de la inflamación</li> <li>▪ Incremento de presentación antigénica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltración de células T y NK en el revestimiento uterino</li> <li>• Incremento de la inmunidad humoral</li> </ul>
<b>Menstruación</b>	↓ Estrógenos ↓ Progesterona	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Procesos inflamatorios locales para el desprendimiento del epitelio uterino</li> <li>▪ Proliferación de neutrófilos en el revestimiento uterino</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posible reducción de la inmunidad mediada por células.</li> </ul>

**Tabla 1. Hormonas y células inmunitarias en el ciclo ovárico.** *Modificada de Abrams et al<sup>190</sup> FSH: Hormona Folículo Estimulante; LH: Hormona Luteinizante*

La enorme complejidad de los mecanismos del sistema inmune involucrado en el mantenimiento del embarazo hace evidente que el fracaso de este sea consecuencia de una desregulación compleja de los diferentes sistemas que participan en el. Esta alteración puede desencadenarse o agravarse como consecuencia del estrés, donde el desequilibrio neuroendocrino y del sistema inmune observado en modelos animales se traduce en una incapacidad de mantener la tolerancia materno-fetal<sup>191</sup>. El estrés activa el eje HHA, se produce un incremento de hormonas como la CRH, ACTH, glucocorticoides y catecolaminas que alteran la respuesta inmune<sup>192</sup>. Los glucocorticoides inhiben la síntesis de citoquinas perfil inflamatorio como la IL-12, el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$  e inducen la producción de IL-4, IL-10, e IL-13 por células Th2. Lo que conduce a una supresión selectiva de la inmunidad celular mediada por Th1 y un sesgo hacia la humoral mediado por Th2<sup>192</sup> para proteger del daño tisular que produce el perfil Th1.

La respuesta al estrés incluye también la activación del sistema nervioso simpático. Los órganos linfoides se encuentran preferentemente inervados por fibras nerviosas noradrenérgicas por lo que el sistema inmune está regulado a través del sistema nervioso simpático a nivel regional, local o sistémico<sup>192,193</sup>. Los linfocitos expresan receptores adrenérgicos y responden al estrés inducido por las catecolaminas con linfocitosis, cambios en el tráfico linfocitario, proliferación, producción de citoquinas Th1, proinflamatorias que interfieren en la tolerancia fetal<sup>194-196</sup>.

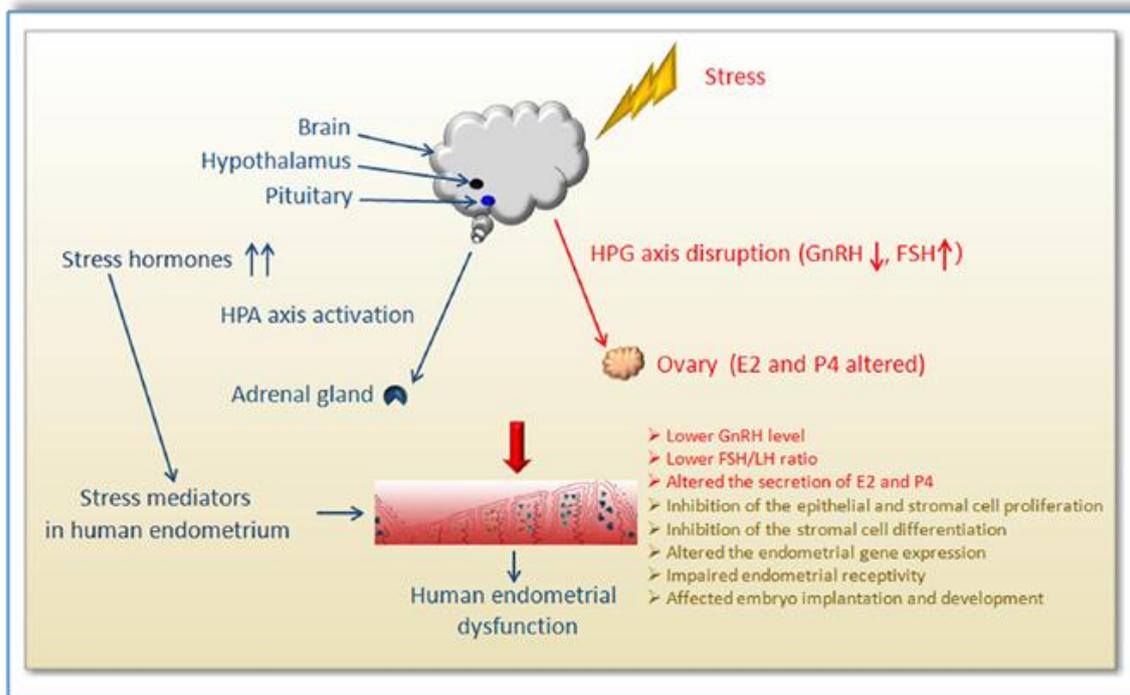
La progesterona es fundamental en el inicio, desarrollo y mantenimiento del embarazo. El estrés se ha relacionado a la disminución de los niveles de progesterona<sup>14</sup>. La administración exógena de progesterona disminuye los efectos de exposición al estrés al reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias que podrían causar aborto. Este efecto protector de la progesterona es dependiente de una población específica de células TCD8+ en mujeres embarazadas, en las cuales aumenta la expresión del receptor para progesterona. Estos linfocitos sintetizan por acción de la progesterona, el Factor bloqueante inducido por progesterona (PIBF), que tiene la capacidad de incrementar la producción de citoquinas Th2 *in vitro* (IL-3, IL-4, IL-10) y bloquear la secreción de IL-12 por los linfocitos periféricos de mujeres embarazadas<sup>14</sup>. También inhibe la fosfolipasa A2 y por extensión la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, disminuyendo la producción de IL-12 que es una citoquina capaz de activar a las Th1 y aumentar la actividad de células NK. Como resultado final, se favorece la producción de citoquinas tipo Th2. Druckmann y Druckmann<sup>197</sup> han propuesto un mecanismo de regulación inmunológica que se produciría durante la gestación. Niveles altos de progesterona inducen la producción de PIBF con la consecuente generación de citoquinas Th2 que favorecen el embarazo, mientras que concentraciones bajas de progesterona no desencadenan la producción de PIBF y se liberarían citoquinas Th1 que llevarían al aborto.

Finalmente, el endometrio humano es un tejido altamente dinámico que es cíclicamente desprendido, regenerado y remodelado. Esto está regulado principalmente por cambios en el estrógeno y la progesterona secretados por los ovarios, y el endometrio sólo es receptivo a la implantación durante unos pocos días (ventana de implantación) en la mitad del ciclo menstrual<sup>197</sup>. Los cambios que tienen lugar en el endometrio durante el ciclo menstrual están estrechamente controlados por cambios

cíclicos en la liberación de las hormonas del eje HHG, así como citoquinas, factores de crecimiento generados por los diferentes constituyentes celulares del endometrio, incluidas las células epiteliales, las células del estroma, las células inmunitarias<sup>198-201</sup>. Cualquier factor que pueda alterar las vías de señalización paracrina y autocrina que regulan la función endometrial puede causar disfunción endometrial. La implantación embrionaria y la siguiente deciduización son esenciales para un embarazo exitoso. Los estudios han estimado que aproximadamente un tercio de los fallos de implantación se producen debido a embriones con alteraciones genéticas, y los dos tercios restantes se atribuyen a una mala recepción endometrial y a un diálogo alterado entre el embrión y el endometrio<sup>198-200</sup>.

Fase Reproductora	Actividad Hormonal	Sistema Inmune Innato	Sistema Inmune Adaptativo
<b>Pubertad</b>	↑ Estrógenos	▪ Desconocido	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se incrementa la involución del Timo</li> <li>• Incremento en la incidencia de enfermedades autoinmunes</li> </ul>
<b>Embarazo-Implantación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Estrógenos</li> <li>↑ Progesterona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incremento de citoquinas inflamatorias en el revestimiento uterino</li> <li>▪ Proliferación de uNK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de células B y T en el lugar de la implantación</li> </ul>
<b>Embarazo-Mantenimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Estrógenos</li> <li>↑ Progesterona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferación de uNK</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunosupresión local para permitir invasión del trofoblasto</li> <li>• Reducción de la inmunidad mediada por células.</li> <li>• Incremento de células T reguladoras</li> </ul>
<b>Nacimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Estrógenos</li> <li>↓ Progesterona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aumento de la inflamación (entrada de linfocitos en el útero y elevación de citoquinas proinflamatorias)</li> </ul>	
<b>Lactancia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Prolactina</li> <li>↑ Oxitocina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Desconocidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción local y secreción de IgA en la leche materna</li> </ul>
<b>Menopausia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Estrógenos</li> <li>↓ Progesterona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incremento de la Inflamación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de la inmunidad mediada por células.</li> <li>• Cambios en los síntomas de enfermedades autoinmunes</li> </ul>

**Tabla 2. Hormonas y células inmunitarias en la reproducción.** *Modificada de Abrams et al<sup>190</sup>. IgA: inmunoglobulina A*



**Figura 5. Impacto del estrés en el endometrio.** Modificado de Wu et al<sup>202</sup>

Se ha demostrado que la infertilidad femenina se asocia con niveles de ansiedad y depresión al aumentar el fallo repetido de implantación y el aborto espontáneo como hemos descrito en secciones anteriores. Se sabe que las hormonas regulan la función endometrial in vivo, y la angustia psicológica podría afectar la secreción y la regulación de estas hormonas, con el consiguiente efecto sobre los mecanismos anteriormente descritos que son fundamentales en el proceso de implantación y mantenimiento del embarazo (**Figura 5**).

## HIPÓTESIS & OBJETIVOS

### JUSTIFICACION

Ser madre y ser padre es un estatus muy valorado por parte de la sociedad y la infertilidad constituye un tabú del que cuesta hablar. Es frecuente que las parejas que recurren a los TRA, especialmente si estos se alargan en el tiempo, las mujeres acaben enfrentándose a un elevado desgaste emocional que asiduamente acarrea trastornos de ansiedad y estrés. Algo que se observa en la práctica clínica. Afortunadamente las clínicas de reproducción están incorporando profesionales de la psicología dentro de sus equipos. Este proceso puede llevar años en conseguir el objetivo y en ocasiones no se logra, pero mientras están en él, el grado de estrés al que se enfrentan, no sólo de manera puntual (derivado de las propias técnicas) sino también de la presión social que les rodea, hace posible entender que estas situaciones activen de manera crónica el eje del estrés y por extensión tenga consecuencias en el eje reproductor y el sistema inmunológico que ejerce un papel importante en el establecimiento de un correcto dialogo materno entre la madre y el embrión. Este trabajo se plantea como un estudio piloto que intentará analizar el efecto del estrés sobre el éxito de los tratamientos.

### HIPÓTESIS

En este trabajo se ha planteado la siguiente hipótesis: El grado de estrés-ansiedad al que están sometidas las mujeres en reproducción asistida puede influir en los resultados de un tratamiento de estimulación ovárica.

### OBJETIVOS

1. Evaluar los niveles de estrés-ansiedad de las pacientes sometidas a estimulación-ovárica mediante el empleo herramientas de cuantificación psicológicas.
2. Determinación de los niveles de hormonas del estrés en diferentes fluidos (sangre y liquido folicular) de las pacientes sometidas a estimulación ovárica.
3. Establecer una posible asociación entre el nivel de estrés-ansiedad y los resultados en los parámetros de fertilidad (número de ovocitos, número de ovocitos maduros, tasa de fecundación) en cada ciclo de estimulación ovárica.
4. Identificar si existe asociación entre los niveles de estrés-ansiedad y los valores de las hormonas del estrés en sangre y liquido folicular.

## MATERIAL & MÉTODOS

### 1. Cohorte del Estudio.

Se trata de un estudio piloto, prospectivo en el que se ha reclutado un grupo de 11 mujeres con problemas de fertilidad que fueron sometidas a un tratamiento de estimulación ovárica en la clínica EMBY, en el periodo de tiempo comprendido entre Mayo y Junio de 2022, que cumplían todos los criterios de inclusión en el estudio (Tabla 3).

DATOS DE LA COHORTE (n=11)	
Edad	38.18 ± 3.52
Duración de esterilidad (años)	3.41 ± 2.20
Numero Gestaciones	0.73 ± 1.19
Número de Hijos	0.27 ± 0.47
Número de Abortos	0.55 ± 0.93
Numero ciclos FIV previos	1.64 ± 0.81

**Tabla 3. Datos de la cohorte de estudio**

De cada paciente se recogieron los siguientes datos procedentes de la historia clínica: edad, duración esterilidad, gestaciones (embarazos previos), número de hijos, número de abortos, numero de ciclos FIV previos (nciclosFIV), percentil de STAI\_R (pstair), percentil de STAI\_E (pstaiE), el día del ciclo que se hace la punción (diaciclopuncion), dosis de gonadotropinas rFSH y HMG (dosisrfsch, dosishmgnum), numero de folículos antrales (nfolantral), número de ovocitos obtenidos (novoc), número de ovocitos maduros (novom2), número de ovocitos fecundados (novofec), número de embriones a D+3(nembriod3), numero de blastos obtenidos(nblastos), numero de blastos obtenidos de calidad a, b, c (blastoa, blastob, blastoc), valores de las hormonas: TSH (tsh), AMH (amh), estradiol, cortisol en suero (cortisolsuero) y en liquido folicular (cortisolfoliculo), prolactina en suero (prlsuero) y liquido folicular (prlfoliculo). Se excluyeron aquellas pacientes con diagnostico psiquiátrico preestablecido o en tratamiento con medicamentos para la tratar la depresión.

## 2. Consideraciones Éticas

El Comité de Ética de Investigación del Principado de Asturias aprobó los protocolos de este estudio (CEIm PA: 2022.261). El proyecto cumple con la Ley Española de Tecnologías de Reproducción Asistida (14/2006). A todas los pacientes les fue entregada una hoja de consentimiento informado que firmaron para poder participar en el estudio, se les explicó la finalidad de este y que dicha participación no tenía consecuencia alguna en el resultado de los tratamientos.

## 3. Estimulación & Punción Ovárica

Las pacientes se sometieron a un ciclo de estimulación ovárica con gonadotropinas, según protocolo de la clínica. Brevemente, las mujeres acudían a la clínica entre los días 1-2 del inicio del ciclo menstrual donde mediante ecografía transvaginal se comprueba que los ovarios se encuentran en reposo (tamaño folicular < 10 mm de diámetro), y que el endometrio presenta las características propias de esa fase. A partir de ese momento, normalmente día 3 del ciclo, las pacientes se administrarán de manera exógena mediante inyección subcutánea FSH recombinante o hMG (gonadotropina menopáusica humana) altamente purificada. Se realizarán de manera rutinaria ecografías trans vaginales y valores de estradiol sérico para evaluar la maduración folicular e ir ajustando las dosis de manera correcta. Cuando en la ecografía se observan 3 o más folículos de un diámetro  $\geq 18$  mm se administra el fármaco para desencadenar la ovulación (triggering) mediante el empleo simultáneo (dual) de gonadotropina coriónica humana recombinante (6500 UI) (hCG; Ovitrelle, Merk Serono, Madrid, España) y de un análogo de la GnRH (Decapeptyl 0.1mg. IPSEN PHARMA, S.A. Barcelona, España) o de manera individual con cada uno de estos fármacos. A las 36 h después de la administración se realiza la punción folicular transvaginal guiada por ultrasonido.

La punción ovárica se realiza en el quirófano contiguo al laboratorio de embriología. Consiste en la punción de los folículos ováricos mediante una aguja de punción folicular que va acoplada a una sonda vaginal ecoguiada. La aguja va conectada a un sistema de aspiración, y a su vez a un tubo estéril donde se recoge el líquido folicular. A los tubos se le añade heparina previa a la recogida del líquido para evitar la formación de coágulos, también se les puede añadir medio de cultivo para lavado de

ovocitos. A medida que se recogen los tubos, estos se depositan en termobloques calefactados a 37°C en la que se han mantenido antes de su uso. Una vez se han recogido todos los tubos se llevan a la cabina de flujo laminar y se trabaja sobre la superficie termocalefactada a 37-38°C.

#### 4.STAI: State-Trait Anxiety Inventory/Self Evaluation Questionnaire

Para cuantificar el cambio en el nivel de ansiedad, las pacientes fueron sometidas al cuestionario conocido como STAI<sup>203</sup>. Para el presente trabajo, se ha empleado la versión adaptada y validada al español<sup>204</sup> que se realiza a las pacientes el día que se someten a la punción folicular y la transferencia embrionaria en la clínica. Su aplicación no lleva más de 20 minutos. El Cuestionario STAI comprende escalas separadas de autoevaluación que miden dos conceptos independientes de la ansiedad, como estado (E) y como rasgo (R). La ansiedad estado (A/E) se describe como un estado o condición emocional transitoria del ser humano que se caracteriza por sentimientos subjetivos de tensión y aprensión, así como hiperactividad del Sistema Nervioso Autónomo. Puede variar con el tiempo y fluctuar en intensidad. Valora lo que la paciente siente en ese momento. La Ansiedad rasgo (A/R) consiste en una propensión ansiosa relativamente estable que diferencia a los individuos en su tendencia a percibir las situaciones como amenazadoras y a elevar, consecuentemente, su ansiedad estado (A/E). La paciente valora lo que siente en general.

La prueba consta de dos partes, con 20 ítems tipo Likert cada una de ellas para cada uno de los conceptos (STAI-E, STAI-R). En la A/E, la escala va de 0 (Nada) a 3 (Mucho), mientras que en la A/R comprende de 0 (Casi nunca) a 3 (Casi siempre) pudiendo obtenerse una puntuación en cada escala de 0 a 60 puntos. En la elaboración del STAI se han intercalado los ítems directos (positivos) e inversos (negativos) para evitar el efecto de aquiescencia. Existen baremos para medir las puntuaciones, una puntuación superior al percentil 75 (31 para STAI\_E y 32 para STAI\_R) para la población femenina es indicativo de ansiedad y valores por encima del percentil 85 (37 para STAI\_E y STAI\_R) nos señalan que es necesaria asistencia médica (ansiedad clínica) (Véase Anexos. **Tabla 1A**).

Se establece que, si una paciente obtiene un percentil 70, supera en ese rasgo al 70% de los sujetos que se han utilizado para baremar la prueba. Si el grupo normativo

fuera una muestra representativa de la población general, se puede inferir que el sujeto supera al 70% de las personas.

### **5.Determinacion de los niveles de hormonas en sangre y liquido folicular**

Para las determinaciones hormonales se empleó el lector mini Vidas (BioMérieux. Madrid. España), se trata de un sistema de inmunoensayo compacto basado en los principios de la tecnología ELFA (Combinación del método ELISA con una lectura final por fluorescencia). Mediante el uso de kit específicos para cada una de las hormonas anteriormente citadas se procedió a realizar su determinación siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se empleó para la determinación de Cortisol (Ref:30451), unos 100µl de suero, para el análisis de la hormona AMH (Ref:417011), Estradiol (Ref:30431), Prolactina (Ref:30410) y TSH (Ref:30400) se utilizaron 200µl de suero. Los rangos de detección para cada hormona son los siguientes: Cortisol (2-650 ng/ml), AMH (0.02-9ng/ml), Estradiol (9 a 3000pg/ml), Prolactina (0.5-200ng/ml) y TSH ((0.05-60µUI/ml).

a) *Determinación de Estradiol:* A todas las pacientes se les realizaron determinaciones séricas de los valores de estradiol en cada control folicular durante el proceso de estimulación. Los valores recogidos en este estudio son los correspondientes a los analizados en sangre en el control previo que determinará la inducción de la ovulación (triggering). De media los niveles de estradiol suelen rondar los 2000 pg/ml, unos 200 por cada folículo. Si son muy altos, puede haber riesgo de hiperestimulación ovárica y además influye sobre la calidad del endometrio, dificultando la implantación. Si son demasiado bajos, estarían indicando una respuesta limitada y un endometrio de pequeño grosor.

b) *Determinación de Cortisol, Prolactina en sangre.*

La extracción para la determinación de cortisol en sangre se realizó a primera hora de la mañana, en ayunas, el día de la punción folicular. La prolactina fue analizada en idénticas condiciones. Se considerarán valores normales de cortisol a primera hora de la mañana en mujeres a los valores comprendidos entre 87-220 ng/ml, mientras que para la prolactina el rango de normalidad se establecerá en valores <25ng/ml.

c) *Determinación de Cortisol, Prolactina en líquido folicular.*

Las muestras de líquido folicular se obtendrán de folículos con un diámetro de tamaño  $\geq 17$ mm, mediante la punción folicular. Se aspira individualmente el líquido folicular de un par de folículos, comprobándose visualmente que no estén contaminados de sangre, desechándose aquellas que lo estuviesen. Una vez obtenido los cúmulos de los líquidos foliculares, se centrifugan los líquidos a unas 2500g durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se recoge y se mantiene a 4°C para su determinación en las siguientes 4 h o se almacena a -20°C para su posterior análisis.

## **6. Analisis Estadístico de los datos**

Se realizó un análisis descriptivo, proporcionando distribuciones de frecuencias absolutas y relativas para variables cualitativas, y medidas de posición y dispersión en el caso de variables cuantitativas. Las correlaciones entre variables cuantitativas se valoraron con el coeficiente y test de correlación de Pearson o Spearman, en función de que se verifique o no la hipótesis de normalidad (test de Shapiro-Wilk). El nivel de significación empleado fue 0.05. El análisis estadístico se efectuó mediante el programa R (R Development Core Team), versión 4.1.3<sup>205</sup> y las gráficas con la librería ggplot2<sup>206</sup>.

## RESULTADOS

### 1. Estudio descriptivo de las variables analizadas en la población

Para este estudio hemos incluido un grupo de 11 pacientes con una media de edad de  $38.18 \pm 3.52$  años. De ellas el 72.73 % eran mayores de >35 años y el 27.27 % menores de <35 años. Respecto a las características de sus hábitos tóxicos, el 81.82 % no eran fumadoras mientras que el 18.18 % si lo eran.

Con relación a las variables clínicas como la esterilidad primaria la distribución de frecuencias fue la siguiente, el 45.45 % de las pacientes presentaban esterilidad primaria, mientras que el 54.55 % no. Respecto al número de hijos previos al tratamiento, el 72.73% de las pacientes no los tenían frente al 27.27 % que si habían sido madres previamente a someterse al tratamiento. De los 11 casos, el 63.64 % de las pacientes no habían experimentado abortos, mientras que el 36.36 % si habían sufrido abortos previos.

Con referencia al tratamiento método para desencadenar la ovulación (triggering) el 9.09 % de las pacientes se les estimulo con dos fármacos para desencadenarla, mientras que el 90.91% de las pacientes fueron estimuladas exclusivamente con un solo fármaco. Cuando la inducción de la ovulación no era dual, el 72.73 % no se desencadenó la ovulación con hCG frente al 27.7 % que si lo utilizó. El 81.82% de las mujeres emplearon un análogo de GnRH para desencadenar la ovulación frente al 18.18% que no lo hicieron. En la **Tabla 4** se recoge el estudio descriptivo para las variables mencionadas.

En lo que respecta a las variables cuantitativas recogidas en el estudio, en la **Tabla 5** se recogen los principales valores resumen para las variables medidas, todas ellas cuantitativas: número de datos disponibles, media, desviación típica, percentil 0 o valor mínimo, percentil 25 o primer cuartil, percentil 50 o mediana, percentil 75 o tercer cuartil y percentil 100 o valor máximo.

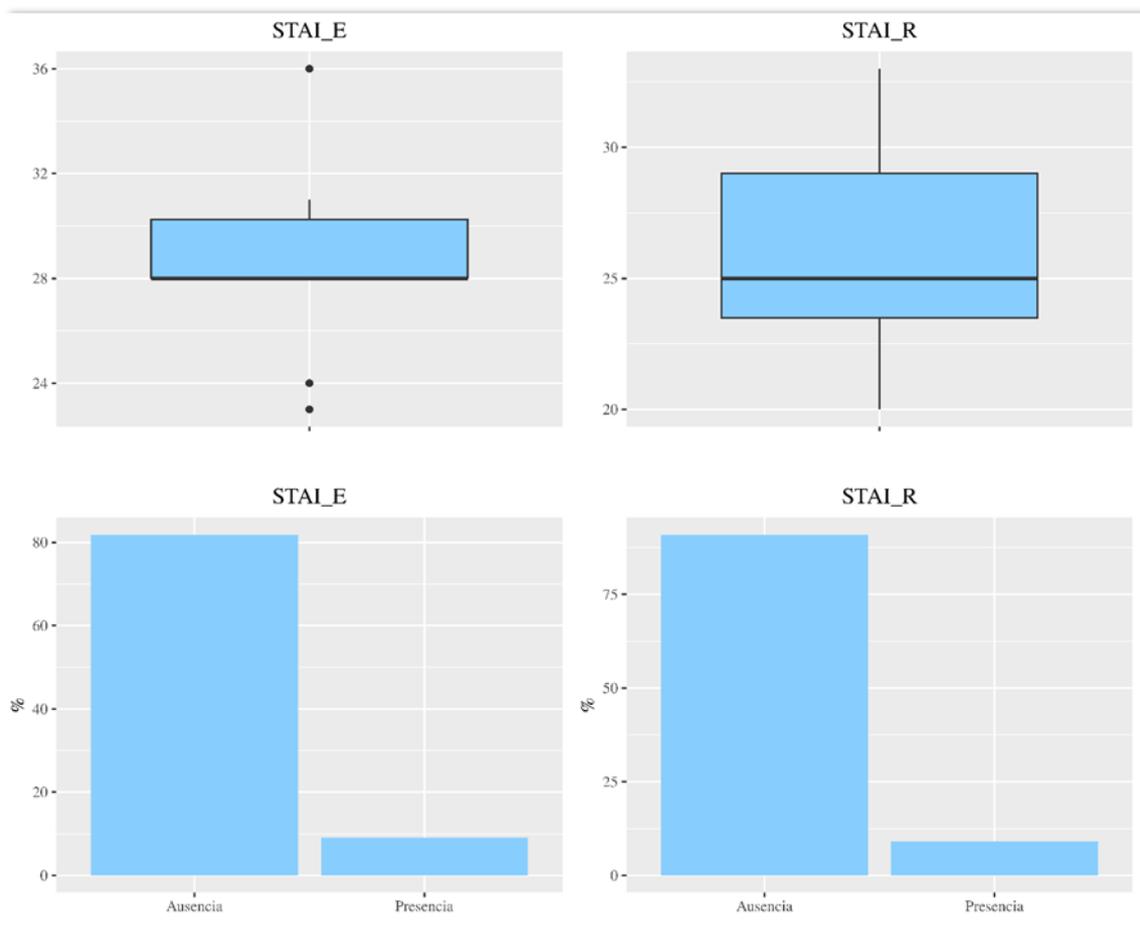
Variable		Frecuencia	%
Fumadora	No	9	81.8
	Si	2	18.2
Edad	<35	3	27.3
	>35	8	72.7
Esterilidad Primaria	No	6	54.5
	Si	5	45.5
Numero Hijos	No	8	72.7
	Si	3	27.3
Abortos Previos	No	7	63.6
	Si	4	36.4
Trigger Dual	No	10	90.9
	Si	1	9.1
Trigger hCG	No	8	72.7
	Si	3	27.3
Trigger analogGnRH	No	2	18.2
	Si	9	81.8

**Tabla 4. Estudio Descriptivo de las variables clínicas de la muestra**

	n	Media	D.típ.	Percentiles (%)				
				0	25	50	75	100
duracionesterilidad	11	3.41	2.20	1.00	2.00	3.00	4.50	7.00
edad	11	38.18	3.52	34.00	35.50	37.00	40.00	45.00
gestaciones	11	0.73	1.19	0.00	0.00	0.00	1.00	4.00
nhijos	11	0.27	0.47	0.00	0.00	0.00	0.50	1.00
abortos	11	0.55	0.93	0.00	0.00	0.00	1.00	3.00
nciclosFIV	11	1.64	0.81	1.00	1.00	1.00	2.00	3.00
pstair	11	56.55	12.78	35.00	47.50	55.00	67.50	77.00
pstaie	10	70.00	8.16	55.00	70.00	70.00	73.75	85.00
diaciclopuccion	11	15.27	1.62	12.00	15.00	15.00	16.50	17.00
dosisrfs	11	177.27	117.50	0.00	112.50	225.00	225.00	300.00
dosishmgnum	11	139.77	75.17	0.00	150.00	150.00	168.75	225.00
nfolantral	11	10.91	5.77	5.00	6.00	11.00	13.50	24.00
novoc	11	12.00	6.47	5.00	6.50	9.00	18.00	21.00
novom2	11	8.09	4.76	4.00	4.00	7.00	10.50	16.00
novofec	11	4.73	3.29	1.00	1.50	4.00	7.00	10.00
nembriod3	11	4.27	3.26	1.00	1.00	4.00	7.00	10.00
nblastos	11	2.45	2.30	0.00	1.00	2.00	4.00	7.00
blastoa	11	0.45	0.93	0.00	0.00	0.00	0.50	3.00
blastob	11	0.55	1.04	0.00	0.00	0.00	0.50	3.00
blastoc	11	1.45	1.37	0.00	1.00	1.00	2.00	5.00
tsh	11	2.00	1.21	0.79	1.25	1.37	2.57	4.49
amh	11	2.75	1.88	0.70	1.45	2.39	3.24	7.07
estradiol	11	2104.12	797.21	1139.16	1342.08	2130.00	3000.00	3000.00
prlsuero	10	51.62	33.55	11.66	26.57	45.96	67.88	119.99
cortisol-suero	10	173.06	86.38	52.74	131.14	170.51	188.67	368.77
prlfoliculo	11	48.96	28.97	7.17	30.50	42.54	56.53	111.57
cortisol-foliculo	11	123.30	32.64	77.77	106.11	117.67	131.99	204.35

**Tabla 5. Estudio Descriptivo de las variables cuantitativas**

Cuando analizamos la variable STAI que determina el grado de ansiedad estado/rasgo en la población analizada, observamos que los valores de la mediana para el STAI\_E y STAI\_R fueron respectivamente 28 y 25. Mientras que, si lo que analizábamos la frecuencia del percentil del STAI\_R, el porcentaje de mujeres que presentaban ansiedad en nuestra población era del 9.09% frente al 90.9% de mujeres que no parecían presentar un estado de rasgo ansioso. El día de la punción se determinaba el percentil de STAI\_E, en este caso sobre 10 pacientes (lo que significa que se pierden un 9.09% de los casos) un STAI\_E en el percentil que indicaba ansiedad se registró en un 10% de los casos, mientras que estaba ausente en el 90% de las pacientes (**Figura 6**).



**Figura 6. Frecuencia de las variables STAI/E y STAI/R**

## 2.Efecto de la determinación de los valores de estrés y ansiedad sobre el resultado de los ciclos

Se realizó el análisis estadístico de correlación de Pearson o Spearman en función de que se verificase o no la hipótesis de normalidad con el fin de estudiar la posible asociación entre las variables de ansiedad (percentil STAI\_E y percentil STAI\_R) y los resultados de fertilidad tras un ciclo de estimulación ovárica. El coeficiente de correlación toma valores entre -1 y 1, indicando una correlación negativa y positiva según el signo, y ausencia de correlación con valores próximos a cero. Los parámetros de fertilidad analizados fueron: número de folículos antrales, número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos maduros, número de ovocitos fecundados con 2PN, número de embriones obtenidos a D+3, número de blastos obtenidos y la calidad estos. Los parámetros de correlación obtenidos se muestran en las **Tablas 6-14**, en primer lugar, teniendo en cuenta la totalidad de la muestra y posteriormente estratificando en función de las posibles variables de confusión que pudiesen estar influyendo en el resultado.

Coef correlación	pvalor	variables	Coef correlación	pvalor	variables		
1	0.096	0.780	nfolantral ~ pstair	1	0.595	0.070	nfolantral ~ pstaie
2	0.389	0.237	novoc ~ pstair	2	0.696	0.025	novoc ~ pstaie
3	0.175	0.606	novom2 ~ pstair	3	0.376	0.284	novom2 ~ pstaie
4	0.016	0.963	novofec ~ pstair	4	0.161	0.656	novofec ~ pstaie
5	-0.136	0.690	nembriod3 ~ pstair	5	0.041	0.910	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.241	0.475	nblastos ~ pstair	6	-0.091	0.803	nblastos ~ pstaie
7	0.412	0.208	blastoa ~ pstair	7	0.373	0.289	blastoa ~ pstaie
8	-0.246	0.466	blastob ~ pstair	8	0.200	0.580	blastob ~ pstaie
9	-0.186	0.584	blastoc ~ pstair	9	0.098	0.789	blastoc ~ pstaie

**Tabla 6. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en la totalidad de la muestra**

Como se observa en la **Tabla 6** solo se encontró correlación positiva y estadísticamente significativa entre los valores de percentil de STAI\_E y el número de ovocitos obtenidos en la punción folicular ( $r=0.696$ ,  $p=0.025$ ).

Cuando se analizaba esta posible asociación dividiendo el grupo de mujeres entre menores de 35 ( $n=3$ ) o mayores de 35 años ( $n=8$ ) (**Tablas 7 y 8**), de nuevo se encuentra asociación estadísticamente significativa entre el número de ovocitos obtenidos y el percentil de STAI\_E, pero sólo en las mujeres mayores de 35 años ( $r=0.865$ ,  $p=0.012$ ).

El estudio de las posibles asociaciones entre el grado de ansiedad y el hecho de que las mujeres tuviesen o no hijos previos, no encontramos ningún grado de correlación entre las variables que determinan la ansiedad y el resultado de ciclo en las mujeres que no habían tenido hijos previos (n=8), mientras que si existía una correlación negativa y significativa entre el percentil de STAI\_R y el número de ovocitos fecundados y el número de embriones a día 3 en aquellas mujeres que si habían tenido hijos previamente (n=3) ( $r=-1$ ,  $p<0.001$ ) (Tablas 9 y 10).

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	0.766	0.445	nfolantral ~ pstair	1	0.327	0.788	nfolantral ~ pstaie
2	0.737	0.473	novoc ~ pstair	2	0.285	0.816	novoc ~ pstaie
3	-0.237	0.848	novom2 ~ pstair	3	-0.702	0.505	novom2 ~ pstaie
4	-0.111	0.929	novofec ~ pstair	4	-0.605	0.586	novofec ~ pstaie
5	-0.466	0.691	nembriod3 ~ pstair	5	-0.854	0.348	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.357	0.768	nblastos ~ pstair	6	-0.786	0.425	nblastos ~ pstaie
7	-0.174	0.889	blastob ~ pstair	7	-0.655	0.546	blastob ~ pstaie
8	-0.440	0.710	blastoc ~ pstair	8	-0.839	0.367	blastoc ~ pstaie

**Tabla 7. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres menor de 35 años.**

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	0.041	0.923	nfolantral ~ pstair	1	0.712	0.072	nfolantral ~ pstaie
2	0.245	0.558	novoc ~ pstair	2	0.865	0.012	novoc ~ pstaie
3	0.188	0.657	novom2 ~ pstair	3	0.634	0.126	novom2 ~ pstaie
4	0.018	0.965	novofec ~ pstair	4	0.554	0.197	novofec ~ pstaie
5	0.000	1	nembriod3 ~ pstair	5	0.491	0.263	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.334	0.418	nblastos ~ pstair	6	0.352	0.439	nblastos ~ pstaie
7	0.588	0.125	blastoa ~ pstair	7	0.436	0.328	blastoa ~ pstaie
8	-0.588	0.125	blastob ~ pstair	8	0.450	0.31	blastob ~ pstaie
9	-0.442	0.272	blastoc ~ pstair	9	0.156	0.739	blastoc ~ pstaie

**Tabla 8. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres mayor de 35 años**

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	0.120	0.776	nfolantral ~ pstair	1	0.513	0.239	nfolantral ~ pstaie
2	0.383	0.349	novoc ~ pstair	2	0.451	0.310	novoc ~ pstaie
3	0.080	0.851	novom2 ~ pstair	3	0.325	0.477	novom2 ~ pstaie
4	0.115	0.787	novofec ~ pstair	4	0.107	0.820	novofec ~ pstaie
5	-0.035	0.935	nembriod3 ~ pstair	5	-0.031	0.948	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.190	0.653	nblastos ~ pstair	6	-0.429	0.337	nblastos ~ pstaie
7	0.250	0.55	blastoa ~ pstair	7	0.436	0.328	blastoa ~ pstaie
8	0.032	0.941	blastob ~ pstair	8	-0.295	0.521	blastob ~ pstaie
9	-0.063	0.883	blastoc ~ pstair	9	-0.103	0.826	blastoc ~ pstaie

**Tabla 9. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres sin hijos previos**

De igual modo se intentó establecer una posible asociación entre aquellas mujeres que habían tenido abortos previamente (n=4), el grado de ansiedad y el resultado del ciclo FIV, frente aquellas mujeres que no habían padecido ninguna pérdida en los ciclos realizados previamente o en embarazos naturales (n=7) (**Tablas 11 y 12**).

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	-0.619	0.575	nfolantral ~ pstair	1	0.911	0.270	nfolantral ~ pstaie
2	-0.703	0.503	novoc ~ pstair	2	0.859	0.342	novoc ~ pstaie
3	-0.961	0.179	novom2 ~ pstair	3	0.500	0.667	novom2 ~ pstaie
4	-1.000	<0.001	novofec ~ pstair	4	0.240	0.846	novofec ~ pstaie
5	-1.000	<0.001	nembriod3 ~ pstair	5	0.240	0.846	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.866	0.333	nblastos ~ pstair	6	0.866	0.333	nblastos ~ pstaie
7	-0.866	0.333	blastob ~ pstair	7	0.866	0.333	blastob ~ pstaie
8	-0.866	0.333	blastoc ~ pstair	8	0.866	0.333	blastoc ~ pstaie

**Tabla 10. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres con hijos previos.**

Como se observa en la **Tabla 11**, se ha encontrado asociación entre número de folículos antrales (r=0.926, p=0.008), número de ovocitos obtenidos (r=0.833, p=0.039), ovocitos maduros (r=1, p<0.001), número de ovocitos fecundados y número de embriones a día 3 (r=0.984, p<0.001) y el percentil de STAI\_E en aquellas mujeres sin abortos previos.

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	0.002	0.996	nfolantral ~ pstair	1	0.926	0.008	nfolantral ~ pstaie
2	0.227	0.625	novoc ~ pstair	2	0.833	0.039	novoc ~ pstaie
3	0.177	0.705	novom2 ~ pstair	3	1.000	<0.001	novom2 ~ pstaie
4	0.048	0.918	novofec ~ pstair	4	0.984	<0.001	novofec ~ pstaie
5	0.078	0.869	nembriod3 ~ pstair	5	0.984	<0.001	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.377	0.404	nblastos ~ pstair	6	0.751	0.085	nblastos ~ pstaie
7	0.092	0.844	blastoa ~ pstair	7	0.707	0.116	blastoa ~ pstaie
8	-0.139	0.767	blastob ~ pstair	8	0.438	0.385	blastob ~ pstaie
9	-0.162	0.729	blastoc ~ pstair	9	0.645	0.166	blastoc ~ pstaie

**Tabla 11. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres sin abortos previos.**

Por el contrario, no se encontró ninguna asociación entre estos parámetros y las mujeres que habían tenido pérdidas anteriormente (**Tabla 12**).

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	-0.310	0.690	nfolantral ~ pstair	1	-0.410	0.590	nfolantral ~ pstaie
2	0.194	0.806	novoc ~ pstair	2	0.000	1	novoc ~ pstaie
3	0.156	0.844	novom2 ~ pstair	3	-0.262	0.738	novom2 ~ pstaie
4	0.000	1	novofec ~ pstair	4	-0.449	0.551	novofec ~ pstaie
5	0.056	0.944	nembriod3 ~ pstair	5	-0.486	0.514	nembriod3 ~ pstaie
6	0.778	0.222	nblastos ~ pstair	6	0.056	0.944	nblastos ~ pstaie
7	0.816	0.184	blastoa ~ pstair	7	0.544	0.456	blastoa ~ pstaie
8	0.272	0.728	blastob ~ pstair	8	-0.272	0.728	blastob ~ pstaie
9	0.272	0.728	blastoc ~ pstair	9	-0.272	0.728	blastoc ~ pstaie

**Tabla 12. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres con abortos previos.**

Finalmente se intentó determinar si existiría asociación entre el número de ciclos de FIV realizados anteriormente por las pacientes, el grado de ansiedad y el resultado de los ciclos (**Tablas 13 y 14**).

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	0.187	0.722	nfolantral ~ pstair	1	0.955	0.011	nfolantral ~ pstaie
2	0.539	0.270	novoc ~ pstair	2	0.859	0.062	novoc ~ pstaie
3	0.341	0.509	novom2 ~ pstair	3	0.790	0.112	novom2 ~ pstaie
4	0.218	0.678	novofec ~ pstair	4	0.644	0.241	novofec ~ pstaie
5	-0.136	0.798	nembriod3 ~ pstair	5	0.507	0.383	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.238	0.650	nblastos ~ pstair	6	0.423	0.478	nblastos ~ pstaie
7	0.257	0.623	blastoa ~ pstair	7	0.725	0.165	blastoa ~ pstaie
8	-0.171	0.745	blastob ~ pstair	8	0.287	0.640	blastob ~ pstaie
9	0.000	1	blastoc ~ pstair	9	0.296	0.628	blastoc ~ pstaie

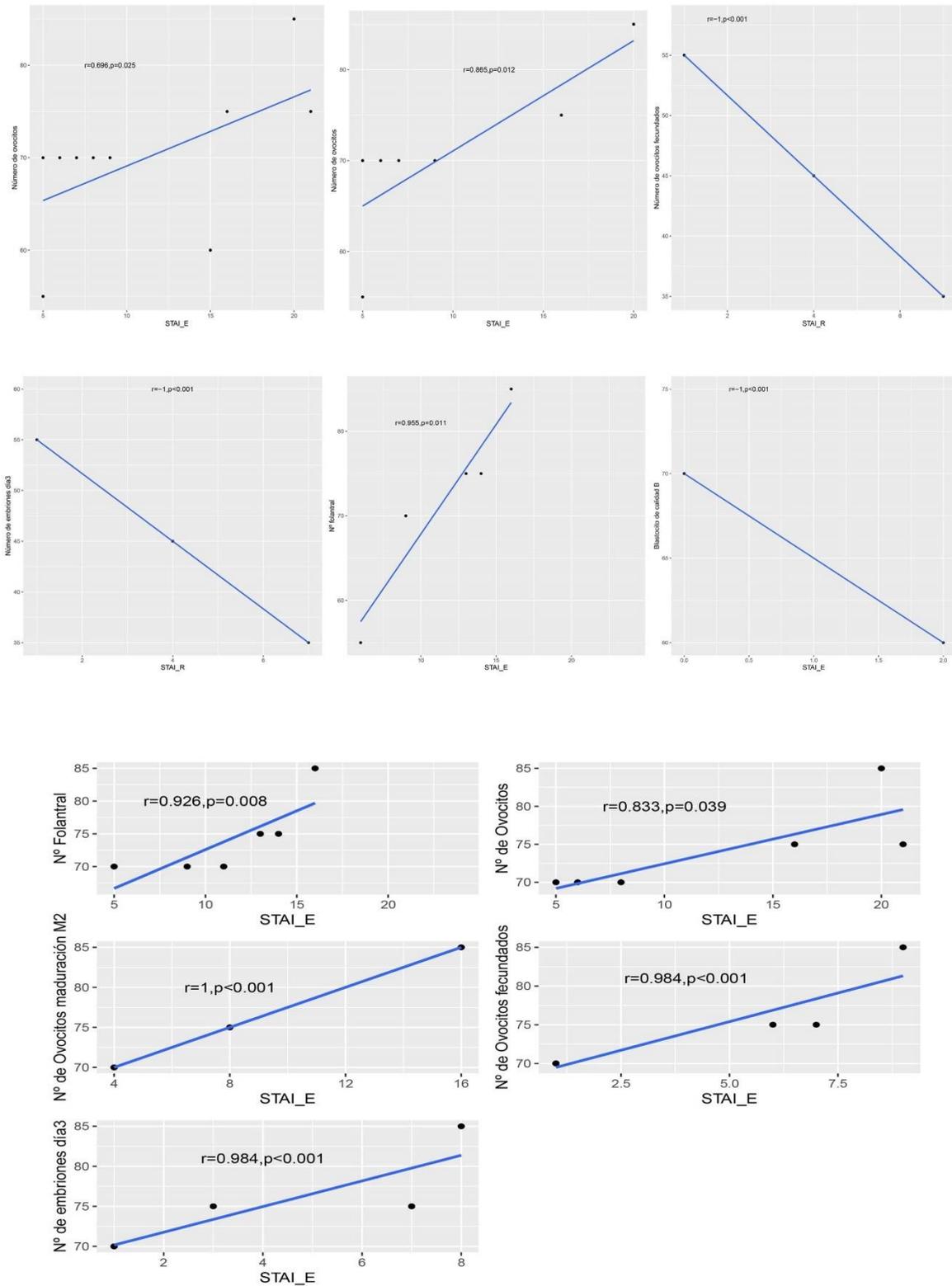
**Tabla 13. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres con un solo ciclo FIV.**

En el caso de las mujeres que habían sido sometidas a un único ciclo FIV (n=6) se encontró que tenía lugar una asociación estadísticamente significativa entre el valor de percentil STAI\_E y el número de folículos antrales (r=0.955, p=0.011). Mientras que aquellas mujeres que habían sido sometidas con anterioridad a 2 o más ciclos FIV (n=5), presentaban correlación negativa entre la calidad de blasto tipo B y el valor del percentil de STAI\_E (r=-1, p<0.001).

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	-0.316	0.604	nfolantral ~ pstair	1	-0.559	0.327	nfolantral ~ pstaie
2	-0.206	0.739	novoc ~ pstair	2	-0.707	0.182	novoc ~ pstaie
3	0.112	0.858	novom2 ~ pstair	3	-0.791	0.111	novom2 ~ pstaie
4	-0.230	0.710	novofec ~ pstair	4	-0.725	0.165	novofec ~ pstaie
5	0.112	0.858	nembriod3 ~ pstair	5	-0.791	0.111	nembriod3 ~ pstaie
6	-0.289	0.637	nblastos ~ pstair	6	-0.725	0.165	nblastos ~ pstaie
7	0.707	0.182	blastoa ~ pstair	7	0.250	0.685	blastoa ~ pstaie
8	-0.354	0.559	blastob ~ pstair	8	-1.000	<0.001	blastob ~ pstaie
9	-0.369	0.541	blastoc ~ pstair	9	-0.745	0.148	blastoc ~ pstaie

**Tabla 14 Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los resultados del ciclo de estimulación en el grupo de mujeres con 2 o más ciclos FIV**

En la **Figura 7** se muestran los diagramas de dispersión de aquellas asociaciones que fueron significativas en las comparativas anteriores.



**Figura 7. Correlaciones significativas entre los niveles de estrés-ansiedad y resultado de ciclo de estimulación.**

### 3.Efecto de la determinación de los valores de estrés y ansiedad sobre los valores hormonales en folículos y sangre.

Para analizar si podía existir una asociación entre el grado de ansiedad de las pacientes y los niveles de hormonas en sangre y líquido folicular, determinamos los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman en función de la distribución de normalidad o no de la muestra. De nuevo el coeficiente de correlación tomará valores entre 1 y -1, indicando una correlación negativa y positiva según el signo, y ausencia de correlación con valores próximos a cero. Los valores hormonales que se analizaron fueron; TSH, AMH, estradiol, prolactina y cortisol en suero, mientras que en líquido folicular se determinaron el cortisol y la prolactina. Los parámetros de correlación obtenidos se muestran en las **Tablas 15-23**, en primer lugar, teniendo en cuenta la totalidad de la muestra y posteriormente estratificando en función de las posibles variables de confusión que pudiesen estar influyendo en el resultado.

	Coef correlación	pvalor	variables		Coef correlación	pvalor	variables
1	0.166	0.626	tsh ~ pstair	1	0.606	0.063	tsh ~ pstaie
2	-0.107	0.754	amh ~ pstair	2	0.618	0.057	amh ~ pstaie
3	0.144	0.673	estradiol ~ pstair	3	0.475	0.165	estradiol ~ pstaie
4	-0.046	0.899	prlsuero ~ pstair	4	-0.172	0.659	prlsuero ~ pstaie
5	0.733	0.016	cortisolsuero ~ pstair	5	0.362	0.339	cortisolsuero ~ pstaie
6	0.076	0.825	prlfoliculo ~ pstair	6	-0.192	0.596	prlfoliculo ~ pstaie
7	0.264	0.433	cortisolfoliculo ~ pstair	7	0.257	0.474	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 15. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y líquido folicular**

Como podemos observar en la **Tabla 15**, sólo se encontró correlación positiva significativa entre los niveles de cortisol en suero y el percentil de STAI\_R ( $r=0.733$ ,  $p=0.016$ ).

Cuando se analizaba esta posible asociación dividiendo el grupo de mujeres entre menores de 35 ( $n=3$ ) o mayores de 35 años ( $n=8$ ) (**Tablas 16 y 17**), se comprueba que existe una alta asociación entre los niveles de cortisol folicular y el valor del percentil de STAI\_R ( $r=1$ ,  $p=0.013$ ), mientras que en el grupo de mujeres de más de 35 años no se pudo encontrar ningún tipo de asociación entre las variables analizadas.

El estudio de posibles asociaciones entre el grado de ansiedad y los valores de las hormonas pudiese estar influido si las mujeres habían sido madres con anterioridad

(n=3) (Tablas 18 y 19), se encontró correlación positiva entre los niveles de cortisol en suero y el valor del percentil STAI\_R en aquellas mujeres sin hijos (n=8) (r=0.885, p=0.008). Mientras que en el caso de las mujeres que habían sido madres previamente (n=3), se encontró asociación positiva entre los niveles de prolactina en suero y el valor del percentil STAI\_E (r=0.998, p= 0.044) y correlación negativa entre esta misma variable y los niveles de prolactina en liquido folicular (r=-0.999, p=0.035).

	coef correlación	pvalor	variables		coef correlación	pvalor	variables
1	0.933	0.235	tsh ~ pstair	1	0.986	0.108	tsh ~ pstaie
2	0.814	0.395	amh ~ pstair	2	0.400	0.738	amh ~ pstaie
3	0.866	0.333	estradiol ~ pstair	3	0.866	0.333	estradiol ~ pstaie
4	-0.990	0.088	prlsuero ~ pstair	4	-0.921	0.255	prlsuero ~ pstaie
5	0.866	0.333	cortisolsuero ~ pstair	5	0.487	0.676	cortisolsuero ~ pstaie
6	-0.812	0.397	prfoliculo ~ pstair	6	-0.996	0.054	prfoliculo ~ pstaie
7	1.000	0.013	cortisolfoliculo ~ pstair	7	0.848	0.356	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 16. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres menores de 35 años.**

	coef correlación	pvalor	variables		coef correlación	pvalor	variables
1	0.181	0.668	tsh ~ pstair	1	0.576	0.176	tsh ~ pstaie
2	-0.188	0.655	amh ~ pstair	2	0.665	0.103	amh ~ pstaie
3	-0.185	0.661	estradiol ~ pstair	3	0.414	0.356	estradiol ~ pstaie
4	0.236	0.611	prlsuero ~ pstair	4	0.027	0.960	prlsuero ~ pstaie
5	0.639	0.122	cortisolsuero ~ pstair	5	0.533	0.276	cortisolsuero ~ pstaie
6	0.334	0.419	prfoliculo ~ pstair	6	0.042	0.929	prfoliculo ~ pstaie
7	-0.416	0.306	cortisolfoliculo ~ pstair	7	0.045	0.924	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 17. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres mayores de 35 años.**

	coef correlación	pvalor	variables		coef correlación	pvalor	variables
1	-0.088	0.836	tsh ~ pstair	1	0.711	0.073	tsh ~ pstaie
2	0.169	0.690	amh ~ pstair	2	0.709	0.074	amh ~ pstaie
3	0.589	0.125	estradiol ~ pstair	3	0.597	0.157	estradiol ~ pstaie
4	0.089	0.850	prlsuero ~ pstair	4	-0.353	0.493	prlsuero ~ pstaie
5	0.885	0.008	cortisolsuero ~ pstair	5	0.355	0.490	cortisolsuero ~ pstaie
6	0.007	0.987	prfoliculo ~ pstair	6	-0.254	0.583	prfoliculo ~ pstaie
7	0.501	0.206	cortisolfoliculo ~ pstair	7	0.255	0.581	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 18. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres sin hijos previos.**

coef correlación	pvalor	variables	coef correlación	pvalor	variables		
1	0.746	0.464	tsh ~ pstair	1	0.467	0.691	tsh ~ pstaie
2	-0.763	0.447	amh ~ pstair	2	0.810	0.399	amh ~ pstaie
3	0.000	1	estradiol ~ pstair	3	0.866	0.333	estradiol ~ pstaie
4	-0.307	0.801	prlsuero ~ pstair	4	0.998	0.044	prlsuero ~ pstaie
5	-0.995	0.061	cortisolsuero ~ pstair	5	0.146	0.907	cortisolsuero ~ pstaie
6	0.293	0.811	prlfoliculo ~ pstair	6	-0.999	0.035	prlfoliculo ~ pstaie
7	-0.500	1	cortisolfoliculo ~ pstair	7	1.000	0.333	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 19. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres con hijos previos.**

Como se observa en la **Tabla 20**, se ha encontrado asociación entre los valores de hormona AMH en sangre y el percentil de STAI\_E en aquellas mujeres sin abortos previos (n=7) (r=0.833, p=0.039), no encontrándose ninguna asociación entre el nivel de ansiedad y los valores de las hormonas en el grupo que si había sufrido pérdidas (n=4) (**Tabla 21**).

coef correlación	pvalor	variables	coef correlación	pvalor	variables		
1	0.346	0.447	tsh ~ pstair	1	0.463	0.355	tsh ~ pstaie
2	-0.268	0.560	amh ~ pstair	2	0.833	0.039	amh ~ pstaie
3	0.143	0.760	estradiol ~ pstair	3	0.657	0.156	estradiol ~ pstaie
4	-0.172	0.712	prlsuero ~ pstair	4	-0.278	0.594	prlsuero ~ pstaie
5	0.702	0.079	cortisolsuero ~ pstair	5	0.679	0.138	cortisolsuero ~ pstaie
6	0.211	0.649	prlfoliculo ~ pstair	6	-0.247	0.637	prlfoliculo ~ pstaie
7	0.037	0.937	cortisolfoliculo ~ pstair	7	0.000	1	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 20. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres sin abortos previos.**

coef correlación	pvalor	variables	coef correlación	pvalor	variables		
1	-0.356	0.644	tsh ~ pstair	1	0.582	0.418	tsh ~ pstaie
2	-0.190	0.810	amh ~ pstair	2	0.558	0.442	amh ~ pstaie
3	-0.148	0.852	estradiol ~ pstair	3	-0.924	0.076	estradiol ~ pstaie
4	0.875	0.321	prlsuero ~ pstair	4	-0.640	0.558	prlsuero ~ pstaie
5	0.815	0.393	cortisolsuero ~ pstair	5	-0.723	0.486	cortisolsuero ~ pstaie
6	-0.295	0.705	prlfoliculo ~ pstair	6	-0.676	0.324	prlfoliculo ~ pstaie
7	-0.891	0.109	cortisolfoliculo ~ pstair	7	-0.811	0.189	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 21. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres con abortos previos.**

Finalmente analizamos si el hecho de haberse sometido a tratamientos de estimulación ovárica previos, y el grado de ansiedad podría tener algún tipo de

asociación entre el número de ciclos realizados por las pacientes, pero no encontramos ningún tipo de asociación entre estas variables (**Tabla 22 y 23**)

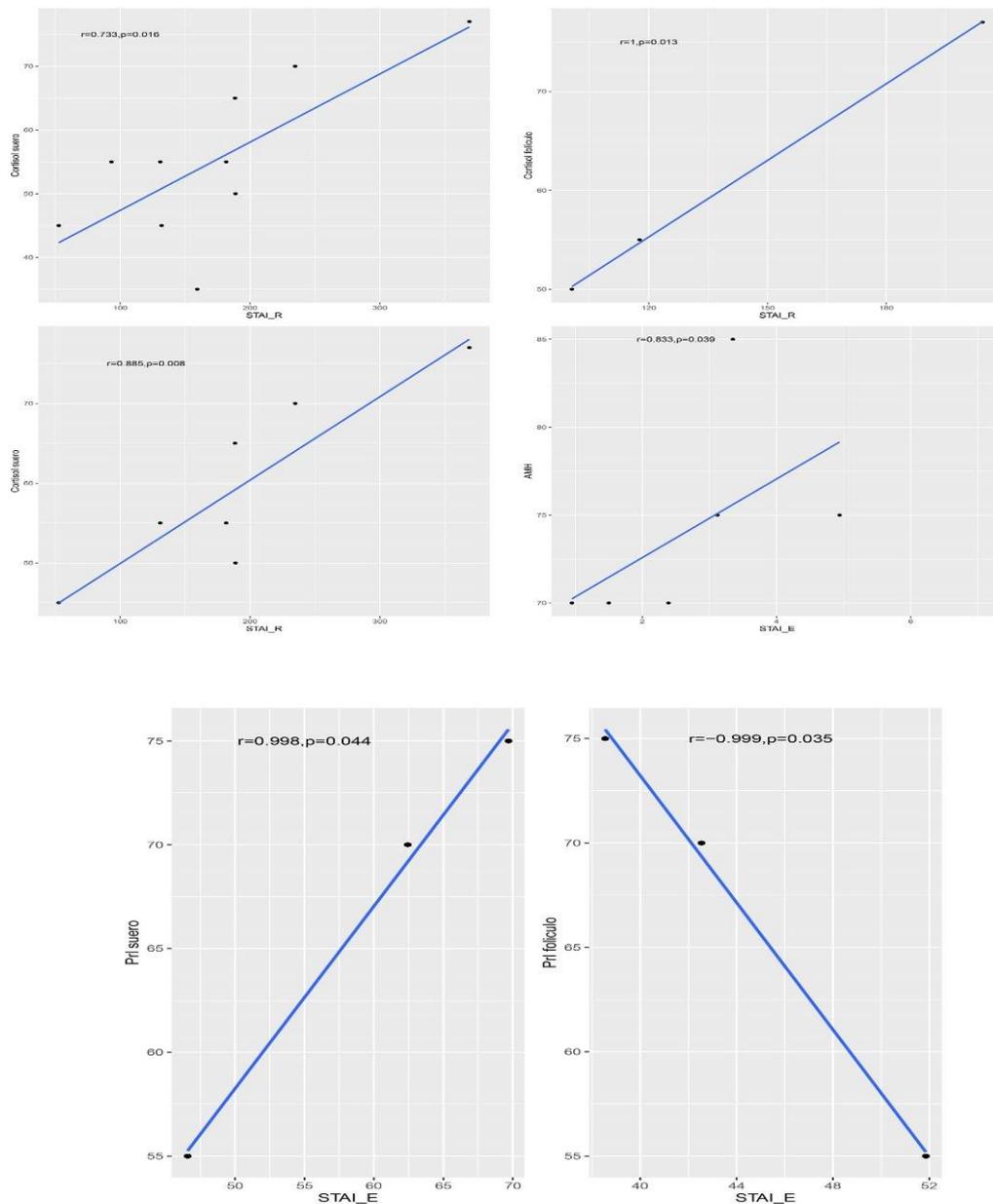
coef correlación	pvalor	variables	coef correlación	pvalor	variables		
1	0.725	0.103	tsh ~ pstair	1	0.821	0.089	tsh ~ pstaie
2	-0.062	0.908	amh ~ pstair	2	0.725	0.166	amh ~ pstaie
3	0.360	0.483	estradiol ~ pstair	3	0.725	0.165	estradiol ~ pstaie
4	-0.581	0.226	prlsuero ~ pstair	4	-0.068	0.913	prlsuero ~ pstaie
5	0.763	0.078	cortisolsuero ~ pstair	5	0.463	0.432	cortisolsuero ~ pstaie
6	-0.017	0.975	prlfoliculo ~ pstair	6	0.049	0.938	prlfoliculo ~ pstaie
7	0.058	0.913	cortisolfoliculo ~ pstair	7	-0.051	0.935	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 22. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres con un solo ciclo de FIV.**

coef correlación	pvalor	variables	coef correlación	pvalor	variables		
1	-0.578	0.307	tsh ~ pstair	1	0.707	0.182	tsh ~ pstaie
2	-0.384	0.523	amh ~ pstair	2	0.000	1	amh ~ pstaie
3	0.200	0.783	estradiol ~ pstair	3	-0.707	0.182	estradiol ~ pstaie
4	0.831	0.169	prlsuero ~ pstair	4	-0.258	0.742	prlsuero ~ pstaie
5	0.676	0.324	cortisolsuero ~ pstair	5	-0.775	0.225	cortisolsuero ~ pstaie
6	0.170	0.785	prlfoliculo ~ pstair	6	-0.354	0.559	prlfoliculo ~ pstaie
7	-0.003	0.997	cortisolfoliculo ~ pstair	7	0.000	1	cortisolfoliculo ~ pstaie

**Tabla 23. Correlaciones entre las variables percentil STAI\_R o percentil STAI\_E y los valores hormonales detectados en sangre y liquido folicular en mujeres con más de un ciclo de FIV.**

En la **Figura 8** se muestran los diagramas de dispersión de aquellas asociaciones que fueron significativas en las comparativas anteriores.



**Figura 8. Correlaciones significativas entre los niveles de estrés-ansiedad y las determinaciones de hormonas en sangre y liquido folicular.**

#### **4.Relación entre los resultados del ciclo de estimulación y los valores hormonales en folículos y sangre.**

Analizamos si se podía establecer una posible asociación entre el grado de estrés-ansiedad y si el resultado del ciclo podría estar mediado por los niveles de las hormonas analizadas en sangre y liquido folicular. En las **Tablas 24-26** se refleja el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman junto con la significación del test asociado, en función de que se verificase o no la hipótesis de normalidad.

Coef correl	pvalor	variables	Coef correl	pvalor	variables		
1	0.448	0.195	nfolantral ~ cortisolsuero	1	0.331	0.321	nfolantral ~ cortisolfoliculo
2	0.652	0.041	novoc ~ cortisolsuero	2	0.265	0.431	novoc ~ cortisolfoliculo
3	0.680	0.031	novom2 ~ cortisolsuero	3	0.051	0.881	novom2 ~ cortisolfoliculo
4	0.498	0.143	novofec ~ cortisolsuero	4	0.049	0.886	novofec ~ cortisolfoliculo
5	0.304	0.394	nembriod3 ~ cortisolsuero	5	-0.146	0.669	nembriod3 ~ cortisolfoliculo
6	0.295	0.408	nblastos ~ cortisolsuero	6	0.050	0.884	nblastos ~ cortisolfoliculo
7	0.320	0.367	blastoa ~ cortisolsuero	7	-0.255	0.449	blastoa ~ cortisolfoliculo
8	0.410	0.239	blastob ~ cortisolsuero	8	0.370	0.263	blastob ~ cortisolfoliculo
9	0.413	0.235	blastoc ~ cortisolsuero	9	0.116	0.734	blastoc ~ cortisolfoliculo

**Tabla 24. Correlaciones entre los resultados del ciclo FIV y los valores de cortisol detectados en sangre y liquido folicular.**

Como se observa en la **Tabla 24**, se ha encontrado asociación positiva entre los niveles de cortisol en suero con el número de ovocitos obtenidos en la punción ( $r=0.652$ ,  $p=0.041$ ) y el grado de maduración de estos ( $r=0.680$ ,  $p=0.031$ ). No encontrándose asociación alguna con los valores de cortisol en el foliculo, ni con los valores de la hormona prolactina en suero o liquido folicular (**Tabla 25**).

Coef correl	pvalor	variables	Coef correl	pvalor	variables		
1	-0.187	0.605	nfolantral ~ prlsuero	1	-0.223	0.509	nfolantral ~ prlfoliculo
2	-0.287	0.422	novoc ~ prlsuero	2	-0.434	0.183	novoc ~ prlfoliculo
3	-0.183	0.614	novom2 ~ prlsuero	3	-0.182	0.592	novom2 ~ prlfoliculo
4	-0.114	0.754	novofec ~ prlsuero	4	-0.064	0.851	novofec ~ prlfoliculo
5	0.017	0.962	nembriod3 ~ prlsuero	5	0.010	0.978	nembriod3 ~ prlfoliculo
6	-0.050	0.89	nblastos ~ prlsuero	6	-0.160	0.639	nblastos ~ prlfoliculo
7	-0.467	0.173	blastoa ~ prlsuero	7	-0.319	0.339	blastoa ~ prlfoliculo
8	0.336	0.343	blastob ~ prlsuero	8	-0.029	0.933	blastob ~ prlfoliculo
9	-0.070	0.848	blastoc ~ prlsuero	9	-0.391	0.234	blastoc ~ prlfoliculo

**Tabla 25. Correlaciones entre los resultados del ciclo FIV y los valores de prolactina detectados en sangre y liquido folicular.**

Finalmente analizamos el grado de asociación entre los valores de la hormona AMH y los resultados del ciclo folicular. Encontramos asociación positiva entre los valores de esta hormona y el número de folículos antrales ( $r=0.913$ ,  $p<0.001$ ) así como en el número de ovocitos obtenidos en la punción ( $r=0.781$ ,  $p<0.005$ ) y su estado de maduración ( $r=0.603$ ,  $p=0.049$ ). Tampoco encontramos ningún grado de asociación entre los valores de hormona AMH y los niveles de cortisol y prolactina en liquido folicular y en suero (**Tabla 26**).

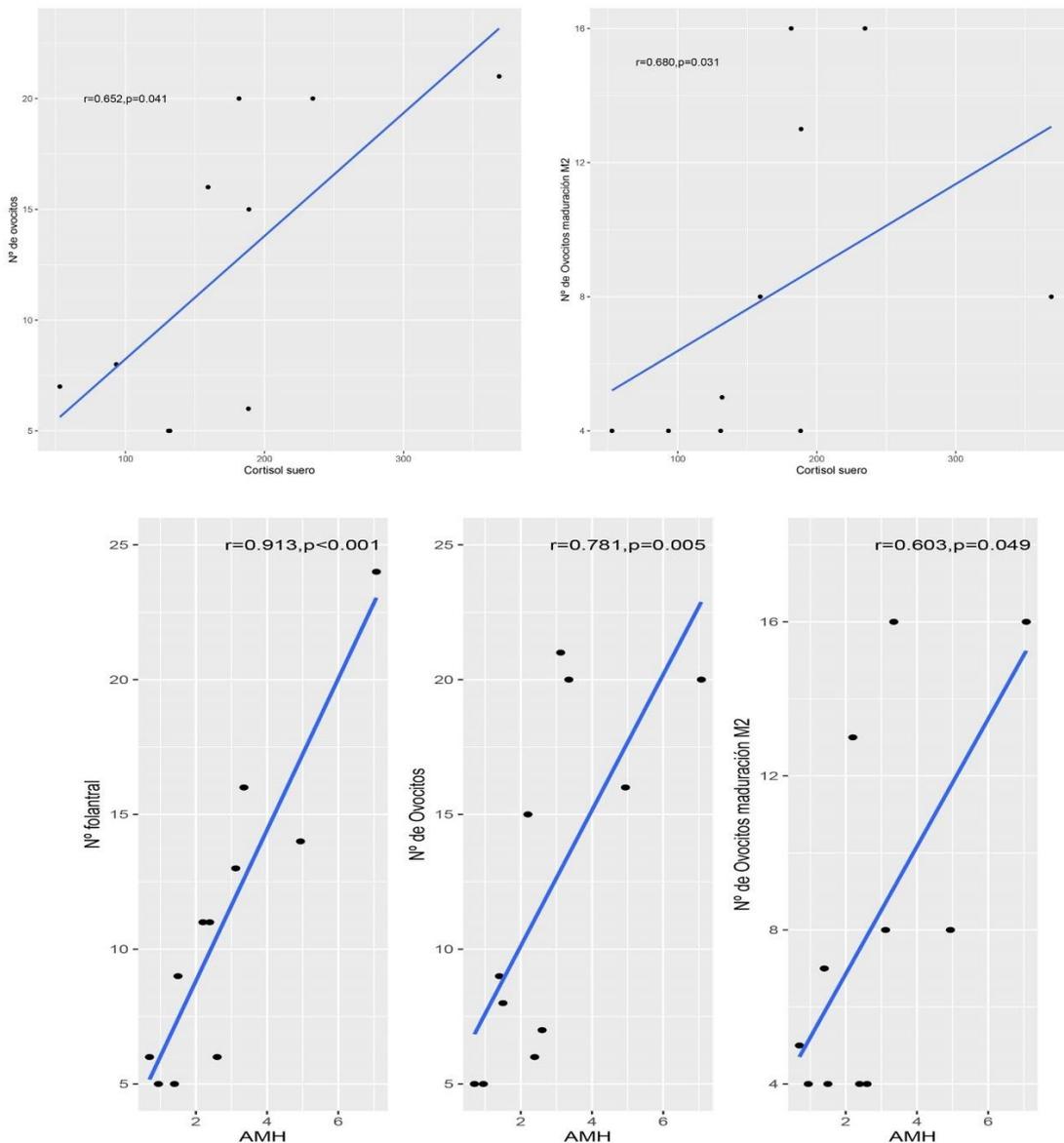
En la **Figura 9** se muestran los diagramas de dispersión de aquellas asociaciones que fueron significativas en las comparativas anteriores

	Coef correl	pvalor	variables
1	0.913	<0.001	nfolantral ~ amh
2	0.781	0.005	novoc ~ amh
3	0.603	0.049	novom2 ~ amh
4	0.494	0.122	novofec ~ amh
5	0.473	0.141	nembriod3 ~ amh
6	0.578	0.062	nblastos ~ amh
7	0.377	0.253	blastoa ~ amh
8	0.341	0.305	blastob ~ amh
9	0.502	0.116	blastoc ~ amh

	Coef correl	pvalor	variables
1	-0.300	0.400	prlsuero ~ amh
2	-0.410	0.210	prlfoliculo ~ amh
3	0.255	0.478	cortisolsuero ~ amh
4	0.270	0.421	cortisolfoliculo ~ amh

**Tabla 26. Correlaciones entre los resultados del ciclo FIV y los valores de hormona AMH. Correlación entre los niveles de cortisol y prolactina en suero o liquido folicular y valores de AMH.**



**Figura 9. Correlaciones significativas los resultados del ciclo FIV y determinaciones de hormonas en sangre y liquido folicular.**

## DISCUSION

A diferencia de otras pérdidas, la “pérdida invisible” que resulta de los fallos repetitivos de los tratamientos de fertilidad carecen de una manifestación física que permita la elaboración de un “duelo” que las mujeres no son capaces de transitar. La sociedad no suele reconocer estas pérdidas y tampoco aquellas que, si están asociadas a una gestación, por lo que frecuentemente estas mujeres ven reducido su apoyo y la validación de su dolor en su entorno familiar y social. En este contexto, no resulta extraño que las mujeres tras realizar tratamientos de manera sucesiva con resultados negativos puedan desarrollar elevados grados de estrés altamente traumáticos. Los ciclos fallidos acaban erosionando la ilusión, la confianza y la esperanza con las que fueron iniciados y si esto se alarga en el tiempo los niveles de angustia son elevados<sup>207</sup>. El optimismo se reduce de manera gradual a medida que se repiten los ciclos y cesar la búsqueda cuando no ha sido posible la consecución del hijo se hace muy difícil y a menudo viene condicionada por la presión del entorno más cercano<sup>208,209</sup>. La naturaleza cíclica de cada tratamiento, la pérdida invisible de cada embrión transferido, el tiempo invertido, la sensación de comenzar una y otra vez en cada intento, pone de manifiesto el elevado impacto emocional que llevan los tratamientos de reproducción asistida.

### Objetivos 1 y 3. Nivel de estrés-ansiedad y los resultados en los parámetros de fertilidad

La relación entre la infertilidad y el estrés psicológico es compleja. Varios trabajos han expuesto la conexión entre infertilidad y diversos trastornos psicológicos. El estudio realizado por Chen et al<sup>210</sup> sobre un grupo de 112 mujeres japonesas, demostraron que trastornos como la ansiedad y la depresión estaban presentes hasta en un 40% de las participantes en los tratamientos de reproducción asistida, siendo el orden de predominancia el siguiente: trastorno de ansiedad (23%), trastorno depresivo leve (17%) y el trastorno distímico (9,8%). Podemos observar que este patrón se repite cuando se extrapola el mismo análisis a otras poblaciones, así pues, en un estudio sobre una cohorte de 11.000 personas en población estadounidense, se encontró que el trastorno de ansiedad generalizada también estaba significativamente asociado a la infertilidad<sup>211</sup>, extendiéndose esta alta incidencia de ansiedad y depresión en pacientes infértiles en diferentes sociedades<sup>212</sup>, llegando a alcanzar valores superiores a los

experimentados por pacientes diagnosticados de enfermedades crónicas, graves y potencialmente mortales. En nuestra población de estudio hemos analizado exclusivamente la ansiedad como rasgo y en el momento de realizar la punción folicular (ansiedad estado), encontrando que sólo en el 9.09% de las pacientes presentaban indicadores de ansiedad (superiores o iguales al percentil 75) de ansiedad como rasgo y el 10 % de ansiedad estado en el día de la punción. Los resultados obtenidos son muy inferiores a lo reflejado en la bibliografía, en este caso la limitación principal es el reducido tamaño de la muestra. Pero también se pone de manifiesto que los cuestionarios para valorar la ansiedad, a pesar de estar ampliamente validados en la bibliografía, la necesidad de elaborar cuestionarios específicos para los tratamientos de infertilidad, donde se recoge de manera muy detallada una mayor variedad de ítems entre los que destacan: sensación de fracaso, pesimismo, tristeza, alteraciones del sueño, sensación de culpa, problemas de concentración, fatiga, etc. Condiciones que vemos frecuentemente presentes en las pacientes, pero que no suelen poner de manifiesto en la consulta o a su entorno, como mecanismo de defensa o para demostrar que social y psicológicamente están bien adaptadas. Esto ayudaría a determinar el grado de ansiedad, estrés y depresión en el terreno de la infertilidad que permitirían valorar de manera más correcta el verdadero impacto de la infertilidad en la vida de estas parejas, especialmente si estos cuestionarios se realizan en el contexto de una entrevista personal que les permita expresar mejor sus emociones<sup>213,214</sup>.

El estrés de la infertilidad y la fatiga psicológica durante los tratamientos, también pueden impactar en la fisiología del sistema reproductor femenino, ya que se han asociado con un aumento del estrés oxidativo y de los factores inflamatorios<sup>215</sup> lo que disminuye aún más la fertilidad femenina. En nuestra cohorte hemos encontrado que existe una asociación negativa entre el valor del percentil 75 en la variable STAI\_R con el número de ovocitos fecundados y el número de embriones a D+3, pero sólo en aquellas mujeres que habían tenido hijos previamente. Recientemente el trabajo desarrollado por Wenyan et al<sup>216</sup> sobre modelos murinos, puso de manifiesto que ratas sometidas a estrés crónico presentaban de manera significativa menores niveles de estradiol y de hormona antimulleriana en comparación con el grupo control o el grupo sometido a lo que se conoce como “ruido blanco” y una tendencia a reducir, sin ser significativa, los niveles de LH. De igual manera también se observó una reducción

significativa entre el número de folículos primordiales y preantrales, así como un incremento de folículos atrésicos en el grupo de ratas hembra sometidas a estrés crónico y que este descenso en la función ovárica era paralelo al incremento de cortisol en sangre detectado en las ratas sometidas a estrés crónico. En nuestro trabajo, por el contrario, hemos encontrado una correlación positiva entre el valor del percentil del STAI\_E y el número de folículos antrales, número de ovocitos obtenidos en la punción, número de ovocitos maduros, número de fecundados y número de embriones a D+3 en mujeres que no habían experimentado abortos previamente. El tamaño de la muestra tan reducido y el hecho de que hay muchas variables personales que puedan influir en cómo se enfrentan las mujeres a estos procesos, ponen de manifiesto estas diferencias en los grupos analizados. En nuestro caso, los valores de AMH se asociaban de manera positiva con el percentil 75 de STAI\_E en mujeres sin abortos previos y también existía esa asociación entre los valores de esta hormona y el número de folículos antrales, número de ovocitos obtenidos en la punción y el grado de madurez de estos, pero no pudimos establecer ninguna asociación entre los valores de AMH y los niveles en sangre o líquido folicular de cortisol o prolactina. En humanos la bibliografía indica la relación existente entre los niveles de AMH en sangre y el número y la calidad de los ovocitos obtenidos<sup>217</sup>, pero este efecto era más destacado cuando los niveles de AMH eran cuantificados en el líquido folicular, observándose que niveles más elevados de AMH se asociaban a embriones de mejor calidad<sup>218</sup>. Si el estrés, tiene efectos sobre los niveles de AMH como se ha observado en el trabajo de Wenyan<sup>216</sup> y descrita la posible asociación de los niveles de esta hormona en líquido folicular y en sangre con un mejor resultado en la calidad de los embriones o en la tasa de fecundación, esto sugiere una posible influencia del estrés en la contribución al resultado del tratamiento entre otras muchas variables. Aunque nosotros determinamos exclusivamente los valores de esta hormona en sangre.

Respecto a si el número de ciclos previos a los que se han sometido estas parejas puedan tener efecto en el resultado del tratamiento, encontramos asociación negativa entre los valores del percentil STAI\_E y el número de blastos de calidad b en aquellas mujeres sometidas a más de un ciclo FIV, que podría estar influenciado por el incremento de la angustia al someterse a tantos ciclos y su efecto en los resultados del ciclo<sup>219</sup>.

### Objetivos 2 y 4. Nivel de estrés-ansiedad y los valores de las hormonas del estrés en sangre y líquido folicular

Sin duda, el estrés tiene una importancia especial con relación a la infertilidad, ya que los procesos fisiológicos asociados al estrés afectan directamente a la regulación hormonal, que a su vez puede afectar a su vez a las posibilidades de embarazo<sup>220,221</sup>. El cortisol es una hormona esteroidea sintetizada por las glándulas suprarrenales como una respuesta protectora al estrés. Sin embargo, el cortisol elevado relacionado con el estrés prolongado puede prestarse a la disfunción eréctil o la alteración de los ciclos normales de ovulación y menstruación. Además, los andrógenos son sintetizados por las mismas glándulas, un desequilibrio hacia una elevada síntesis de cortisol puede afectar a la producción de estas hormonas sexuales, pero también pueden influir sobre las posibilidades de embarazo debido a los procesos inmunológicos que son sensibles<sup>222</sup>. Los corticoides parecen tener un efecto antiinflamatorio en el ovario, puesto que se observa un aumento en el líquido folicular tras la descarga de LH y las células de la granulosa expresan receptores para esta hormona donde parecen regular los procesos de biosíntesis de hormonas negativa o positivamente dependiendo de la especie estudiada o en procesos de reparación tisular tras la ovulación<sup>223-227</sup>. En un trabajo realizado sobre 135 pacientes sometidas a reproducción asistida, se determinaron los niveles de cortisol en el pelo en los 3-6 meses previos al inicio del tratamiento, observándose que los valores de cortisol en el cabello se asociaban negativamente y de manera significativa con las tasas de embarazo ( $P=0.017$ ), asociación que no fue encontrada con cortisol en saliva o sangre<sup>228</sup>. En nuestro trabajo hemos encontrado que existe correlación positiva entre los niveles de cortisol en suero y percentil más elevado en el estado de ansiedad rasgo y esta relación era mucho más manifiesta en aquellas mujeres que no tenían hijos previos. Cuando separábamos la población de mujeres por edad, una de las variables de confusión, encontramos que esta asociación positiva se daba exclusivamente en el grupo de mujeres menores de 35 y con los valores de cortisol en líquido folicular, esta diferencia puede ser consecuencia de que las mujeres de mayor edad por lo general llevan más tiempo en tratamientos de fertilidad y quizás hayan desarrollado estrategias para manejar mejor el estrés<sup>213</sup>.

Se ha descrito que las células de la granulosa humana cultivadas, el cortisol y la dexametasona inhiben la esteroidogénesis estimulada por la LH, lo que indica que los

glucocorticoides in vitro presentan efectos inhibidores en el ovario<sup>229</sup>. La exposición glucocorticoides en el ovario humano en desarrollo provoca una disminución de la densidad de las células germinales como resultado del aumento de la apoptosis de las oogonias<sup>229</sup>. En este contexto, trabajos previos han demostrado la gran controversia que tiene lugar respecto a la posible asociación entre los niveles de cortisol y el resultado de los ciclos, debido a su papel en el proceso de maduración final de los ovocitos. Algunos autores han descrito una posible asociación entre una disminución de niveles de cortisol en sangre y un mayor número de ovocitos obtenidos<sup>230</sup>, mientras que otros trabajos no encuentran ninguna asociación con los niveles de cortisol en saliva o líquido folicular<sup>231,232</sup>. Con relación al nivel de maduración de los ovocitos, de nuevo existe controversia, el trabajo realizado por Fateh et al<sup>233</sup> puso de manifiesto que niveles más elevados de cortisol en el líquido folicular se asociaban a mayor maduración de los ovocitos, mientras que otros autores no encontraban dicha asociación<sup>232</sup>. Nuestros resultados han encontrado correlación positiva entre el número de ovocitos obtenidos y el percentil 75 de ansiedad estado, asociación que se mantenía en las mujeres mayores de 35 años, nuevamente el reducido tamaño de la muestra es un factor limitante para indicar si una posible explicación reside en que las mujeres de mayor edad, al ser conocedoras de que su fertilidad biológica y sus probabilidades de éxito son menores, a pesar de tener un nivel de estrés elevado en el momento de la punción, quizás sean capaces de gestionar el estrés para que este no tenga efecto sobre el número de ovocitos recuperados. También hemos encontrado una relación positiva entre los niveles de cortisol en sangre y el número de ovocitos obtenidos, así como el grado de maduración de estos como indicaría parte de la bibliografía indicada anteriormente.

Con relación a la tasa de fecundación y los niveles de cortisol en líquido folicular o en sangre se ha encontrado asociación entre una menor tasa de fertilización y niveles elevados de cortisol<sup>230,233</sup>, mientras que Bider et al<sup>234</sup> no encuentran tal asociación. Recientemente los trabajos realizados por Ravisankar et al<sup>235</sup> sobre primates han encontrado una asociación entre niveles elevados de cortisol y mayores tasas de desarrollo de blastocisto, además cuando se comparaba el ratio cortisol:cortisona la asociación con una mayor probabilidad de que un ovocito se desarrollase a blastocisto era significativamente mayor ( $p = 0,0283$ ) que la de aquellos ovocitos que no lo formaban. Lo que pone de manifiesto la importancia de determinar estos niveles

intrafolículos durante el periodo cercano a la ovulación. En nuestra cohorte no hemos encontrado asociación significativa entre los valores de cortisol folicular y las variables de resultado de ciclo analizadas.

En la bibliografía existe una gran controversia en relación al posible papel que la prolactina presente en el líquido folicular pueda tener en el desarrollo de los ovocitos, así pues, algunos estudios establecen que tiene lugar una correlación negativa entre los niveles de prolactina en el folículo y tasa de maduración y fecundación de los ovocitos<sup>236</sup> (30,7ng/ml vs 48,6 ng/ml), algo que también confirmaron Lee et al<sup>237</sup>. Por el contrario, otros autores establecen una asociación positiva entre los niveles de prolactina en el folículo y la tasa de fertilización<sup>217,238</sup> (1185ng/ml). Sin embargo, en nuestra cohorte no hemos encontrado ningún tipo de asociación entre los valores de esta hormona en sangre o líquido folicular y los resultados del ciclo.

El diagnóstico de infertilidad puede ser una carga tremenda para los pacientes. El dolor y el sufrimiento de quienes la padecen es un problema importante (**Figura 10**). Los pacientes deben ser asesorados y apoyados a lo largo del tratamiento. El impacto del estrés en los resultados de las TRA es todavía algo controvertido, aunque se ha demostrado que el estrés afecta a la función reproductora en modelos animales, en humanos los trabajos realizados no dan resultados concluyentes. La evidencia de que el estrés psicológico durante el tratamiento está asociado a resultados negativos de la FIV es sugerente, pero no tiene suficientes pruebas de causalidad y los mecanismos que participan son desconocidos. Hemos de tener en cuenta que los medicamentos utilizados en la FIV también podrían ser lo suficientemente potentes como para anular el efecto del estrés en el cuerpo. Es esencial ofrecer un espacio para que los pacientes expresen sus sentimientos sobre la infertilidad. El objetivo médico de superar la infertilidad y el objetivo psicológico de apoyar en el proceso cuando se enfrenta a la infertilidad, pueden complementarse entre sí, ya que los pacientes se encuentran atrapados en una vorágine de angustia durante el tratamiento que puede resultar abrumadora durante esta difícil experiencia vital.

Una actitud normalizadora y de aceptación por parte del médico, con sugerencias sobre la posible utilidad del apoyo psicológico mientras los pacientes atraviesan su viaje de construcción de la familia, puede ser más propicia para que los pacientes reconozcan

su nivel de estrés. El trabajo psicoterapéutico con pacientes que experimentan infertilidad requiere sensibilidad y sintonía con las emociones y habilidades y de la pareja, así como de los conocimientos médico. Ofrecer este tipo de intervenciones refleja la comprensión de la complejidad de la infertilidad, el deseo de ayudar a los pacientes a reducir su angustia y mejorar su calidad de vida y transmite la idea de que la infertilidad puede llevarle a uno a un viaje, aunque sea estresante, del cual los pacientes suelen salir fortalecidos a pesar de la sensación de pérdida de su vida durante el mismo.



**Figura 10. Factores de estrés con impacto emocional en mujeres sometidas a TRA.**

## LIMITACIONES

1. El tamaño de la muestra analizada es muy reducido, y hubiese sido interesante disponer de un grupo control como pueden ser las donantes de óvulos, alguna de las cuales han tenido hijos previos.
2. El número de variables para analizar es bastante grande para el tamaño de la cohorte, lo que ha dificultado el estudio de análisis multivariantes y ajustar por las posibles variables de confusión.
3. No hemos tenido en cuenta la contribución del factor masculino, esto es importante en las variables número de ovocitos fecundados y el número de blastos obtenidos. Aunque en este caso el semen de las parejas utilizado fue seleccionado por técnica Zymot.
4. Los cuestionarios de ansiedad empleados están validados en la bibliografía, pero se pone de manifiesto la necesidad de cuestionarios específicos, donde recoger de manera muy detallada ítems como: sensación de fracaso, pesimismo, tristeza, alteraciones del sueño, sensación de culpa, problemas de concentración, fatiga, etc. Esto ayudaría a determinar el grado de ansiedad, estrés y depresión en el terreno de la infertilidad que permitirían valorar de manera más correcta el verdadero impacto de la infertilidad en la vida de estas parejas.
5. Sería interesante tener en cuenta el uso de técnicas o especialistas que ayudasen a reducir estos efectos y su posible influencia sobre el resultado de los ciclos.
6. Valorar el estado psicológico de la pareja masculina y como ha influido el tiempo que llevan intentando ser padres en sus vidas. Eso no se ha recogido, por ello se hace necesario el desarrollo de cuestionarios específicos
7. Ampliar el estudio con una cohorte mucho mayor, teniendo en cuenta los factores limitantes anteriormente indicados e introducir nuevas variables que han quedado sin recoger en este TFM como son la transferencia embrionaria, determinación de marcadores de inflamación y subpoblaciones celulares para ver el posible efecto que tiene la alteración de los ejes gonadales y el estrés sobre la consecución de embarazo.

## CONCLUSIONES

1. Se observan indicadores de ansiedad estado y ansiedad rasgo en el 10% de las pacientes analizadas. Lo que no nos permite establecer asociación, entre los niveles de estrés-ansiedad y los resultados de los ciclos de estimulación ovárica.
2. Se ha podido encontrar asociación entre los niveles de cortisol en suero y el percentil 75 de la variable ansiedad-rasgo.
3. No hemos encontrado asociación entre los valores de prolactina en suero y líquido folicular y los resultados de ciclo estimulación.
4. Se ha encontrado correlación positiva entre los niveles de cortisol en suero y el número de ovocitos obtenidos y su estado de maduración en el resultado del ciclo FIV.
5. Hemos hallado asociación positiva entre los niveles de hormona antimulleriana en sangre y el número de folículos antrales, así como el número de ovocitos y el estado de maduración en el resultado del ciclo de estimulación.

## ANEXOS

## BAREMOS STAI

Centiles	Puntuaciones directas								Decatipo
	Adolescentes				Adultos				
	VARONES		MUJERES		VARONES		MUJERES		
	Estado	Rasgo	Estado	Rasgo	Estado	Rasgo	Estado	Rasgo	
99	47-60	46-60	53-60	49-60	47-60	46-60	54-60	49-60	10
97	45	41	44	43	43	39-40	49	45	9
96	44	40	42-43	42	42	38	48	44	9
95	43	39	41	41	40-41	37	47	43	9
90	38	33	39	36	37	33	41	40	8
89	37	32	38	35	36	32	40	39	8
85	36	30	36	33	33	29	37	37	8
80	34	28	34	31	30	27	34	34	7
77	32	27	33	30	29	26	32	33	7
75	31	26	31	29	28	25	31	32	7
70	28	24	28	27	25	24	29	30	7
65	26	23	26	26	23	23	26	29	6
60	24	22	25	25	21	21	24	27	6
55	22	21	23	23	20	20	23	26	6
50	20	20	22	22	19	19	21	24	6
45	19	19	20	21	18	18	19	23	5
40	17	18	19	20	16	17	18	21	5
35	16	17	18	19	15	16	17	20	5
30	14	16	17	18	-	15	16	18	4
25	13	15	16	17	14	14	15	17	4
23	-	-	15	-	13	-	14	-	4
20	12	14	14	16	12	13	13	16	4
15	11	13	13	15	10	11	12	14	3
11	-	-	12	14	9	10	11	13	3
10	10	12	11	13	8	9	10	12	3
5	9	11	8	12	6	8	7	11	2
4	8	10	7	11	5	7	6	10	2
1	0-2	0-6	0-4	0-7	0-2	0-4	0-2	0-7	1
N	146	151	169	180	295	318	295	387	N
Media	22,35	21,30	23,28	23,42	20,54	20,19	23,30	24,99	Media
D. Típica	11,03	8,53	10,56	9,10	10,56	9,10	8,89	10,05	D. Típica

Tabla 1A. Baremos del cuestionario STAI

## 7.5. Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo (State-Trait Anxiety Inventory, STAI)

### ANSIEDAD-ESTADO

*Instrucciones:* A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la puntuación de 0 a 3 que indique mejor cómo se *siente usted ahora mismo*, en este momento. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa su situación presente.

1. Me siento calmado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
2. Me siento seguro	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
3. Estoy tenso	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
4. Estoy contrariado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
5. Me siento cómodo (estoy a gusto)	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
6. Me siento alterado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
7. Estoy preocupado ahora por posibles desgracias futuras	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
8. Me siento descansado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
9. Me siento angustiado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
10. Me siento confortable	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
11. Tengo confianza en mí mismo	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
12. Me siento nervioso	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
13. Estoy desasosegado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
14. Me siento muy «atado» (como oprimido)	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
15. Estoy relajado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
16. Me siento satisfecho	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
17. Estoy preocupado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
18. Me siento aturdido y sobreexcitado	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
19. Me siento alegre	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho
20. En este momento me siento bien	0. Nada 2. Bastante	1. Algo 3. Mucho

ANSIEDAD-RASGO

*Instrucciones:* A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la puntuación de 0 a 3 que indique mejor cómo se *siente usted en general*, en la mayoría de las ocasiones. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa cómo se siente usted generalmente.

21. Me siento bien	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
22. Me canso rápidamente	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
23. Siento ganas de llorar	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
24. Me gustaría ser tan feliz como otros	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
25. Pierdo oportunidades por no decidirme pronto	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
26. Me siento descansado	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
27. Soy una persona tranquila, serena y sosegada	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
28. Veo que las dificultades se amontonan y no puedo con ellas	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
29. Me preocupo demasiado por cosas sin importancia	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
30. Soy feliz	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
31. Suelo tomar las cosas demasiado seriamente	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
32. Me falta confianza en mí mismo	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
33. Me siento seguro	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
34. No suelo afrontar las crisis o dificultades	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
35. Me siento triste (melancólico)	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
36. Estoy satisfecho	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
37. Me rondan y molestan pensamientos sin importancia	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
38. Me afectan tanto los desengaños que no puedo olvidarlos	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
39. Soy una persona estable	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre
40. Cuando pienso sobre asuntos y preocupaciones actuales me pongo tenso y agitado	0. Casi nunca 2. A menudo	1. A veces 3. Casi siempre

Oviedo, 17 de junio de 2022

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias, ha revisado el Proyecto de Investigación (Trabajo Fin de Master) T.F.M. código del CEIm PA nº 2022.261, titulado **“EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE EL ÉXITO DE LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCION ASISTIDA”**. Investigadora Principal, Dña. SANDRA RODRIGUEZ RODERO, Universidad de Oviedo.

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado proyecto reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y en consecuencia emite su autorización.

Los Consentimientos informados deberán firmarse por duplicado (para dejar constancia de ello) y una copia deberá ser archivada con la documentación del estudio.

Le recuerdo que deberá guardarse la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este proyecto.

Fdo: PABLO ISIDRO MARRON  
Secretario del Comité de Ética de la Investigación  
del Principado de Asturias



## BIBLIOGRAFIA

1. Sominsky, L. *et al.* Linking Stress and Infertility: A Novel Role for Ghrelin. *Endocr. Rev.* **38**, 432–467 (2017).
2. Renzi, A. *et al.* The effects of an expressive writing intervention on pregnancy rates, alexithymia and psychophysical health during an assisted reproductive treatment. *Psychol. Health* **35**, 718–733 (2020).
3. Kahyaoglu Sut, H. & Balkanli Kaplan, P. Quality of life in women with infertility via the FertiQoL and the Hospital Anxiety and Depression Scales. *Nurs. Health Sci.* **17**, 84–89 (2015).
4. Sexty, R. E. *et al.* Psychometric characteristics of the FertiQoL questionnaire in a German sample of infertile individuals and couples. *Health Qual. Life Outcomes* **16**, (2018).
5. Zurlo, M. C., Cattaneo Della Volta, M. F. & Vallone, F. Predictors of quality of life and psychological health in infertile couples: the moderating role of duration of infertility. *Qual. Life Res.* **27**, 945–954 (2018).
6. Cooper, B. C., Gerber, J. R., McGettrick, A. L. & Johnson, J. V. Perceived infertility-related stress correlates with in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* **88**, 714–717 (2007).
7. Coughlan, C., Walters, S., Ledger, W. & Li, T. C. A comparison of psychological stress among women with and without reproductive failure. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **124**, 143–147 (2014).
8. Luk, B. H. K. & Loke, A. Y. Sexual satisfaction, intimacy and relationship of couples undergoing infertility treatment. *J. Reprod. Infant Psychol.* **37**, 108–122 (2019).
9. Bellver, J. & Donnez, J. Introduction: Infertility etiology and offspring health. *Fertil. Steril.* **111**, 1033–1035 (2019).
10. Chu, K. Y., Patel, P. & Ramasamy, R. Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr. Opin. Urol.* **29**, 267–271 (2019).

11. Schramm, E., Klein, D. N., Elsaesser, M., Furukawa, T. A. & Domschke, K. Review of dysthymia and persistent depressive disorder: history, correlates, and clinical implications. *The lancet. Psychiatry* **7**, 801–812 (2020).
12. Keskin, G. Approach to stress endocrine response: somatization in the context of gastroenterological symptoms: a systematic review. *Afr. Health Sci.* **19**, 2537–2545 (2019).
13. Keyes, C. L. M. & Ryff, C. D. Somatization and mental health: a comparative study of the idiom of distress hypothesis. *Soc. Sci. Med.* **57**, 1833–1845 (2003).
14. Arck, P. C. *et al.* Stress and immune mediators in miscarriage. *Hum. Reprod.* **16**, 1505–1511 (2001).
15. Qu, F. *et al.* The association between psychological stress and miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
16. Matthiesen, S. M. S., Frederiksen, Y., Ingerslev, H. J. & Zachariae, R. Stress, distress and outcome of assisted reproductive technology (ART): a meta-analysis. *Hum. Reprod.* **26**, 2763–2776 (2011).
17. Lynch, C. D., Sundaram, R., Buck Louis, G. M., Lum, K. J. & Pyper, C. Are increased levels of self-reported psychosocial stress, anxiety, and depression associated with fecundity? *Fertil. Steril.* **98**, 453–458 (2012).
18. Nakamura, K., Sheps, S. & Clara Arck, P. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. *J. Assist. Reprod. Genet.* **25**, 47–62 (2008).
19. Nadal, R., Armario, A. Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertens. y Riesgo Vasc.* **27**, 117–24 (2010).
20. Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* **5**, 374–381 (2009).
21. Ferguson, A. V., Latchford, K. J. & Sanon, W. K. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 717–727 (2008).
22. Ulrich-Lai, Y. M. & Herman, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic

- stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 397–409 (2009).
23. Murcio-Ramírez, J. S. La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *Rev. Educ. Bioquímica* **26**, 121–28 (2007).
  24. de Kloet, E. R., Karst, H. & Joëls, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 268–272 (2008).
  25. Prager, E. M. & Johnson, L. R. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Sci. Signal.* **2**, (2009).
  26. Viau, V., Bingham, B., Davis, J., Lee, P. & Wong, M. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* **146**, 137–146 (2005).
  27. Babb, J. A., Masini, C. V., Day, H. E. W. & Campeau, S. Sex differences in activated corticotropin-releasing factor neurons within stress-related neurocircuitry and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones following restraint in rats. *Neuroscience* **234**, 40–52 (2013).
  28. Iwasaki-Sekino, A., Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Yamauchi, N. & Shibasaki, T. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 226–237 (2009).
  29. Larkin, J. W., Binks, S. L., Li, Y. & Selvage, D. The role of oestradiol in sexually dimorphic hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to intracerebroventricular ethanol administration in the rat. *J. Neuroendocrinol.* **22**, 24–32 (2010).
  30. Seale, J. V., Wood, S. A., Atkinson, H. C., Harbuz, M. S. & Lightman, S. L. Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 989–998 (2004).
  31. Seale, J. V. *et al.* Gonadectomy reverses the sexually divergent patterns of circadian

- and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 516–524 (2004).
32. Figueiredo, H. F., Dolgas, C. M. & Herman, J. P. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. *Endocrinology* **143**, 2534–2540 (2002).
  33. Turner, B. B. & Debra A., W. Sexual dimorphism of glucocorticoid binding in rat brain. *Brain Res.* **343**, 16–23 (1985).
  34. Turner, B. B. Sex difference in glucocorticoid binding in rat pituitary is estrogen dependent. *Life Sci.* **46**, 1399–1406 (1990).
  35. Karandrea, D., Kittas, C. & Kitraki, E. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology* **75**, 217–226 (2002).
  36. Bangasser, D. A. & Valentino, R. J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 303–319 (2014).
  37. Panagiotakopoulos, L. & Neigh, G. N. Development of the HPA axis: where and when do sex differences manifest? *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 285–302 (2014).
  38. McCormick, C. M., Linkroum, W., Sallinen, B. J. & Miller, N. W. Peripheral and central sex steroids have differential effects on the HPA axis of male and female rats. *Stress* **5**, 235–247 (2002).
  39. Kudielka, B. M. & Kirschbaum, C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol. Psychol.* **69**, 113–132 (2005).
  40. Romeo, R. D. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 232–240 (2010).
  41. Gomez, F., Manalo, S. & Dallman, M. F. Androgen-sensitive changes in regulation of restraint-induced adrenocorticotropin secretion between early and late puberty in male rats. *Endocrinology* **145**, 59–70 (2004).
  42. Uhart, M., Chong, R. Y., Oswald, L., Lin, P. I. & Wand, G. S. Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity.

- Psychoneuroendocrinology* **31**, 642–652 (2006).
43. Seeman, T. E., Singer, B., Wilkinson, C. W. & Bruce McEwen. Gender differences in age-related changes in HPA axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 225–240 (2001).
  44. Kirschbaum, C., Kudielka, B. M., Gaab, J., Schommer, N. C. & Hellhammer, D. H. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosom. Med.* **61**, 154–162 (1999).
  45. Rohleder, N., Schommer, N. C., Hellhammer, D. H., Engel, R. & Kirschbaum, C. Sex differences in glucocorticoid sensitivity of proinflammatory cytokine production after psychosocial stress. *Psychosom. Med.* **63**, 966–972 (2001).
  46. Lovick, T. A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* **45**, 314–320 (2012).
  47. Viau, V. & Meaney, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* **129**, 2503–2511 (1991).
  48. Bronson, S. L. & Bale, T. L. The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming. *Neuropsychopharmacology* **41**, 207–218 (2016).
  49. Manoli, D. S. & Tollkuhn, J. Gene regulatory mechanisms underlying sex differences in brain development and psychiatric disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1420**, 26–45 (2018).
  50. Bale, T. L. Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress* **14**, 348–356 (2011).
  51. Lindsay, J. R. & Nieman, L. K. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment. *Endocr. Rev.* **26**, 775–799 (2005).
  52. Burton, G. J., Jauniaux, E. & Charnock-Jones, D. S. Human early placental

- development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* **28 Suppl A**, (2007).
53. Mastorakos, G. & Ilias, I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **997**, 136–149 (2003).
54. Kalantaridou, S. N., Zoumakis, E., Makrigiannakis, A., Godoy, H. & Chrousos, G. P. The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance. *Horm. Metab. Res.* **39**, 474–477 (2007).
55. Kalantaridou, S. N., Makrigiannakis, A., Mastorakos, G. & Chrousos, G. P. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **997**, 129–135 (2003).
56. Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., Chrousos, G. & Gravanis, A. Uterine and embryonic trophoblast CRH promotes implantation and maintenance of early pregnancy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **997**, 85–92 (2003).
57. Vitoratos, N., Papatheodorou, D. C., Kalantaridou, S. N. & Mastorakos, G. ‘Reproductive’ corticotropin-releasing hormone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**, 310–318 (2006).
58. Magiakou, M. A., Mastorakos, G., Webster, E. & Chrousos, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **816**, 42–56 (1997).
59. Nepomnaschy, P. A., Sheiner, E., Mastorakos, G. & Arck, P. C. Stress, immune function, and women’s reproduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**, 350–364 (2007).
60. Joachim, R. *et al.* The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids* **68**, 931–940 (2003).
61. Wiebold, J. L., Stanfield, P. H., Becker, W. C. & Hillers, J. K. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J. Reprod. Fertil.* **78**, 185–192 (1986).
62. Blois, S. M. *et al.* Depletion of CD8<sup>+</sup> cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the

- Th1/Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* **172**, 5893–5899 (2004).
63. Blois, S. M. *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat. Med.* **13**, 1450–1457 (2007).
64. Arck, P., Hansen, P. J., Jericevic, B. M., Piccinni, M. P. & Szekeres-Bartho, J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* **58**, 268–279 (2007).
65. Omar, M. H., Mashita, M. K., Lim, P. S. & Jamil, M. A. Dihydroprogesterone in threatened abortion: pregnancy outcome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **97**, 421–425 (2005).
66. Raghupathy, R., Al Mutawa, E., Makhseed, M., Azizieh, F. & Szekeres-Bartho, J. Modulation of cytokine production by dihydroprogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG* **112**, 1096–1101 (2005).
67. Kalinka, J. & Szekeres-Bartho, J. The impact of dihydroprogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone-induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* **53**, 166–171 (2005).
68. Gao, Y. *et al.* Stresses on Female Mice Impair Oocyte Developmental Potential: Effects of Stress Severity and Duration on Oocytes at the Growing Follicle Stage. *Reprod. Sci.* **23**, 1148–1157 (2016).
69. Wu, L. M. *et al.* Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One* **7**, (2012).
70. Wu, L. M. *et al.* Inhibition of follicular development induced by chronic unpredictable stress is associated with growth and differentiation factor 9 and gonadotropin in mice. *Biol. Reprod.* **86**, (2012).
71. Yuan, H. J. *et al.* Glucocorticoids impair oocyte developmental potential by triggering apoptosis of ovarian cells via activating the Fas system. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
72. Heck, A. L. & Handa, R. J. Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis’ response to stress: an important role for gonadal hormones.

- Neuropsychopharmacology* **44**, 45–58 (2019).
73. Oyola, M. G. & Handa, R. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* **20**, 476–494 (2017).
74. Toufexis, D., Rivarola, M. A., Lara, H. & Viau, V. Stress and the reproductive axis. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 573–586 (2014).
75. Hou, G., Xiong, W., Wang, M., Chen, X. & Yuan, T. F. Chronic stress influences sexual motivation and causes damage to testicular cells in male rats. *J. Sex. Med.* **11**, 653–663 (2014).
76. Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H. & Catt, K. J. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 402–408 (2009).
77. Millar, R. P. GnRHs and GnRH receptors. *Anim. Reprod. Sci.* **88**, 5–28 (2005).
78. Meethal, S. V. & Atwood, C. S. The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 257–270 (2005).
79. Barbarino, A. *et al.* Corticotropin-releasing hormone inhibition of gonadotropin secretion during the menstrual cycle. *Metabolism.* **38**, 504–506 (1989).
80. Williams, C. L. *et al.* Corticotropin-releasing factor and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. Electrophysiological studies. *Neuroendocrinology* **52**, 133–137 (1990).
81. Rivier, C. & Vale, W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology* **114**, 914–921 (1984).
82. Ariza Traslaviña, G. A. & Franci, C. R. Divergent roles of the CRH receptors in the control of gonadotropin secretion induced by acute restraint stress at proestrus. *Endocrinology* **153**, 4838–4848 (2012).
83. Li, X. F. *et al.* Differential role of corticotrophin-releasing factor receptor types 1 and 2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* **18**, 602–610 (2006).

84. Xiao, F. L., Bowe, J. E., Lightman, S. L. & O'Byrne, K. T. Role of corticotropin-releasing factor receptor-2 in stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **146**, 318–322 (2005).
85. Jasoni, C. L., Todman, M. G., Han, S. K. & Herbison, A. E. Expression of mRNAs encoding receptors that mediate stress signals in gonadotropin-releasing hormone neurons of the mouse. *Neuroendocrinology* **82**, 320–328 (2005).
86. Ciechanowska, M. *et al.* Effect of short-term and prolonged stress on the biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor (GnRHR) in the hypothalamus and GnRHR in the pituitary of ewes during various physiological states. *Anim. Reprod. Sci.* **174**, 65–72 (2016).
87. Watanabe, M., Fukuda, A. & Nabekura, J. The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front. Neurosci.* **8**, (2014).
88. Keen, K. L., Burich, A. J., Mitsushima, D., Kasuya, E. & Terasawa, E. Effects of pulsatile infusion of the GABA(A) receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology* **140**, 5257–5266 (1999).
89. Li, X. F., Shao, B., Lin, C. C., O'Byrne, K. T. & Lin, Y. S. Stress-induced inhibition of LH pulses in female rats: role of GABA in arcuate nucleus. *J. Mol. Endocrinol.* **55**, 9–19 (2015).
90. Lin, Y. S. *et al.* The role of GABAergic signalling in stress-induced suppression of gonadotrophin-releasing hormone pulse generator frequency in female rats. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 477–488 (2012).
91. Hu, K. L. *et al.* Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. *Hum. Reprod. Update* **25**, 326–343 (2019).
92. Trevisan, C. M. *et al.* Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction? *Cell. Physiol. Biochem.* **49**, 1259–1276 (2018).
93. Navarro, V. M. Metabolic regulation of kisspeptin - the link between energy balance and reproduction. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 407–420 (2020).
94. Chan, Y. M., Broder-Fingert, S., Wong, K. M. & Seminara, S. B. Kisspeptin/Gpr54-independent gonadotrophin-releasing hormone activity in

- Kiss1 and Gpr54 mutant mice. *J. Neuroendocrinol.* **21**, 1015–1023 (2009).
95. Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K. & Irahara, M. Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 62 (2017).
  96. Geraghty, A. C. *et al.* Knockdown of hypothalamic RFRP3 prevents chronic stress-induced infertility and embryo resorption. *Elife* **4**, (2015).
  97. Kirby, E. D., Geraghty, A. C., Ubuka, T., Bentley, G. E. & Kaufer, D. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11324–11329 (2009).
  98. Ubuka, T. *et al.* Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* **4**, (2009).
  99. Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K. & Irahara, M. Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, (2017).
  100. Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., Mayila, Y. & Irahara, M. The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocr. J.* **65**, 133–140 (2018).
  101. Suter, D. E., Schwartz, N. B. & Ringstrom, S. J. Dual role of glucocorticoids in regulation of pituitary content and secretion of gonadotropins. *Am. J. Physiol.* **254**, (1988).
  102. Melis, G. B. *et al.* Dexamethasone reduces the postcastration gonadotropin rise in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65**, 237–241 (1987).
  103. Li, P. S. & Wagner, W. C. In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol. Reprod.* **29**, 25–37 (1983).
  104. Suter, D. E. & Schwartz, N. B. Effects of glucocorticoids on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **117**, 849–854 (1985).

105. Breen, K. M. *et al.* Stress levels of glucocorticoids inhibit LH $\beta$ -subunit gene expression in gonadotrope cells. *Mol. Endocrinol.* **26**, 1716–1731 (2012).
106. Kononen, J., Honkaniemi, J., Gustafsson, J. Å & Peltö-huikko, M. Glucocorticoid receptor colocalization with pituitary hormones in the rat pituitary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* **93**, 97–103 (1993).
107. Yazawa, H., Sasagawa, I. & Nakada, T. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Hum. Reprod.* **15**, 1917–1920 (2000).
108. Janevic, T. *et al.* Effects of work and life stress on semen quality. *Fertil. Steril.* **102**, 530–538 (2014).
109. Abu-Musa, A. A., Nassar, A. H., Hannoun, A. B. & Usta, I. M. Effect of the Lebanese civil war on sperm parameters. *Fertil. Steril.* **88**, 1579–1582 (2007).
110. Bhongade, M. B. *et al.* Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. *Andrologia* **47**, 336–342 (2015).
111. Hu, G. X. *et al.* Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids* **73**, 1018–1024 (2008).
112. Van Merris, V., Van Wemmel, K. & Cortvrindt, R. In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. *Reprod. Toxicol.* **23**, 32–41 (2007).
113. González, R., Ruiz-León, Y., Gomendio, M. & Roldan, E. R. S. The effect of glucocorticoids on ERK-1/2 phosphorylation during maturation of lamb oocytes and their subsequent fertilization and cleavage ability in vitro. *Reprod. Toxicol.* **29**, 198–205 (2010).
114. Lewicka, S. *et al.* Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Hum. Reprod.* **18**, 1613–1617 (2003).
115. Kushnir, M. M. *et al.* Steroid profiles in ovarian follicular fluid from regularly menstruating women and women after ovarian stimulation. *Clin. Chem.* **55**, 519–526 (2009).

116. Thurston, L. M. *et al.* Ovarian modulators of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11betaHSD) activity and intra-follicular cortisol:cortisone ratios correlate with the clinical outcome of IVF. *Hum. Reprod.* **18**, 1603–1612 (2003).
117. Lara, H. E., McDonald, J. K., Ojeda, S. R. & Ojeda, S. R. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* **126**, 364–375 (1990).
118. Aguadot, L. I. & Ojeda, S. R. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* **114**, 1845–1853 (1984).
119. Merz, C. *et al.* Expression of the beta-2 adrenergic receptor (ADRB-2) in human and monkey ovarian follicles: a marker of growing follicles? *J. Ovarian Res.* **8**, (2015).
120. Hernandez, E. R., Jimenez, J. L., Adashi, E. Y. & Payne, D. W. Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via beta 2-adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology* **122**, 1592–1602 (1988).
121. Paredes, A. *et al.* Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* **8**, 309–315 (1998).
122. Fernandois, D., Lara, H. E. & Paredes, A. H. Blocking of  $\beta$ -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Horm. Metab. Res.* **44**, 682–687 (2012).
123. Berni, T. R., Morgan, C. L., Berni, E. R. & Rees, D. A. Polycystic Ovary Syndrome Is Associated With Adverse Mental Health and Neurodevelopmental Outcomes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 2116–2125 (2018).
124. Damone, A. L. *et al.* Depression, anxiety and perceived stress in women with and without PCOS: a community-based study. *Psychol. Med.* **49**, 1510–1520 (2019).
125. Khorram, O., Castro, J. C. B. De, McCann, S. M. & De Castro, J. C. B. Stress-induced secretion of alpha-melanocyte-stimulating hormone and its physiological role in modulating the secretion of prolactin and luteinizing hormone in the female rat. *Endocrinology* **117**, 2483–2489 (1985).

126. BEN-JONATHAN, N., MERSHON, J. L., ALLEN, D. L. & STEINMETZ, R. W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* **17**, 639–669 (1996).
127. Marano, R. J. & Ben-Jonathan, N. Minireview: Extrapituitary prolactin: An update on the distribution, regulation, and functions. *Mol. Endocrinol.* **28**, 622–633 (2014).
128. Donner, N., Bredewold, R., Maloumby, R. & Neumann, I. D. Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 1804–1814 (2007).
129. J H Mattox, M T Buckman, J Bernstein, D Pathak, R. K. Dopamine agonists for reducing depression associated with hyperprolactinemia. *J Reprod Med.* **31**, 694–8 (1986).
130. Mohankumar, P. S., Mohankumar, S. M. J., Quadri, S. K. & Voogt, J. L. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Res. Bull.* **42**, 435–441 (1997).
131. Hamelson, J. L. Anterior pituitary: physiology of pituitary hormones. in *Harrison's Endocrinology* (ed. J. Larry Jameson, Dennis L Kasper, Stephen L Hauser, ANTHONY S. FAUCI, DAN L. LONGO, J. L.) 18–25 (McGraw Hill Education, 2017).
132. Koyyada, A. & Orsu, P. Role of hypothyroidism and associated pathways in pregnancy and infertility: Clinical insights. *Tzu chi Med. J.* **32**, 312–317 (2020).
133. Glezer A, B. M. *Hyperprolactinemia*. (Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.2000, 2018).
134. Shelly, S., Boaz, M. & Orbach, H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **11**, (2012).
135. Kooy, A. *et al.* Evidence for the involvement of corticotropin-releasing factor in the inhibition of gonadotropin release induced by hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology* **51**, 261–266 (1990).
136. Weber, R. F. A. & Calogero, A. E. Prolactin stimulates rat hypothalamic

- corticotropin-releasing hormone and pituitary adrenocorticotropin secretion in vitro. *Neuroendocrinology* **54**, 248–253 (1991).
137. Glasow, A. *et al.* Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3103–3111 (1996).
138. Higuchi, K. *et al.* Prolactin has a direct effect on adrenal androgen secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**, 714–718 (1984).
139. Schwärzler, P. *et al.* Prolactin gene expression and prolactin protein in premenopausal and postmenopausal human ovaries. *Fertil. Steril.* **68**, 696–701 (1997).
140. Imaoka, T., Matsuda, M. & Mori, T. Expression of prolactin messenger ribonucleic acid in the mouse gonads during sexual maturation. *Life Sci.* **63**, 2251–2258 (1998).
141. Romão, G. S., Ferriani, R. A., Moura, M. D. & Martins, A. R. Screening for prolactin isoforms in the follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Gynecol. Obstet. Invest.* **54**, 46–49 (2002).
142. Phelps, J. Y. *et al.* Prolactin gene expression in human ovarian follicular cells. *Fertil. Steril.* **79**, 182–185 (2003).
143. Shibaya, M. *et al.* Bovine corpus luteum is an extrapituitary site of prolactin production. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 512–519 (2006).
144. Erdmann, S. *et al.* The expression of prolactin and its cathepsin D-mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, (2007).
145. Tanaka, S. *et al.* Regional comparison of prolactin gene expression in the human decidualized endometrium in early and term pregnancy. *Eur. J. Endocrinol.* **135**, 177–183 (1996).
146. Maaskant, R. A., Bogic, L. V, Gilger, S., Kelly, P. A. & Bryant-Greenwood, G. D. The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 396–405 (1996).

147. Jones, R. L., Critchley, H. O. D., Brooks, J., Jabbour, H. N. & Mcneilly, A. S. Localization and temporal expression of prolactin receptor in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 258–262 (1998).
148. BEN-JONATHAN, N., MERSHON, J. L., ALLEN, D. L. & STEINMETZ, R. W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* **17**, 639–669 (1996).
149. Wu, H., Devi, R. & Malarkey, W. B. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology* **137**, 349–353 (1996).
150. Clevenger, C. V., Russell, D. H., Appasamy, P. M. & Prystowsky, M. B. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6460–6464 (1990).
151. Hartmann, D. P., Holaday, J. W. & Bernton, E. W. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J.* **3**, 2194–2202 (1989).
152. Matera, L., Cesano, A., Bellone, G. & Oberholtzer, E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain. Behav. Immun.* **6**, 409–417 (1992).
153. Buckley, A. R. Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus* **10**, 684–690 (2001).
154. Oberholtzer, E. *et al.* Prolactin increases the susceptibility of primary leukemia cells to NK and LAK effectors. *Adv. Neuroimmunol.* **6**, 233–247 (1996).
155. Cesano, A. *et al.* Independent and synergistic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors. *Immunopharmacology* **28**, 67–75 (1994).
156. Matera, L., Mori, M. & Galetto, A. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus* **10**, 728–734 (2001).
157. Carreño, P. C., Jiménez, E., Sacedón, R., Vicente, A. & Zapata, A. G. Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* **153**, 83–90 (2004).

158. Yu-Lee, L. Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog. Horm. Res.* **57**, 435–455 (2002).
159. Rincheval-Arnold, A., Belair, L., Cencic, A. & Djiane, J. Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor mRNA in mammary epithelial cells by IFN-gamma. *Mol. Cell. Endocrinol.* **194**, 95–105 (2002).
160. Matera, L. & Mori, M. Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 505–513 (2000).
161. Mukherjee, P., Mastro, A. M., Hymer, W. C. & Hymer, W. C. Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology* **126**, 88–94 (1990).
162. Krishnan, N., Thellin, O., Buckley, D. J., Horseman, N. D. & Buckley, A. R. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* **144**, 2102–2110 (2003).
163. Fernández, M. L., Iglesias, M. M., Biron, V. A. & Wolfenstein-Todel, C. Protective effect of prolactin and placental lactogen on NO-induced Nb2 lymphoma cell apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 249–256 (2003).
164. Buckley, A. R. & Buckley, D. J. Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 522–533 (2000).
165. Stiehm ER, Ochs H, W. J. *Immunology of the pregnancy; immunologic disorders in infants and children.* (Elsevier Saunders, 2004).
166. Kanellopoulos-Langevin, C., Caucheteux, S. M., Verbeke, P. & Ojcius, D. M. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, (2003).
167. Sasaki, Y. *et al.* Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 347–353 (2004).
168. Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M. & Betz, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* **5**, 266–271 (2004).

169. Mei, J. *et al.* Inhibition of IDO1 suppresses cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression and decreases proliferation, adhesion and invasion of endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* **18**, 467–476 (2012).
170. Zardoya-Laguardia, P. *et al.* Endothelial indoleamine 2,3-dioxygenase-1 regulates the placental vascular tone and is deficient in intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
171. Mellor, A. L. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **57**, 143–150 (2002).
172. Raghupathy, R. *et al.* Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* **15**, 713–718 (2000).
173. Ng, S. C. *et al.* Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **48**, 77–86 (2002).
174. Nakagawa, K. *et al.* Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood TH1/TH2 cell ratios. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73**, 353–361 (2015).
175. Mekinian, A. *et al.* Unexplained Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: Is There a Place for Immunomodulation? *Am. J. Reprod. Immunol.* **76**, 8–28 (2016).
176. Kuroda, K. *et al.* Analysis of the risk factors and treatment for repeated implantation failure: OPTimization of Thyroid function, IMMunity, and Uterine Milieu (OPTIMUM) treatment strategy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **85**, (2021).
177. Azizi, R. *et al.* Cyclosporine A improves pregnancy outcomes in women with recurrent pregnancy loss and elevated Th1/Th2 ratio. *J. Cell. Physiol.* **234**, 19039–19047 (2019).
178. Winger, E. E. *et al.* Degree of TNF- $\alpha$ /IL-10 cytokine elevation correlates with IVF success rates in women undergoing treatment with Adalimumab (Humira) and IVIG. *Am. J. Reprod. Immunol.* **65**, 610–618 (2011).

179. Winger, E. E. *et al.* Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF. *Am. J. Reprod. Immunol.* **61**, 113–120 (2009).
180. Nakagawa, K. *et al.* Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood th1/th2 cell ratios. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73**, 353–361 (2015).
181. Nakagawa, K., Kwak-Kim, J., Kuroda, K., Sugiyama, R. & Yamaguchi, K. Immunosuppressive treatment using tacrolimus promotes pregnancy outcome in infertile women with repeated implantation failures. *Am. J. Reprod. Immunol.* **78**, (2017).
182. McMurray, R. W., Suwannaroj, S., Ndebele, K. & Jenkins, J. K. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology* **69**, 44–58 (2001).
183. Bird, M. D., Karavitis, J. & Kovacs, E. J. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cell. Immunol.* **252**, 57–67 (2008).
184. Jansson, L. & Holmdahl, R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflamm. Res.* **47**, 290–301 (1998).
185. Raghupathy, R. *et al.* Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J. Reprod. Immunol.* **80**, 91–99 (2009).
186. Bouman, A., Jan Heineman, M. & Faas, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update* **11**, 411–423 (2005).
187. Seppälä, M., Taylor, R. N., Koistinen, H., Koistinen, R. & Milgrom, E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr. Rev.* **23**, 401–430 (2002).
188. Blois, S. M. *et al.* A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat. Med.* **13**, 1450–1457 (2007).
189. Terness, P. *et al.* Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins,

- and the renaissance of regulatory T cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **58**, 238–254 (2007).
190. Robertson, S. A., Care, A. S. & Moldenhauer, L. M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.* **128**, 4224–4235 (2018).
  191. CLARK, D. A., BANWATT, D. & CHAOUAT, G. Stress-triggered abortion in mice prevented by alloimmunization. *Am. J. Reprod. Immunol.* **29**, 141–147 (1993).
  192. Steinman, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat. Immunol.* **5**, 575–581 (2004).
  193. Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M. & Schedlowski, M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain. Behav. Immun.* **10**, 77–91 (1996).
  194. Solano, M. E. & Arck, P. C. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Front. Immunol.* **10**, (2020).
  195. Chovatiya, R. & Medzhitov, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell* **54**, 281–288 (2014).
  196. Cacioppo, J. T. *et al.* Autonomic, neuroendocrine, and immune responses to psychological stress: the reactivity hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **840**, 664–673 (1998).
  197. Druckmann, R. & Druckmann, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **97**, 389–396 (2005).
  198. Wang, H. *et al.* Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol. Aspects Med.* **34**, 939–980 (2013).
  199. Zhang, S. *et al.* Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol. Reprod. Dev.* **80**, 8–21 (2013).
  200. Gellersen, B. & Brosens, J. J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr. Rev.* **35**, 851–905 (2014).
  201. Okada, H., Tsuzuki, T. & Murata, H. Decidualization of the human endometrium.

- Reprod. Med. Biol.* **17**, 220–227 (2018).
202. Wu, J. X., Lin, S. & Kong, S. B. Psychological Stress and Functional Endometrial Disorders: Update of Mechanism Insights. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **12**, (2021).
  203. Spielberger CD, Gorsuch RC, L. R. *Manual for the State Trait Anxiety Inventory*. (1970).
  204. Spielberger C, Gorsuch R, L. R. *Cuestionario de Ansiedad (Estado-Rasgo)*. (2015).
  205. (2022), R. C. T. R: A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria. URL*
  206. H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. (2016).
  207. Berg, B. J. & Wilson, J. F. Psychological functioning across stages of treatment for infertility. *J. Behav. Med.* **14**, 11–26 (1991).
  208. Nouman, H. & Zanbar, L. Support or stressor? The community as a predictor of perceptions of infertility. *Soc. Work Health Care* **59**, 650–667 (2020).
  209. Callan, V. J. & Hennessey, J. F. The psychological adjustment of women experiencing infertility. *Br. J. Med. Psychol.* **61 ( Pt 2)**, 137–140 (1988).
  210. Chen, T. H., Chang, S. P., Tsai, C. F. & Juang, K. D. Prevalence of depressive and anxiety disorders in an assisted reproductive technique clinic. *Hum. Reprod.* **19**, 2313–2318 (2004).
  211. King, R. B. Subfecundity and anxiety in a nationally representative sample. *Soc. Sci. Med.* **56**, 739–751 (2003).
  212. Kainz, K. The role of the psychologist in the evaluation and treatment of infertility. *Womens. Health Issues* **11**, 481–485 (2001).
  213. Demyttenaere, K. *et al.* Coping style and depression level influence outcome in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **69**, 1026–1033 (1998).
  214. Anderheim, L., Holter, H., Bergh, C. & Möller, A. Does psychological stress affect the outcome of in vitro fertilization? *Hum. Reprod.* **20**, 2969–2975 (2005).

215. Koumparou, M., Bakas, P., Pantos, K., Economou, M. & Chrousos, G. Stress management and In Vitro Fertilization (IVF): A pilot randomized controlled trial. *Psychiatrike* **32**, 290–299 (2021).
216. Xi, W. *et al.* Scream Sound-induced Chronic Psychological Stress Results in Diminished Ovarian Reserve in Adult Female Rat. *Endocrinology* **163**, (2022).
217. Lindner, C., Lichtenberg, V., Westhof, G., Braendle, W. & Bettendorf, G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm. Metab. Res.* **20**, 243–246 (1988).
218. Ciepiela, P. *et al.* Oocyte matched follicular fluid anti-Müllerian hormone is an excellent predictor of live birth after fresh single embryo transfer. *Hum. Reprod.* **34**, 2244–2253 (2019).
219. Verhaak, C. M., Smeenk, J. M. J., van Minnen, A., Kremer, J. A. M. & Kraaijmaat, F. W. A longitudinal, prospective study on emotional adjustment before, during and after consecutive fertility treatment cycles. *Hum. Reprod.* **20**, 2253–2260 (2005).
220. Padda, J. *et al.* Depression and Its Effect on the Menstrual Cycle. *Cureus* **13**, e16532 (2021).
221. Harlow, B. L., Wise, L. A., Otto, M. W., Soares, C. N. & Cohen, L. S. Depression and its influence on reproductive endocrine and menstrual cycle markers associated with perimenopause: the Harvard Study of Moods and Cycles. *Arch. Gen. Psychiatry* **60**, 29–36 (2003).
222. Galst, J. P. The elusive connection between stress and infertility: A research review with clinical implications. *J Psychother Integr.* **28**, 1–13 (2018).
223. Sasson, R., Shinder, V., Dantes, A., Land, A. & Amsterdam, A. Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: Protection of ovarian follicular cells against apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1047–1056 (2003).
224. Sasson, R. & Amsterdam, A. Pleiotropic anti-apoptotic activity of glucocorticoids in ovarian follicular cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1393–1401 (2003).

225. Michael, T. E. *et al.* Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **38**, 641–644 (1993).
226. Yding Andersen, C. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J. Endocrinol.* **173**, 211–217 (2002).
227. Schreiber, J. R., Nakamura, K. & Erickson, G. F. Rat ovary glucocorticoid receptor: identification and characterization. *Steroids* **39**, 569–584 (1982).
228. Massey, A. J. *et al.* Relationship between hair and salivary cortisol and pregnancy in women undergoing IVF. *Psychoneuroendocrinology* **74**, 397–405 (2016).
229. Poulain, M. *et al.* Dexamethasone induces germ cell apoptosis in the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, (2012).
230. Demyttenaere, K., Nijs, P., Evers-Kiebooms, G. & Koninckx, P. R. Coping and the ineffectiveness of coping influence the outcome of in vitro fertilization through stress responses. *Psychoneuroendocrinology* **17**, 655–665 (1992).
231. Nouri, K. *et al.* Saliva cortisol levels and subjective stress are not associated with number of oocytes after controlled ovarian hyperstimulation in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **96**, 69–72 (2011).
232. Andersen, C. Y. & Hornnes, P. Intrafollicular concentrations of free cortisol close to follicular rupture. *Hum. Reprod.* **9**, 1944–1949 (1994).
233. Fateh, M., Ben-Rafael, Z., Benadiva, C. A., Mastroianni, L. & Flickinger, G. L. Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertil. Steril.* **51**, 538–541 (1989).
234. Bider D, Shine S, Turkaspa I, Leuren J, D. J. Cortisol concentrations in follicular fluid of low responder patients. *Hum Reprod.* **1**, 27–9 (1998).
235. Ravisankar, S. *et al.* Metabolomics analysis of follicular fluid coupled with oocyte aspiration reveals importance of glucocorticoids in primate periovulatory follicle competency. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
236. Reinthaller, A. *et al.* Relationship between the steroid and prolactin concentration

- in follicular fluid and the maturation and fertilization of human oocytes. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* **4**, 228–231 (1987).
237. Lee, M., Ben-Rafael, Z., Meloni, F., Mastroianni, L. & Flickinger, G. L. Relationship of human oocyte maturity, fertilization, and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* **4**, 168–172 (1987).
238. Mendoza, C. *et al.* Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum. Reprod.* **17**, 1017–1022 (2002).