

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
***Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida***

**EFFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA
FERTILIDAD HUMANA.**

Autor: Yvan Torreblanca Mora

Tutor: Lourdes Franco Hernández

Cotutor: Jose Rivera Torres

Alcobendas, Septiembre 2023

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	3
Abstract.....	4
1. Introducción	6
2. Objetivos	10
3. Materiales y métodos	10
4. Resultados	12
4.1 La Fertilidad y la relación existente el estilo de vida	12
4.2 Efectos de la melatonina sobre la fertilidad humana	14
4.3 Funciones de la melatonina en la reproducción humana	14
Papel de la melatonina en la fisiología del esperma.....	14
Influencia de la melatonina en el desarrollo del folículo ovárico y la ovulación	15
Relación entre Melatonina y Fase lútea.....	16
Efectos de la melatonina en la placenta.....	16
4.4 Melatonina y Técnicas de Reproducción Asistida (TRA)	17
4.5 Efecto de la melatonina sobre la calidad ovocitaria y embrionaria	18
4.6 Aplicación de la melatonina en la preparación de muestras seminales para TRA	20
4.7 Melatonina como agente protector en procesos de criopreservación de gametos en el laboratorio	21
4.8 Impacto de la melatonina en la fisiopatología de órganos reproductivos 23	
Endometriosis	23
Síndrome de ovario poliquístico (SOP).....	23
Varicocele.....	24
4.9 Efecto de la suplementación con melatonina exógena en el ADN espermático	25

4.10 Efectos de la suplementación con melatonina exógena sobre la fertilidad femenina	29
5. Discusión	32
6. Conclusión	33
7. Bibliografía	34

RESUMEN

La melatonina es una hormona producida por la glándula pineal que tiene una variedad de funciones en el cuerpo humano, incluyendo la regulación del sueño, el sistema inmunológico y las funciones reproductivas.

En esta revisión bibliográfica, se ha examinado la relación entre la melatonina y las funciones reproductivas humanas, incluyendo la producción de espermatozoides, la ovulación y la capacidad de implantación de los embriones. Los estudios realizados sugieren que dicha indolamina puede tener un efecto beneficioso en la fertilidad masculina y femenina, así como en el éxito de la implantación embrionaria en mujeres sometidas a tratamientos de fertilidad.

Sin embargo, presenta algunas limitaciones en la investigación actual sobre este tema, como la falta de estudios a gran escala y la necesidad de investigar más detalladamente los efectos a largo plazo de la melatonina en la fertilidad humana.

En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica usando una base de datos en línea, PubMed, visualizando aquellos estudios realizados en los últimos 10 años con palabras clave como: Suplementación exógena de melatonina, calidad espermática, calidad ovocitaria, reproducción asistida, entre otras.

Palabras clave: Melatonina, ROS (Especies Reactivas de Oxígeno), Daño espermático, Técnicas de Reproducción Asistida, Suplementación exógena, Cultivo embrionario, Ensayo TUNEL, Calidad ovocitaria, Calidad espermática.

ABSTRACT

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland that has a variety of functions in the human body, including the regulation of sleep, the immune system, and reproductive functions.

In this literature review, the relationship between melatonin and human reproductive functions has been examined, including sperm production, ovulation, and embryo implantation capacity. Studies suggest that this indoleamine may have a beneficial effect on male and female fertility, as well as on the success of embryo implantation in women undergoing fertility treatments.

However, there are some limitations in current research on this topic, such as the lack of large-scale studies and the need for further investigation into the long-term effects of melatonin on human fertility.

Overall, these findings suggest that melatonin may have an important role in regulating human reproductive functions and may be useful as a complementary treatment in patients with fertility problems.

A literature review has been conducted using an online database, PubMed, focusing on studies conducted in the last 10 years with keywords such as exogenous melatonin supplementation, sperm quality, oocyte quality, assisted reproduction.

Keywords: Melatonin, ROS (Reactive Oxygen Species), Sperm damage, Assisted Reproductive Techniques, Exogenous supplementation, Embryo culture, TUNEL assay, Oocyte quality, Sperm quality.

LISTA DE FIGURAS:

- Tabla 1: Recomendaciones para mejorar la fertilidad humana
- Tabla 2: Clasificación de los embriones según los criterios de ASEBIR
- Figura 1: Reacción en cascada de la interacción de la melatonina con los radicales libres y sus principales metabolitos.
- Figura 2: (A) Fuentes de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante técnicas de reproducción asistida (TRA). (B) Aplicaciones y beneficios de la melatonina en técnicas de reproducción asistida (TRA).
- Figura 3: Visualización de espermatozoides mediante el ensayo TUNEL. Este tipo de ensayos permite la visualización de la fragmentación del ADN. Se observa que la administración de melatonina exógena favorece a la reducción sustancial del daño en el ADN espermático, ya que reduce el ensayo TUNEL +.

ABREVIATURAS:

- FSH: Hormona folículo estimulante
- LH: Hormona luteinizante
- INE: Instituto Nacional de Estadística
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
- VitC: Vitamina C
- Vit E: Vitamina E
- c3OHM: 3-hidroximelatonina cíclica
- AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
- AMK: N1-acetil-5-metoxiquinuramina
- MT1: Receptor de membrana de melatonina 1
- MT2: Receptor de membrana de melatonina 2
- DNMT3A: ADN metiltransferasa 3^a
- OCLN: Ocludina
- CDH1: Cadherina
- AQP3: Acuaporina 3
- SIRT 1 y SIRT 3: Sirtuinas

1. INTRODUCCIÓN

La esterilidad se define como la incapacidad de una pareja para concebir tras un año de relaciones sexuales regulares sin el uso de métodos anticonceptivos. Por otro lado, la infertilidad hace alusión a la incapacidad de concebir o llevar un embarazo a término y puede deberse a una amplia variedad de factores, como anomalías en los órganos reproductores, problemas hormonales u otros factores vinculados al estilo de vida. El análisis de la infertilidad, como un problema de salud, puede ser abarcado desde distintas perspectivas, teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos se implican a dos personas y que, independientemente de quien sea el individuo que presente la disfunción orgánica (uno o ambos), la situación de infertilidad se extiende a términos de la pareja, dando lugar a parejas infértiles. Dicha situación afecta en la cotidianidad y en la relación de pareja (Ramírez Moran et al., 2019).

Se debe tener en cuenta que existen distintos tipos de infertilidad que pueden ser clasificados en base a su origen o causa:

- Infertilidad femenina: incapacidad para lograr embarazo. Puede ser provocado por problemas ovulatorios, obstrucciones tubáricas, endometriosis, anomalías uterinas, entre otros.
- Infertilidad masculina: incapacidad de los espermatozoides para fecundar el óvulo. Puede ser causado por anomalías en la producción o movilidad de los espermatozoides, obstrucciones en los conductos deferentes, lesiones testiculares, entre otros.
- Infertilidad mixta: cuando tanto el hombre como la mujer presentan algún tipo de problema reproductivo que imposibilita la concepción.
- Infertilidad primaria: incapacidad de una pareja para concebir un hijo después de haber intentado, durante al menos un año, sin empleo de métodos anticonceptivos. Se trata de parejas que nunca han logrado embarazo. Puede ser causada por diversos factores, como en hombres como en mujeres, y puede requerir distintos tratamientos dependiendo de la causa subyacente al proceso.
- Infertilidad secundaria: se refiere a la incapacidad que presenta una pareja para concebir, pero a diferencia de la infertilidad primaria, ya presentan hijos previos. Puede ser provocada por diferentes factores, como problemas

ovulatorios, problemas en los órganos reproductores, enfermedades de transmisión sexual, entre otros.

- Infertilidad idiopática: en algunos casos, la causa de infertilidad o puede ser determinada mediante los estudios médicos, denominándose así idiopática (Ramírez Moran et al., 2019).

La prevalencia en la población varía según numerosos factores, como la región geográfica, el sexo, la edad y la historia reproductiva de la persona. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor del 15% de las parejas de todo el mundo presentan problemas de infertilidad. También, estima que aproximadamente el 10% de las mujeres en edad reproductiva presentan problemas de infertilidad y que la infertilidad masculina es responsable del 30-50% de los casos de infertilidad de las parejas (Rodríguez P.D., 2022). Recientemente, España ha sufrido un descenso continuo en la Tasa Global de Fecundidad y en la Tasa Bruta de Natalidad, conocidas como el total de nacimientos en un determinado ámbito y en un año concreto por cada 1000 mujeres en edad fértil y como el total de nacimientos en un determinado ámbito y año por cada 1000 habitantes (Espino et al., 2022). La disminución de estas tasas se atribuye principalmente a un proceso de modernización que ha llevado a mejoras en la calidad de vida y ha cambiado las preferencias de la población, lo que ha llevado a una población cada vez más envejecida. Esto se evidencia en la encuesta de fecundidad realizada por el Instituto nacional de Estadística (INE) en 2018, la cual reveló que el 42% de las mujeres de entre 18 y 55 años residentes en España han postergado el momento de tener su primer hijo más allá de lo que consideraban ideal (Espino et al., 2022).

La nutrición desempeña un papel importante en la fertilidad, tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, la nutrición afecta a la producción de hormonas sexuales, la ovulación, foliculogénesis y el ambiente uterino requerido para un embarazo correcto. En los hombres, también es importante debido a que puede afectar a los espermatozoides y por lo tanto a la calidad seminal. Se ha comprobado que una dieta baja en ácido fólico puede aumentar el riesgo de defectos en el tubo neural del feto, mientras que una dieta elevada en grasas saturadas y baja en grasas saludables puede afectar la ovulación y la calidad de los óvulos. También, se ha comprobado que una dieta escasa en nutrientes como el Zinc, Selenio, Vitamina C (VitC) y Vitamina E (VitE) pueden afectar negativamente a la calidad espermática (Espino et al., 2022).

Gracias a los avances y a la conjunción de numerosas áreas biomédicas, se han obtenido una gran cantidad de suplementos alimenticios que podrían beneficiar distintos aspectos de la salud, por lo que también podría beneficiarse la salud reproductiva. Los suplementos alimenticios están destinados a solventar carencias originadas por nuestra dieta o, en su defecto, aumentar la cantidad de nutrientes que se consumen (Espino et al.,2022).

En los últimos tiempos, se ha visto que la Melatonina también puede afectar la fertilidad en hombres y mujeres. En mujeres, puede afectar a la maduración del óvulo y a la ovulación mientras que en hombres también se ha visto que puede tener un efecto positivo en su calidad seminal. aunque cabe destacar que dicha relación requiere de más investigación para comprender correctamente la relación entre la suplementación en la dieta y su repercusión en la fertilidad humana (Espino et al., 2022).

Existen numerosos factores que pueden estar relacionados con la Infertilidad, incluyendo la edad avanzada de los progenitores, enfermedades como la obesidad, el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), hipotiroidismo e incluso, la exposición a contaminantes ambientales (factor que prevalece tras la transición ecológica actual que vivimos). No obstante, también se ha demostrado que el estilo de vida puede afectar negativamente a la fertilidad, incluyendo el seguimiento de dietas desequilibradas, sedentarismo, estrés, consumo de tabaco, alcohol y otros estupefacientes, los síndromes del sueño... entre otras muchas más (González-Rodríguez et al.,2018).

La melatonina es una hormona producida en la glándula pineal, ubicada sobre el techo del tercer ventrículo cerebral. Numerosos estudios en el ámbito de la fisiología y anatomía constatan que la síntesis de melatonina, en mamíferos, estaba controlada por la luz ambiental cuyo objetivo final eran las neuronas ubicadas en el ganglio cervical superior. En 1965 se consolidó la glándula pineal como órgano neuroendocrino en mamíferos y se demostró que modificaciones en la duración de las horas de oscuridad o incluso fotoperíodos cortos, inducían modificaciones en las gónadas de roedores (Guerrero et al.,2007).

Gracias al aporte de Axelrod y Wurtman, describieron la glándula como un órgano capaz de convertir un estímulo neural, cuyo origen es la luz ambiental que impacta en la retina, en melatonina (Guerrero et al., 2007). En los años 70 del siglo pasado, se descubrieron los primeros anticuerpos altamente específicos para la melatonina, encontrándose dicha hormona en diversos órganos, tejidos y células. Este evento

sugirió que puede haber fuentes de producción de melatonina extrapineales, como por ejemplo la retina, tejidos gastrointestinales y el sistema inmunológico. La síntesis de melatonina se produce a partir del aminoácido triptófano, que es convertido en serotonina mediante una serie de reacciones enzimáticas. Posteriormente, la serotonina es convertida en melatonina gracias a la acción de la enzima N-acetiltransferasa y la hidroxiindol-O-metiltransferasa. La melatonina protege los lípidos, las proteínas y el ADN del daño oxidativo. Actúa como potente eliminador de radicales libres mediante lo conocido como, la cascada antioxidante de la melatonina. Es decir, la melatonina y sus metabolitos secundarios y terciarios, destacan ante otros antioxidantes clásicos, en que después de su interacción con las especies reactivas del oxígeno (ROS), conservan su capacidad de eliminar los radicales libres. Una molécula de melatonina tiene la capacidad de eliminar hasta 10 ROS. De esta manera, la melatonina puede ser hidroxilada por interacción con los radicales libres, lo que provoca un reordenamiento intramolecular inmediato para luego dar lugar a la formación de un tercer anillo, dando lugar así a un metabolito denominado 3-hidroximelatonina cíclica (c3OHM) (Figura 1) (Cosme et al., 2022). Asimismo, el c3OHM también es un potente eliminador de radicales libres que se puede convertir mediante dos OH a otro metabolito clave de la melatonina, N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). A su vez, el AMFK puede generarse por conversión directa de la melatonina o finalmente, puede desformilarse fácilmente a N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), que también parece ser un eliminador de radicales libres de una reactividad mayor que la AFMK, ya que sufre fácilmente reacciones de transferencia de un solo electrón, generando así más metabolitos (Figura 1) (Cosme et al., 2022).

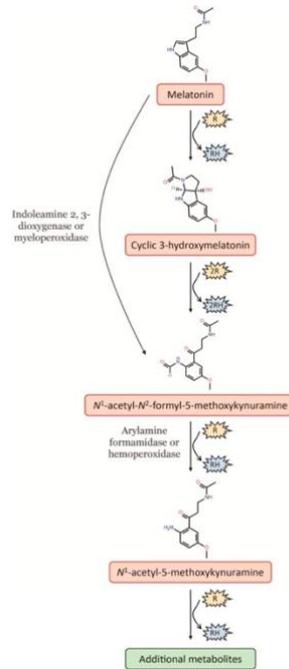


Figura 1. Reacción en cascada de la interacción de la melatonina con los radicales libres y sus principales metabolitos. R= radical libre. HR= agente reducido. Imagen cortesía de Cosme et al., 2022.

Esta hormona puede desempeñar un papel importante en la regulación de la fertilidad humana. La glándula pineal, está involucrada en la regulación de los ritmos circadianos y la sincronización del reloj biológico del cuerpo, incluyendo el sistema reproductivo.

2. OBJETIVOS

Esta revisión bibliográfica tiene por objetivos:

1. Remarcar la relación existente entre los suplementos alimenticios y la Fertilidad Humana.
2. Determinar, en base a la literatura disponible, la relación o el posible efecto de la Melatonina en la Fertilidad Humana.
3. Establecer las posibles aplicaciones de la melatonina en el ámbito de la Reproducción Humana Asistida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos sobre la fertilidad y las repercusiones del estilo de vida en la reproducción asistida.

La recopilación de artículos se realizó en noviembre de 2022, revisando aquellos artículos publicados los últimos 6 años, seleccionando aquellos que cumplieran los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Se incluyen:
 - Los artículos científicos publicados entre 2018 y 2022.
 - Estudios con texto completo disponible.
- Se excluyen:
 - Los artículos científicos fuera del intervalo de años establecido.
 - Los artículos en idiomas distintos al inglés y al español.
 - Los artículos que no relacionan los términos de interés.

Dicha selección se inició por búsqueda electrónica en diferentes bases de datos: PubMed, Google Académico, ScienceDirect y Scopus.

Para la búsqueda en PubMed, a través de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) se realizó una lista con los términos MeSH (Medical Subject Headings) a emplear y que se relacionan con el tema en cuestión: Melatonin, ROS (Reactive Oxygen Species), Sperm damage, Assisted Reproduction Techniques, Exogenous supplementation, Embryo culture, TUNEL Assay, Oocyte quality. Se combinaron todos los términos mencionados con los operadores booleanos AND y OR y se obtuvo la siguiente cadena de búsqueda.

Con ella se obtuvo un gran número de artículos (43593 resultados en PubMed) que posteriormente se procesó a través de los filtros disponibles en cada base de datos, que fueron el idioma, documentos que fueran *'full text'* en inglés y español, de libre acceso y redactados los últimos 15 años.

Tras la lectura de títulos y resúmenes, se seleccionaron aquellos artículos que mejor se adaptaban a los criterios de inclusión y exclusión. Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos de cada base de datos para desechar aquellos artículos que se hubieran seleccionado por duplicado.



Finalmente, se obtuvieron una serie de conclusiones que permitieron la redacción de dicho trabajo final de máster.

4. RESULTADOS

4.1 La Fertilidad y la relación existente el estilo de vida

Estudios han demostrado que tanto el tipo como la cantidad de carbohidratos pueden afectar la fertilidad de hombres y mujeres (González-Rodríguez et al., 2018). Una dieta rica en alimentos con baja carga glucémica puede mejorar la sensibilidad a la insulina en mujeres y la calidad seminal en hombres. En cuanto a las proteínas, se ha demostrado que la sustitución de proteínas de origen animal por vegetal en la dieta puede favorecer la ovulación. Además, el consumo elevado de grasas saturadas y trans puede tener repercusiones negativas en la fertilidad, mientras que una dieta rica en grasas monoinsaturadas y Omega-3 puede tener efectos beneficiosos. También, se ha visto que la suplementación con Omega-3 puede reducir la concentración de testosterona y mejorar la resistencia insulínica en mujeres con SOP (González-Rodríguez et al., 2018). Al igual que una correcta ingesta de vitaminas es esencial para la fertilidad. Entre ellas, cabe destacar el papel del ácido fólico, que interviene en la síntesis de ADN y ARN y, por tanto, en reproducción. Si su consumo es escaso, se ha demostrado que puede presentar riesgos de problemas como alteraciones en la ovulación, retraso del crecimiento intrauterino e incluso, nacimientos prematuros. En hombres también ayuda a mejorar tanto la calidad como la cantidad de espermatozoides. También, la vitamina B12 que es necesaria para el correcto desarrollo de la placenta. No se debe olvidar la relación de las vitaminas C y E en su función antioxidantes. Estas vitaminas ayudan a combatir los efectos negativos del estrés oxidativo en los óvulos y espermatozoides y son necesarias para optimizar el desarrollo y la funcionalidad de la placenta y, la vitamina E favorece el proceso de implantación del óvulo fecundado (González-Rodríguez et al., 2018). En cuanto a los minerales, el papel crucial del calcio en la espermatogénesis y la motilidad de los espermatozoides o el zinc, un mineral esencial para la fertilidad debido al papel de protección del óvulo y el espermatozoide contra el daño oxidativo, así como en la embriogénesis, la función placentaria y el desarrollo del sistema nervioso fetal. En hombres, el zinc es especialmente importante en el desarrollo testicular normal, síntesis de testosterona y calidad seminal. Por lo que, una suplementación con zinc podría ser beneficiosa en el tratamiento de la infertilidad masculina al tener una

relación establecida con la misma, gracias a su potencial para mejorar la calidad y cantidad de los espermatozoides (Tabla 1) (González-Rodríguez et al., 2018).

Es esencial destacar que, tras lo citado anteriormente, queda constancia el impacto del estilo de vida en la fertilidad humana. Por lo que, gracias a los avances biomédicos, hoy en día existen numerosos productos comerciales encargados a la suplementación alimenticia, ya sea por carencias nutricionales en la dieta o, en su defecto, por carencias a nivel de absorción de los elementos esenciales. Un estudio interesante fue el realizado por Moslemi y Tavanbakhsh que investigaron a 690 hombres diagnosticados con infertilidad que recibieron suplementos de Vitamina E y selenio, y se observó una mejora en la motilidad, morfología o ambas de los espermatozoides en el 52,68% de los casos. Además, un 10% más de los hombres en el grupo de tratamiento lograron conseguir embarazo con sus respectivas parejas, en comparación con el grupo control (Moslemi & Tavanbakhshs., 2011).

Mantener un peso corporal adecuado mediante una correcta alimentación y una actividad física moderada.
Seguir una dieta con un contenido elevado de hidratos de carbono complejos y fibra, grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, proteínas de origen vegetal, así como bajo en grasas saturadas y trans y proteínas de origen animal.
Prestar especial atención al aporte de ácido fólico, B ₁₂ , vitaminas A, D, C y E, calcio, hierro, zinc, selenio y yodo
Tomar un suplemento en el caso de que la dieta no aporte una cantidad suficiente
Moderar el consumo de bebidas con alcohol y cafeína Evitar fumar

Tabla 1. Recomendaciones para mejorar la Fertilidad Humana. Tabla cortesía de González-Rodríguez et al., 2018

Hay evidencias que sugieren que la calidad del sueño puede tener un impacto en la fertilidad humana, tanto en hombres como en mujeres. En el caso de las mujeres, se ha encontrado que la falta de sueño o un sueño de mala calidad puede afectar negativamente al ciclo menstrual y a la ovulación, repercutiendo en las posibilidades de concepción. Por otro lado, en los hombres, se ha demostrado que carencias en el sueño pueden disminuir la calidad del semen y reducir la cantidad de espermatozoides. Vinculado a los trastornos del sueño, encontramos el estrés y la ansiedad, que se relacionan también con la fertilidad humana (González-Rodríguez et al., 2018).

4.2 Efectos de la melatonina sobre la fertilidad humana

En el presente trabajo nos vamos a focalizar concretamente en la melatonina, debido a que es una suplementación que ha creado controversia entre los autores. Hay evidencias que constatan que la melatonina tiene efectos directos e indirectos sobre la función reproductiva en humanos. Tordjman S. concluyó que la melatonina puede influir en la producción de hormonas reproductivas como la hormona luteinizante (LH), la foliculo estimulante (FSH), de la regulación a la baja de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (ejerciendo un ciclo de retroalimentación negativa sobre las dos anteriores) y también la prolactina. También, se ha demostrado que puede afectar a la calidad y cantidad del semen y, además, se ha visto que puede mejorar la fertilidad en mujeres con dificultades para concebir debido a trastornos ovulatorios (Tordjman et al., 2017). Por lo que, tras numerosos estudios se ha concluido que dicha hormona podría tener aspectos beneficiosos aplicables en el campo de la reproducción humana asistida ya que como se comentó anteriormente, existe la posibilidad de usar la melatonina como suplemento alimenticio. El interés por la reproducción humana ha ido creciendo progresivamente a lo largo de los años con objetivo de generar nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas para mejorar la fertilidad humana. Sin embargo, es un tema desafiante debido a la heterogeneidad de la población, los límites éticos al experimentar con humanos, los altos costos de investigación y las tecnologías apropiadas (Cosme et al., 2022).

4.3 Funciones de la melatonina en la reproducción humana

Papel de la melatonina en la fisiología del esperma

La espermatogénesis es un evento dependiente de testosterona que impulsa la diferenciación y la maduración de los gametos masculinos en los testículos. Sin embargo, los espermatozoides maduros se mantienen en estado de reposo en las gónadas y, por lo tanto, deben activarse para lograr su cometido. El fenómeno de activación se denomina capacitación, que conlleva una serie de pasos que implica modificaciones en la forma y función de los espermatozoides que son inducidos por las estructuras extracelulares del ovocito (Cosme et al., 2022). Dichos cambios incluyen el inicio de la motilidad, la quimiotaxis (nadar hacia el ovocito en respuesta a gradientes de concentración química), la unión al ovocito, la reacción acrosómica, la penetración y fusión de las membranas plasmáticas. La melatonina puede atravesar la barrera hematotesticular y entrar en las células testiculares. Además, la indolamina

actúa a través de los receptores de melatonina de membrana 1 (MT1) y 2 (MT2), que son receptores acoplados a proteína G que controlan la síntesis de testosterona y, por lo tanto, la espermatogénesis, mediante la regulación de las cascadas de transducción del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). La función normal de los espermatozoides depende de los niveles bajos de generación de ROS para promover las vías de transducción de señales asociadas con la capacitación, la unión a la zona pelúcida y la condensación de la cromatina espermática. Por lo contrario, cuando se generan en exceso, las ROS pueden inducir la peroxidación lipídica que, a su vez, altera las características de la membrana que son críticas para el mantenimiento de la función espermática, incluida la capacidad fertilizante de óvulos. Aprovechando sus excelentes propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales libres, la melatonina reduce el daño oxidativo en las mitocondrias, la fragmentación del ADN, la peroxidación lipídica de la membrana plasmática y los marcadores apoptóticos en los espermatozoides. Sin embargo, esta protección, no solo se debe a sus propiedades de eliminación de radicales libres, sino también a su acción sobre el receptor de membrana MT1. Además, la melatonina regula la capacitación de los espermatozoides a través de la modulación de la secreción de bicarbonato y la movilización del calcio intracelular, que depende del receptor MT2 (Cosme et al., 2022).

Influencia de la melatonina en el desarrollo del folículo ovárico y la ovulación

El efecto de la melatonina en la fisiología reproductiva femenina se centra en sus acciones directas en el ovario. La expresión de los receptores MT1 y MT2 en células de la granulosa, células lúteas, folículos antrales y cuerpo lúteo indica que tiene funciones esenciales en la regulación de procesos reproductivos. De hecho, la melatonina modula la esteridogénesis de las células de la granulosa y la función folicular en humanos (Cosme et al., 2022).

La foliculogénesis depende fundamentalmente de los niveles de la FSH y la formación de los folículos se basa también en niveles bajos de ROS, ya que actúan como segundos mensajeros modulando la expresión de genes implicados en la maduración ovocitaria. Al contrario, el exceso de ROS puede producir estrés oxidativo que puede dañar la granulosa y las células ovocitaria. Es por ello por lo que, la melatonina juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio antioxidante del ovocito, protegiendo así al gameto femenino del daño oxidativo y

regulando una foliculogénesis óptima. La melatonina se encuentra en el líquido folicular en altas concentraciones (tres veces más altas que en los niveles sanguíneos) donde se estimula la proliferación de células de la granulosa a través de la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), por lo que, aumenta el crecimiento folicular. Existe un ciclo de retroalimentación positiva que relaciona el crecimiento del folículo con la concentración de melatonina. Esta alta concentración durante la fase preovulatoria está involucrada en la producción de progesterona, lo que conduce a la luteinización y, por lo tanto, a una ovulación exitosa. (Cosme et al., 2022)

Relación entre Melatonina y Fase lútea

En comparación con la fase folicular, los niveles de melatonina se encuentran más elevados durante la fase lútea. Esto sugiere que la indolamina tiene una acción directa en la modulación de dicha fase. Además, se ha encontrado que los sitios de unión a la melatonina, así como los receptores MT1 y MT2, se expresan en las células luteínicas de granulosa humana, lo que está en línea con el hecho de que la melatonina estimula la liberación de progesterona por dichas células (Cosme et al., 2022)

También tiene un efecto sobre los reguladores luteotróficos y luteolíticos al inducir un aumento de prostaglandina E luteotrófica y una reducción del modulador luteolítico. En mujeres que sufren un defecto de la fase lútea, se ha observado que la melatonina proporciona protección a las células luteínicas de la granulosa y aumenta la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo a través de una reducción del estrés oxidativo (Cosme et al., 2022).

Efectos de la melatonina en la placenta

La placenta sintetiza melatonina de novo y expresa los receptores de melatonina MT1 y MT2, a través de los cuales la melatonina promueve la supervivencia de las células placentarias. Además, ejerce efectos anti apoptóticos en los citotrofoblastos, evitando su muerte celular extensiva, y actúa como antioxidante en los sincitiotrofoblastos. Además, la melatonina ayuda a mantener los procesos homeostáticos en la placenta, lo que reduce la probabilidad de patologías como la preeclampsia, que es un trastorno materno-fetal sistémico caracterizado por hipertensión tras las 20 semanas de gestación y además, presenta asociación con disfunción orgánica materna y/o restricción del crecimiento fetal. En dicha patología los niveles de melatonina, así como su síntesis y abundancia de receptores disminuyen.

Por este motivo, el tratamiento con melatonina exógena podría ser útil en este trastorno (Cosme et al., 2022).

4.4 Melatonina y Técnicas de Reproducción Asistida (TRA)

En los últimos años, muchos estudios han investigado el potencial de la melatonina en TRA para mejorar las tasas de éxito. Si bien es cierto que las ROS poseen un papel fisiológico en la estructura y función de los gametos, una producción exacerbada podría ser perjudicial para su fisiología. En este sentido, durante los procedimientos de TRA en comparación con las condiciones fisiológicas in vivo, existe un mayor riesgo de estrés oxidativo. La razón es la falta de mecanismos de defensa fisiológicos y la presencia de fuentes intrínsecas de ROS, como ovocitos, células del cúmulo, leucocitos y espermatozoides (Cosme et al., 2022).

Así como, existen también factores extrínsecos responsables de la generación de ROS como los medios de cultivo, el pH, la concentración de oxígeno, la centrifugación, criopreservación y la temperatura (Cosme et al., 2022). Los medios de cultivo usados durante TRA tienen un potencial impacto en la calidad embrionaria y por consiguiente, en el éxito del tratamiento. Algunos medios de cultivo contienen iones metálicos como hierro y cobre. Estos iones conducen a la generación de ROS, lo que implica que una suplementación de los medios de cultivo con antioxidantes podría ser beneficioso para evitar que se formen dichas especies reactivas. El mantenimiento del pH también es un factor importante, ya que va a influir en la motilidad espermática y su consiguiente unión al ovocito, maduración ovocitaria y desarrollo embrionario. Su mantenimiento es vinculado con la concentración de los niveles de CO₂ y la temperatura, que debe mantenerse constante en 5% y 37°C (Cosme et al., 2022). Además, elevadas concentraciones de oxígeno atmosférico pueden influir en la calidad embrionaria debido a la inducción del estrés oxidativo. Esta es la razón detrás del uso de bajas concentraciones de oxígeno atmosférico (5%) en algunos laboratorios de TRA para imitar las condiciones in vivo, mientras que otros pueden usar una concentración de oxígeno del 20%. Se ha demostrado que una concentración de oxígeno atmosférico del 5% aumenta la calidad embrionaria (Cosme et al., 2022).

En relación con la preparación de la muestra seminal, la centrifugación es un paso común para separar los espermatozoides del plasma y otros componentes, como células muertas, espermatozoides inmaduros y leucocitos. Sin embargo, el hacer girar a los gametos durante el proceso de centrífuga conduce un aumento de los niveles de

ROS. También, los tiempos de centrifugación producen un aumento de la temperatura de la muestra lo que puede afectar a la motilidad espermática. Finalmente, el proceso de criopreservación que consiste en el uso de técnicas de congelación con el fin de preservar las células reproductivas, a bajas temperaturas (-196°C) en nitrógeno líquido. Implica el uso de crioprotectores, previos a la congelación, lo que ayuda a evitar la formación de cristales de hielo que pueden dañar las estructuras celulares durante el proceso de descongelación. No obstante, los ciclos de congelación y descongelación aumentan drásticamente la producción de ROS y reducen las defensas antioxidantes de los espermatozoides, volviéndolos más sensibles al estrés oxidativo, pudiendo derivar en procesos de peroxidación lipídica de la membrana espermática (Cosme et al., 2022).

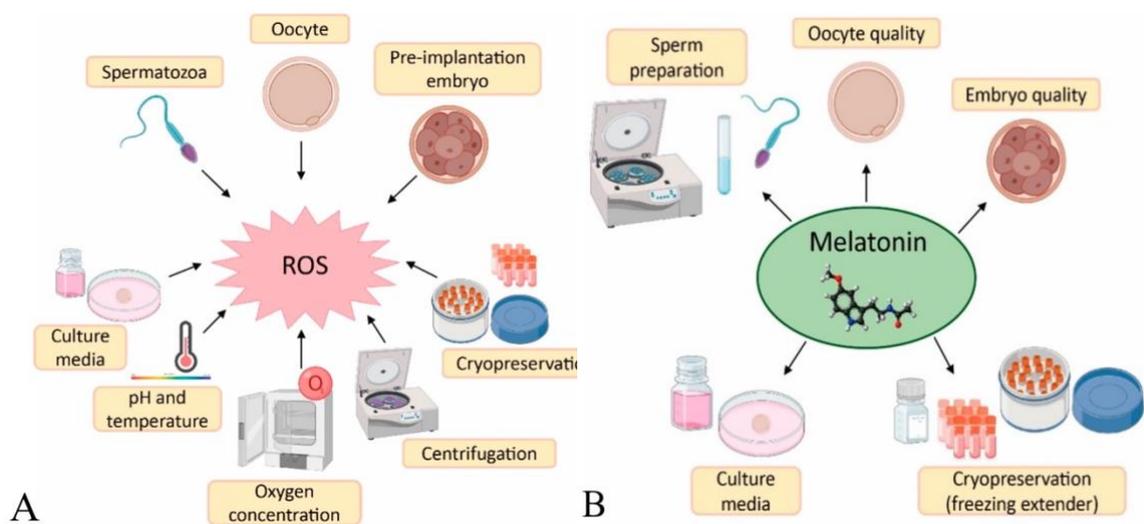


Figura 2: (A) Fuentes de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante técnicas de reproducción asistida (TRA). (B) Aplicaciones y beneficios de la melatonina en técnicas de reproducción asistida (TRA). Imágenes cortesía de Cosme et al., 2022.

4.5 Efecto de la melatonina sobre la calidad ovocitaria y embrionaria

Una gran cantidad de estudios *in vitro* han realizado una suplementación de los medios de cultivo con melatonina para mejorar la maduración ovocitaria, su fertilización y el desarrollo embrionario. Este enfoque, asume que el estrés oxidativo es un factor acelerante de la apoptosis en los ovocitos y, por lo tanto, influye en su capacidad de fertilización. La adición de melatonina en medios de cultivo en ovocitos también ha sido probada con un tiempo de incubación *in vitro* prolongado de 52 horas, obteniéndose, resultados beneficiosos en cuanto a la calidad y desarrollo de ovocitos

al disminuir la generación de ROS, apoptosis y daño en su material genético. También se realizaron experimentos a dosis más bajas de melatonina (1nM y 1µM) y se obtuvieron los mismos resultados beneficiosos, aumentándose también la expresión de genes relacionados con el desarrollo embrionario como la ADN metiltransferasa 3A (DNMT3A), la ocludina (OCLN) y la cadherina (CDH1) y disminuyó la expresión de la acuaporina 3 (AQP3), conduciendo a una mayor resistencia apoptótica (Cosme et al., 2022).

El envejecimiento ovárico es caracterizado por una reducción gradual del número de folículos primordiales y una disminución en su calidad, provocando una reducción progresiva en la fertilidad. Una reciente investigación con ratones hembra de 10 semanas ha demostrado que la administración de agua que contiene 100 µg/mL de melatonina retrasa el envejecimiento ovárico. Esta suplementación mantenida hasta que los ratones tenían 43 semanas de edad, obteniéndose como resultado una mayor cantidad de folículos primordiales, primarios y antrales, así como mejores tasas de fertilización y blastocistos en los ratones tratados en comparación con los ratones de control de camada (Cosme et al., 2022). Además, la melatonina mejoró significativamente la longitud de los telómeros en ratones viejos y mejoró la expresión de genes relacionados con el envejecimiento, como las sirtuinas (SIRT1, SIRT3) y la cadena ligera (LC3) de la proteína asociada a los microtúbulos relacionada con la autofagia (LC3). También, se ha demostrado que la melatonina puede regular al alza 40 genes relacionados con los ribosomas que comúnmente se regulan a la baja durante el envejecimiento, estos resultados demuestran la capacidad de la melatonina para retrasar el envejecimiento ovárico.

En cuanto a los estudios humanos in vivo, varios ensayos han investigado a la eficacia de la administración de melatonina a pacientes que se sometieron a un procedimiento de fertilización in vitro y transferencia de embrionaria con la idea de aumentar las concentraciones de melatonina folicular y, por lo tanto, mejorar la calidad ovocitaria (Cosme et al., 2022). En este sentido, la suplementación oral con 3 mg/día de melatonina en mujeres sometidas a transferencia embrionaria, aumentó el porcentaje de ovocitos maduros y el número de embriones de máxima calidad, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en las tasas de fecundación y de embarazo clínico respecto a un grupo control (Cosme et al., 2022). Otros estudios se han realizado en mujeres con reserva ovárica disminuida que recibieron 3 mg/día de

melatonina desde el quinto día en su ciclo menstrual hasta el día de la punción folicular. El número de ovocitos maduros y embriones de máxima calidad fue mayor en las mujeres tratadas con melatonina que en el grupo control; no obstante, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de embarazo clínico y aborto espontáneo entre ambos grupos.

Al igual que en las mujeres, la administración de melatonina se estudió en hombres infértiles para investigar sobre la calidad del espermatozoides y la calidad de embriones extraídos de sus parejas cuando se sometieron a un ciclo de FIV. Los resultados demuestran que la suplementación durante 45 días de 6 mg de melatonina al día, promovió un aumento notable de la actividad antioxidante total seminal y una reducción del daño oxidativo del ADN espermático. Además, los embriones obtenidos de mujeres cuya pareja masculina estaba suplementándose con melatonina experimentaron un aumento significativo en el porcentaje de embriones de mayor calidad y una disminución de embriones no recomendados para transferencia, siguiendo los criterios de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) (Cosme et al., 2022).

4.6 Aplicación de la melatonina en la preparación de muestras seminales para TRA

La preparación de las muestras seminales destinadas a TRA tiene como objetivo la selección y el enriquecimiento de espermatozoides móviles y funcionalmente competentes presentes en el eyaculado. Encontramos diferentes maneras de realizar el procesado de muestras seminales y su posterior capacitación espermática (proceso necesario para que los espermatozoides adquieran capacidad fertilizante) en el laboratorio de Andrología, como la técnica swim-up o la capacitación mediante gradientes de densidad. Diferentes estudios realizados en diversos modelos animales han demostrado que la suplementación con melatonina (a diferentes dosis), durante la preparación de las muestras seminales podría ser beneficioso (Cosme et al., 2022). Se trataron muestras de espermatozoides bovinos descongelados con melatonina 1mM, demostrando que la indolamina disminuyó la expresión de genes proapoptóticos como la caspasa-3 y provocó un aumento significativo de la expresión de genes antiapoptóticos, como el Bcl-2. Asimismo, en el mismo estudio, una concentración de 10µL de melatonina mejoró también la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, junto con una reducción de los niveles intracelulares de ROS. También, se

ha estudiado el papel de la melatonina en las técnicas de capacitación espermática. En este sentido, se han demostrado que concentraciones bajas de melatonina (100nM) modulan la capacitación de los espermatozoides al aumentar la subpoblación de móviles en muestras de carneros, lo que conduce a una mejoría en la capacidad fertilizante de los mismos (Cosme et al.,2022).

En relación con los estudios en humanos, se ha observado que la preincubación con melatonina 6mM durante la capacitación espermática, mejoró la motilidad progresiva y la integridad de la membrana de las muestras en pacientes astenozoospermicos (Cosme et al., 2022). Además, se ha informado que el uso de dosis más bajas, es decir, melatonina 1mM produjo buenos resultados ya que provocó un incremento significativo de espermatozoides aptos para la fertilización de ovocitos. Con la aplicación de dosis más bajas (melatonina 1mM) también se observaron buenos resultados, consiguiéndose un incremento significativo en la capacidad fertilizante de los mismos y una mejora en la calidad de muestras humanas oligozoospermicas y, evitando la fragmentación del ADN en normozoospermicos.

4.7 Melatonina como agente protector en procesos de criopreservación de gametos en el laboratorio

La criopreservación de espermatozoides es el método más empleado en pacientes con cáncer, debido a que se someten a tratamientos agresivos que pueden afectar a su calidad y, en última instancia, conducir a la azoospermia. El principal inconveniente de la criopreservación es que la calidad espermática puede verse afectada negativamente debido a los ciclos de congelación y descongelación, pudiendo conducir a estrés oxidativo, aumento de la peroxidación lipídica, consecuencias negativas sobre la membrana plasmática. Provocando una alteración en la capacidad fertilizante de los gametos. Debido a ello, la comunidad científica ha centrado su atención en estudiar los posibles efectos protectores de la melatonina sobre los espermatozoides durante la criopreservación dada su elevado potencial antioxidante. Esta protección está asociada con una reducción de los eventos de peroxidación lipídica en los espermatozoides, lo que está relacionado con el aumento provocado por la melatonina tanto en la capacidad antioxidante total como en la actividad de enzimas vinculadas (Cosme et al., 2022).

Varios estudios han demostrado el papel de la melatonina como crioprotector eficaz. Por ejemplo, se ha constatado que la suplementación con melatonina 2mM o

3mM en el diluyente de semen contrarrestó los efectos adversos de los ciclos de congelación y descongelación en el espermatozoide de toro, ya que disminuyó la peroxidación lipídica y aumentó la capacidad antioxidante total y enzimática. Del mismo modo, el empleo de melatonina a una concentración de 100 μ M o 1mM mejoró tanto la motilidad como los parámetros de viabilidad en las muestras de semen de búfalo criopreservados, lo que reflejó positivamente su capacidad de fertilización in vitro y en el porcentaje de embriones obtenidos (Cosme et al., 2022). Por lo que estos estudios tenían la finalidad de demostrar que la melatonina mejoraba la calidad espermática, lo que condujo a mayores tasas de división total y, por lo tanto, a mayores tasas de fecundación y natalidad. Además, la indolamina logró disminuir el estrés oxidativo mejorando la activación de las enzimas antioxidantes y, por lo tanto, reduciendo la concentración de ROS durante el proceso de criopreservación.

Por otro lado, estudios realizados con muestras seminales humanas han demostrado que el uso de 100 μ L de melatonina agregada como crioprotector, pudo aumentar significativamente la viabilidad de los espermatozoides y la integridad de su membrana, a lo que al mismo tiempo disminuyó los niveles intracelulares de ROS y la peroxidación lipídica. Es considerable destacar que esta suplementación no tuvo ningún efecto perjudicial sobre el espermatozoide humano durante la criopreservación. Asimismo, otros autores también han reportado que diferentes concentraciones de melatonina (10 μ M y 3mM) dieron como resultado una mayor viabilidad y motilidad de los espermatozoides criopreservados y niveles más bajos de ROS intracelulares (Cosme et al., 2022).

En cuanto a la criopreservación de ovocitos maduros, esta técnica puede usarse para mujeres que se enfrentan a una disminución anticipada de la fertilidad por diversas razones, incluidas terapias contra el cáncer gonadotóxico, cirugías con riesgo de daño al ovario, cirugías con riesgo de daño al ovario u ovariectomías, y mujeres con mayor riesgo de insuficiencia ovárica primaria. Con la principal idea de minimizar el estrés celular osmótico y/u oxidativo durante este procedimiento, en los últimos años se ha implementado el uso de antioxidantes como la melatonina. En este sentido, se ha reportado que la carga de complejos cumulo-ovocito porcinos con melatonina y glicina (1 μ M y 6 mM, respectivamente) durante la vitrificación (que se trata de un método ultrarrápido de criopreservación) mejoró la competencia de desarrollo de los ovocitos porcinos vitrificados, al tiempo que, disminuyó los niveles de ROS y la aparición de

apoptosis en los ovocitos maduros. Es de vital importancia destacar que la indolamina también puede mejorar el efecto de la criopreservación en ovocitos humanos, como se ha demostrado recientemente. En conjunto, estos estudios indican que la melatonina puede ser utilizada como un crioprotector eficaz, lo que adquiriría especial relevancia clínica en muestras criopreservadas de pacientes oncológicos que opten por este método para preservar su fertilidad (Cosme et al., 2022).

4.8 Impacto de la melatonina en la fisiopatología de órganos reproductivos

Endometriosis

La endometriosis se asocia con una producción exacerbada de ROS debido a un desequilibrio de oxidantes y antioxidantes y, por lo tanto, la búsqueda de nuevos tratamientos se centra en la terapia antioxidante con el uso de moléculas secuestrantes como la melatonina (Cosme et al., 2022).

Los estudios *in vitro* con células epiteliales endometriósicas derivadas de pacientes con endometriosis han demostrado que 1mM de melatonina fue capaz de bloquear la migración, invasión y transición epitelial-mesenquimatoso (EMT) inducidas por 17 β -estradiol a través de la regulación positiva de la proteína adaptadora endocítica Numb. Además, una gran cantidad de estudios en animales han permitido estudiar el potencial de la melatonina en esta patología (Cosme et al., 2022).

Síndrome de ovario poliquístico (SOP)

El SOP es un trastorno endocrino común que provoca hiperandrogenismo e infertilidad debido a una maduración folicular disfuncional y anovulación. Numerosos estudios en animales se han centrado en el uso de la melatonina para investigar sus supuestos efectos sobre la calidad de los ovocitos en el SOP. Se ha comprobado que la adición de 10 μ L de melatonina en los medios de cultivo de ovocitos obtenidos de un modelo de ratón hembra con SOP mejoró la calidad de los ovocitos debido a la menor presencia de radicales libres, lo que resultó en un aumento de las tasas de fertilización. Un estudio reciente que utilizó el mismo modelo animal y la concentración de melatonina mostró que la indolamina promovió un incremento tanto en los genes relacionados con la maduración de los ovocitos, como el factor de diferenciación del crecimiento-9 (Gdf9) y la proteína morfogenética ósea 5 (Bmp5), como en las enzimas antioxidantes, como como glutatión peroxidasa 1 (Gpx1) y

superóxido dismutasa 1 (Sod1), en comparación con el grupo no tratado. Además, se observó un efecto antiapoptótico de la melatonina mediado por una disminución de la expresión de BAX y un aumento de Bcl-2 antiapoptótico. Finalmente, este estudio demostró una correlación inversa entre los niveles de ROS y la concentración de indolamina en los medios de cultivo en los grupos tratados con melatonina (Cosme et al., 2022).

En cuanto a los estudios en humanos, se ha evaluado la suplementación con melatonina del medio de cultivo in vitro en pacientes con SOP que se someten a FIV-TE. Los resultados demuestran que la adición de 10µLa melatonina en medios de maduración in vitro mejoró la implantación de embriones y las tasas de embarazo con respecto al grupo de control sin suplementos. En relación con la utilización de la indolamina como tratamiento farmacológico oral en pacientes con SOP, los hallazgos de algunos ensayos son alentadores. Primero, la administración de 2 mg de melatonina/día durante seis meses a pacientes con SOP aumentó las irregularidades menstruales en el 95 % de las pacientes y disminuyó los niveles de andrógenos y hormona antimulleriana, cuyos niveles basales están por encima del rango normal en pacientes con SOP. Al mismo tiempo, los niveles de FSH, que se reducen en este síndrome, aumentaron significativamente en comparación con un grupo de control. Los efectos de la suplementación oral con melatonina también se investigaron en pacientes con síndrome de ovario poliquístico sometidos a inseminación intrauterina y en mujeres con SOP sometidas a un ciclo de FIV-ET. En estos ensayos, el efecto sinérgico de 3 mg de melatonina/día y 4000 mg de mioinositol/día elevó notablemente el número de ovocitos maduros y embriones grado I con respecto a un grupo control no tratado y un grupo tratado con mioinositol, aunque no se encontraron diferencias significativas en tasas de embarazo (Cosme et al., 2022).

Varicocele

El varicocele es una enfermedad clínica común en andrología que tiene efectos perjudiciales sobre la calidad espermática, su función y por consiguiente el logro de embarazo. Lo que es más importante, el estrés oxidativo que se asocia con la patogénesis de la infertilidad inducida por varicocele. En este contexto, el papel de la melatonina promueve la prevención del daño testicular y fue investigado por primera vez en un modelo animal con varicocele inducido experimentalmente. Dichos informes pusieron de manifiesto que, la administración de melatonina a una dosis de

10mg/kg/día, antagonizó la activación de la apoptosis de las células germinales provocadas por el varicocele que se atribuyó a la prevención del daño oxidativo de los lípidos. Aunque no hay estudios sobre el potencial terapéutico de la melatonina en pacientes con dicha patología, se han observado niveles bajos de melatonina en semen en hombres infértiles con varicocele (Cosme et al., 2022).

4.9 Efecto de la suplementación con melatonina exógena en el ADN espermático

Los humanos somos organismos aeróbicos y por ello, estamos continuamente expuestos a las ROS. La principal fuente de ROS intracelular se encuentra en la cadena de transporte de electrones en el interior de la membrana mitocondrial. Si bien es cierto que, durante mucho tiempo se ha conocido que las ROS pueden actuar como segundos mensajeros para la regulación de distintas funciones celulares. Además, es esencial su mantenimiento en valores fisiológicos para el desempeño de las funciones normales de los espermatozoides, incluidas la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica (Bejarano et al., 2014). Para que dichas ROS no se acumulen, las células aeróbicas se encuentran equipadas de una maquinaria con actividad antioxidante, cuyas funciones principales son la eliminación de ROS y el mantenimiento de los radicales libres en valores normales. Esto deriva en un cometido principal: evitar los efectos patológicos debidos al estrés oxidativo. Si esto no se controla, los compuestos oxidantes superan la capacidad oxidante de la célula y dicho fenómeno se vuelve evidente derivando en la sobreproducción de oxígeno y sus derivados oxidantes. No obstante, las ROS presentes en el líquido seminal pueden presentar diversos orígenes, tanto endógenos como exógenos.

Por lo que, los componentes celulares (espermatozoides maduros e inmaduros, leucocitos y células epiteliales urogenitales) del semen humano, son consideradas la principal fuente de ROS, principalmente los leucocitos y los espermatozoides en maduración. Numerosos estudios han indicado que la formación excesiva de ROS contribuye de una manera negativa a la estabilidad del ADN espermático, por lo que podría derivar en varios tipos de infertilidad. Además, se ha descrito que la apoptosis o muerte celular programada, también es estimulada por la presencia de ROS. Los espermatozoides se caracterizan por una notable actividad metabólica, cuyo origen se encuentra en el activo movimiento flagelar, que demanda un alto nivel de ATP intracelular durante la fase de motilidad. Los procedimientos llevados a cabo en los

laboratorios de reproducción asistida para la preparación de muestras seminales son potencialmente generadores de estrés oxidativo que causa daños en el ADN espermático. El plasma seminal se encarga de brindar protección antioxidante a las células germinales contra la producción excesiva de ROS. Al extraer el plasma seminal de las muestras en su preparación, los espermatozoides quedan vulnerables, por lo que, para evitar dicha amenaza, se han suplementado los medios de cultivo con antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico). No obstante, cabe destacar que la eliminación del plasma seminal no es el único origen de las ROS, ya que la propia centrifugación tiene una notable influencia en la generación de ROS endógenas (Monllor et al., 2017). En relación con lo citado, la implementación de agentes terapéuticos para prevenir el estrés oxidativo y los eventos apoptóticos, podrían constituir un enfoque ventajoso para preservar y/o mejorar la calidad seminal (Bejarano et al., 2014).

La melatonina tiene un elevado poder antioxidante y también se ha demostrado que tiene la capacidad para activar la maquinaria antioxidante enzimática primaria presente en el tejido corporal humano, por lo que puede ayudar a la calidad seminal. Es una hormona altamente lipófila, presenta fácil penetración en las membranas orgánicas y, por lo tanto, es capaz de proteger estructuras intracelulares importantes, incluyendo las mitocondrias y el ADN, del daño oxidativo. Es importante destacar que la administración a corto plazo de melatonina *in vitro*, logró mejorar el porcentaje de movilidad progresiva de los espermatozoides (Bejarano et al., 2014). En el Centro de Reproducción Asistida de Extremadura (Badajoz, España) se realizó un estudio en varones voluntarios infértiles, según lo aprobado por el comité local, la junta de revisión institucional de la Universidad de Extremadura y el comité de ética del Hospital Infantil (Badajoz, España). En dicho estudio se obtuvieron muestras seminales de treinta varones de una edad comprendida entre 20 y 50 años que estaban siendo evaluados en el laboratorio de andrología de dicha clínica. Presentaron el diagnóstico de infertilidad primaria. Se comprobó que cada sujeto gozaba de una buena salud, por medio de su historial médico y un examen clínico que incluía pruebas de laboratorio y exámenes rutinarios. Todos eran no fumadores, no usaban ningún medicamento y se abstendían de la ingesta de alcohol. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los voluntarios. Las muestras se recogieron después de la administración oral de 6mg de melatonina, tras un período de 45-90 días (Bejarano et al., 2014). Fueron recogidas por masturbación (tras 3-4 días de abstinencia sexual) y

se dejaron licuar durante 30 minutos a 37°C. La motilidad se analizó mediante el sistema de análisis de semen y se caracterizaron como “a” y “b” aquellos espermatozoides con motilidad progresiva rápida y lenta, respectivamente, “c” que indicaba motilidad no progresiva y “d” que indicaba espermatozoides inmóviles. El semen se dividió en dos fracciones: una muestra se almacenó a -20°C hasta la realización del ensayo de la capacidad antioxidante; y el resto se almacenó a 4°C hasta su evaluación por ensayo TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Dicho ensayo es una técnica molecular empleada para la detección de apoptosis o muerte celular programada, por lo que es esencial para la valoración de la integridad del material genético de los espermatozoides. Se basa en la identificación de los extremos libres 3’OH en el ADN de las células que han sufrido rupturas en su estructura. Emplea una enzima llamada terminal transferasa (TdT) para agregar marcadores fluorescentes en los extremos libres de 3’OH del ADN, permitiendo así la identificación y cuantificación de células dañadas (Bejarano et al., 2017).

Los espermatozoides apoptóticos se identificaron y cuantificaron mediante citometría de flujo y se tomaron imágenes con microscopio de epifluorescencia. Tras el análisis de las imágenes obtenidas se corroboró que las muestras seminales, cuya proveniencia era de pacientes que tomaban la dosis de 6mg de melatonina, presentaban una menor cantidad de espermatozoides con anomalías en su material genético (Bejarano et al., 2014).

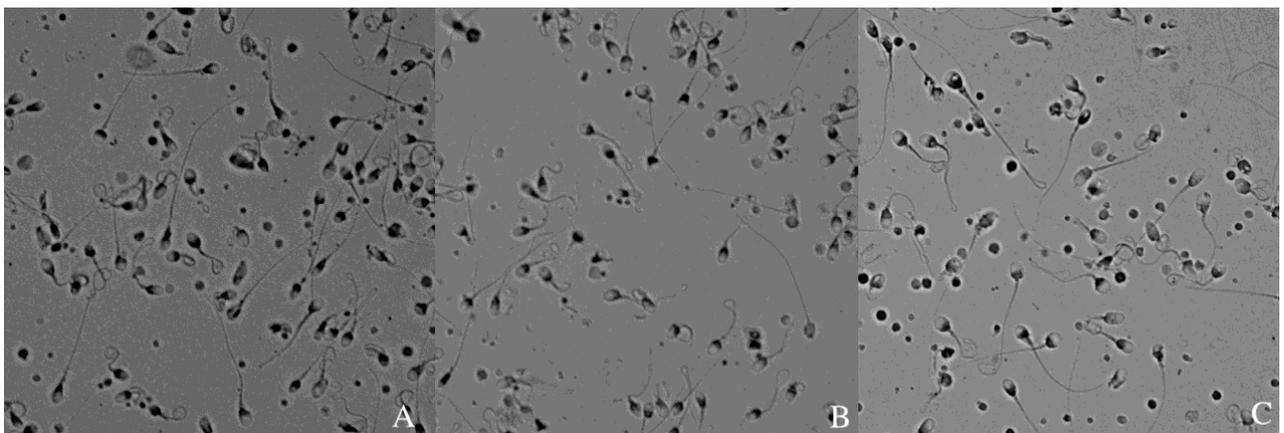


Figura 3. Visualización de espermatozoides mediante el ensayo TUNEL. (A) Control. (B y C) Muestras tratadas con melatonina. Se observa la reducción sustancial del daño en el ADN espermático, ya que reduce el ensayo TUNEL + como se observa en las imágenes B y C. Imágenes cortesía de Bejarano et al., 2017.

Acompañando a las muestras seminales, también se tomaron muestras de orina (matinal) y se almacenaron a -20°C hasta realizar el ensayo bioquímico. Se constató que las concentraciones sistémicas de melatonina están estrechamente relacionadas

con la aMT6-s urinaria, un metabolito de la melatonina. Por lo que, tras la administración de 6 mg de melatonina al día, cabría esperar un aumento de los niveles de melatonina sistémicos. Para corroborar que el tratamiento con melatonina mejora la capacidad antioxidante del cuerpo, se midió la capacidad antioxidante total de la orina. Este ensayo mostró unos niveles más elevados de antioxidantes urinarios, no solo tras 45 días, sino que también tras 90 días de suplementación con melatonina, lo que ocurrió concomitantemente con los niveles aumentados de aMT6-s. Dicho ensayo también se realizó en las muestras seminales y se corroboró que los espermatozoides tenían más capacidad antioxidante en comparación con el grupo control (Bejarano et al., 2017).

El estrés oxidativo es el origen de muchos trastornos; la mayoría provocados por fallos esporádicos de las defensas antioxidantes o por estrés ambientales, promoviendo la muerte celular y el mal funcionamiento de los tejidos. Particularmente en los espermatozoides, el estrés oxidativo y el daño en el ADN se han identificado como características en el estrés por calor o condiciones patológicas como el varicocele o la criptorquidia. Se ha descrito que la ocurrencia elevada de fragmentación del ADN debido al estrés oxidativo desencadena la apoptosis por la vía mitocondrial provocando un colapso del potencial de membrana que, a su vez, da como resultado la liberación de factores pre-apoptóticos que activan a unas enzimas conocidas como, caspasas, que inducen la apoptosis. Es bien conocido que existe una prevalencia de estrés oxidativo en parejas masculinas de parejas infértiles. Por lo que, con la realización de dicho estudio, se observó que, mediante administración de melatonina exógena, que actúa como poderoso antioxidante y eliminador de radicales libres, se mejora la calidad de su esperma. Estudios similares en los que se aplicó el tratamiento a mujeres, concluyeron que la melatonina mejoró su salud ovocitaria y por consecuencia el resultado del embarazo. Independientemente del mecanismo a través del cual se mitiga la fragmentación del ADN, se conoce que la prevención de la fragmentación del material genético espermático evita la generación de embriones humanos genéticamente dañados, especialmente en el campo de la reproducción humana asistida (Monllor et al., 2017).

4.10 Efectos de la suplementación con melatonina exógena sobre la fertilidad femenina

Esta indolamina de bajo peso molecular, que es sintetizada por diferentes células y órganos del cuerpo presenta numerosos efectos en el sistema reproductivo, debido a que su maquinaria sintética está presente en el ovario y en la placenta (entre otros). La melatonina es reconocida como una molécula multitarea que posee notables funciones biológicas, incluida la regulación de los ritmos biológicos, reproducción y la respuesta inmune... Los efectos beneficiosos de la suplementación con melatonina en los medios de cultivo de los laboratorios de reproducción humana asistida han sugerido que la indolamina podría ser útil en el manejo de la fertilidad humana. En este sentido, algunos estudios clínicos han probado recientemente el efecto de la suplementación oral de la melatonina durante la estimulación ovárica sobre la calidad ovocitaria y posteriormente, la embrionaria. No obstante, cabe destacar que todavía no se ha explorado el potencial terapéutico de la melatonina exógena en la infertilidad de causa idiopática. Por lo tanto, se realizó un estudio con el objetivo de evaluar si la suplementación con melatonina exógena mejora el equilibrio oxidativo en la fase folicular y la calidad ovocitaria de mujeres con infertilidad de causa idiopática, consiguiéndose un mayor éxito en las técnicas de reproducción humana (Espino et al., 2019).

El estudio fue realizado en el Centro de Reproducción Humana Asistida (CERHA, Badajoz, España) al que asistieron 40 mujeres. Fue aprobado por los comités de ética locales de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes excluyéndose a menores de edad, fumadores activos o si empleaban simultáneamente otras terapias adyuvantes (como hierbas chinas, debido a que estas pueden contener concentraciones elevadas de melatonina). También fueron excluidos si tenían antecedentes de trastornos autoinmunes/hipersensibilidad a la melatonina o alguno de sus metabolitos. Todas las mujeres que participaron en el estudio se dividieron en 4 grupos. El grupo 1 (control), formado por mujeres fértiles sanas que previamente habían tenido al menos un hijo (Espino et al., 2019). Posteriormente, se tomaron todas las mujeres con infertilidad de causa idiopática, sometidas a un segundo ciclo de FIV que presentaban ovulación normal, alguna patología tubárica comprobada clínicamente y que sus cónyuges eran normozoospermicos según los criterios establecidos por la OMS. Dichas mujeres se

dividieron al azar en tres grupos de 10 mujeres mediante el uso de una lista de números aleatorios generados por un ordenador:

- Grupo 2: mujeres que no tomaron melatonina
- Grupo 3: mujeres que tomaron una dosis diaria de 3mg de melatonina
- Grupo 4: mujeres que tomaron una dosis diaria de 6mg de melatonina.

En ambos casos, la melatonina fue tomada una hora antes de acostarse durante un período de 40 días, desde la primera cita de control hasta el día de la punción folicular para la obtención de los ovocitos. Los tratamientos de melatonina comprendían una fórmula de melatonina de liberación inmediata que se encapsulaba en cápsulas de gelatina (Espino et al., 2019).

Para la estimulación ovárica se empleó un protocolo estandarizado con antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Posteriormente, se detectaron y aspiraron un promedio de 10 folículos mediante aspiración transvaginal con aguja guiada por ecografía. Se recogieron las primeras orinas matinales en condiciones basales tras la administración de melatonina (Grupos 3 y 4), coincidiendo con el día de la punción folicular, acompañado también de líquido folicular. Todas las muestras se protegieron de la luz y fueron congeladas hasta su posterior análisis. Tras la obtención de los ovocitos, se procedió a la microinyección de espermatozoides (ICSI). Los resultados de la fertilización se analizaron a las 16-18 horas tras la inseminación. Los ovocitos correctamente fecundados (con 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares) se dejaron en cultivo y se observó su desarrollo el día 2 y el día 3, realizándose una transferencia de un único embrión en fresco aproximadamente a las 72 horas de la microinyección. La calidad del embrión fue calificada por embriólogos de acuerdo con los criterios de clasificación de embriones propuestos por ASEBIR. Para este estudio solamente se consideraron aptos los embriones de grado A y B (Tabla 2)(Espino et al., 2019).

Grado	Justificación
A	Blastómeros de igual tamaño con <10% de fragmentación (embriones de óptima calidad y máxima capacidad de implantación).
B	Blastómeros de igual tamaño con fragmentación del 11% al 25% (embriones de buena calidad y elevada capacidad de implantación, pero no indicados para transferencia electiva de un solo embrión).
C	Blastómeros de diferente tamaño, con fragmentación del 26% al 35% (embriones de baja calidad con baja probabilidad de implantación)

D	Embriones multinucleados con >35% de fragmentación.
---	---

Tabla 2. Clasificación de los embriones según los criterios de ASEBIR. Tabla cortesía de Espino et al., 2019.

Se demostró que las concentraciones de melatonina en el líquido folicular son capaces de predecir los resultados de las técnicas de reproducción humana asistida y la reserva ovárica de la paciente, debido a que se analizaron las supuestas diferencias en los niveles de melatonina del grupo 1 y del grupo 2. Para ello, primero se midieron los niveles de 6-sulfatoximelatonina urinaria (aMT6s), principal metabolito urinario de la melatonina, por medio de un kit ELISA. Se observó una concentración más baja de dicho metabolito en el grupo 2 en comparación con el grupo 1. La misma tendencia se mantuvo cuando las concentraciones se midieron en el líquido folicular, que fueron determinados mediante un kit comercial de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados pueden reflejar una asociación entre las bajas concentraciones de melatonina y la mala fertilidad y están, en línea con el potencial predictivo de la melatonina para los resultados de FIV. Como era de esperar, las concentraciones de aMT6s aumentaron en las pacientes del grupo 3 y 4, que también presentaron un aumento sustancial en las concentraciones intrafoliculares de melatonina (Espino et al., 2019). Por lo que, se proporciona evidencia de que, tales niveles reducidos de melatonina se asocian con un marcado desequilibrio oxidativo en el líquido folicular de las pacientes, pudiendo influir en la mala calidad ovocitaria y por consiguiente, con una baja tasa de éxito en los tratamientos recibidos. Es de vital importancia destacar que la suplementación con melatonina exógena reequilibró el estado oxidativo intrafolicular, mejoró la calidad de los ovocitos y por consiguiente, mejoró ligeramente las tasas de éxito de FIV en pacientes con infertilidad de causa idiopática. Ambas dosis de indolamina fueron probadas como efectivas, sugiriendo que la dosis más baja administrada (3mg/día, Grupo 3) es suficiente para mejorar el microambiente dañino del líquido folicular de tales pacientes, por lo tanto, un efecto beneficioso en sus ovocitos. No obstante, a pesar de que dichos hallazgos sean relevantes, deben tratarse con cautela debido al tamaño limitado de la muestra y la falta de cegamiento de la asignación de los grupos. Antes de realizar una recomendación efectiva sobre el uso de melatonina en mujeres con infertilidad de causa idiopática, es necesario realizar más estudios clínicos con amplias poblaciones con distintos antecedentes para poder confirmar el potencial terapéutico de dicha indolamina (Espino et al., 2019).

5. DISCUSIÓN

En esta revisión bibliográfica se proporciona una descripción general sobre la literatura actual que trata los beneficios de la suplementación con melatonina sobre la fertilidad humana. Tras la búsqueda de artículos científicos, se seleccionaron aquellos que se ajustaban a los objetivos de dicho Trabajo Fin de Máster.

En los 12 artículos seleccionados se han encontrado beneficios de la suplementación con melatonina sobre la fertilidad humana y como podría usarse también en las TRA para conseguir una mejor implantación embrionaria. Es de vital importancia destacar las limitaciones vinculadas a los tamaños poblacionales realizados en los distintos estudios; no obstante, se consiguió que los hallazgos fuesen significativos en las distintas ubicaciones donde se han llevado a cabo los estudios. Por todo ello, se requiere más investigación en dicho ámbito para poder conocer en profundidad el efecto beneficioso de la suplementación alimenticia en la fertilidad humana.

- Efectos de la suplementación alimenticia sobre la fertilidad humana:

En el artículo científico de González-Rodríguez et al., 2018, se estudiaron los efectos beneficios que puede tener la suplementación alimenticia sobre la fertilidad humana, aunque es de vital importancia remarcar que cada individuo es único y los resultados pueden variar. El Omega 3 se ha observado que puede reducir la concentración de testosterona y reducir así la resistencia insulínica en mujeres con SOP. También, se ha visto que el ácido fólico puede ser un elemento esencial en mujeres que planifican quedar embarazadas y que también ayuda al desarrollo del tubo neural. Al igual que el Zinc es de vital importancia en el desarrollo testicular normal, la producción de testosterona y la calidad seminal.

- Efectos de la melatonina sobre la reproducción humana

En el artículo científico de Cosme et al., 2022, se estudió los efectos beneficiosos que tendría dicha suplementación sobre los gametos. En cuanto a los espermatozoides, gracias a que la indolamina es capaz de atravesar la barrera hematotesticular para penetrar en las células testiculares y a su elevado potencial antioxidante, resultaría beneficiosa en proteger la integridad del material genético de los espermatozoides potenciando así una mejora en la calidad espermática debido a su capacidad para reducir las ROS. También, en la foliculogénesis, proceso que depende de la FSH y requiere de bajas concentraciones de ROS, debido a que elevadas concentraciones de

esta, generan estrés oxidativo que daña a las células de la granulosa y a las células ovocitarias.

- Melatonina y TRA

En el artículo científico de Cosme et al.,2022, se observó la relación entre la melatonina y las TRA. Si bien es cierto que las ROS poseen un papel fisiológico en la estructura y funcionalidad de los gametos, en exceso resulta perjudicial para su fisiología. Durante los procedimientos llevados a cabo en TRA, a diferencia de las condiciones fisiológicas in vivo, existe un elevado riesgo a sufrir estrés oxidativo, debido a la ausencia de mecanismos de defensa fisiológicos y a la presencia de fuentes intrínsecas de ROS. Por lo que, debido al elevado potencial antioxidante de dicha indolamina, su aplicación en los procesos rutinarios que se llevan a cabo en una clínica de Reproducción asistida, se podrían reducir los niveles de ROS en numerosos procesos, como la centrifugación de muestras seminales, los procesos de criopreservación de muestras o incluso sobre los medios de cultivo para mejorar la calidad ovocitaria y/o embrionaria.

6. CONCLUSIÓN

Tras la realización de una revisión bibliográfica exhaustiva sobre los posibles efectos de la melatonina sobre las funciones reproductivas, se puede afirmar que dicha indolamina presenta un papel importante en la regulación de la función reproductiva.

1. Esta hormona producida por la glándula pineal, encargada de regular el ritmo circadiano del cuerpo, presenta también, funciones específicas en la regulación de la pubertad, la ovulación y la fertilidad en ambos sexos. Se ha demostrado que afecta a la producción y liberación de hormonas reproductivas, tales como la LH y la FSH, así como también tiene efectos positivos sobre la calidad seminal y la ovulación.

2. También, afecta a la salud reproductiva debido a su elevada capacidad antioxidante vinculada a reducir el estrés oxidativo y reducir así el daño celular.

3. Los hallazgos establecidos durante la realización de dicho Trabajo Final de Máster sugieren que la melatonina podría ser útil en el tratamiento de ciertas disfunciones reproductivas y podría mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por problemas de fertilidad. Sin embargo, se requieren más investigaciones para entender completamente los efectos de la melatonina en la función reproductiva y por consecuencia, beneficiarse del potencial terapéutico que presenta.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bejarano, I., Monllor, F., Marchena, A. M., Ortiz, A., Lozano, G., Jiménez, M. I., Gaspar, P., García, J. F., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. (2014). Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *Journal of pineal research*, 57(3), 333–339. <https://doi.org/10.1111/jpi.12172>
2. Cosme, P., Rodríguez, A. B., Garrido, M., & Espino, J. (2022). Coping with Oxidative Stress in Reproductive Pathophysiology and Assisted Reproduction: Melatonin as an Emerging Therapeutical Tool. *Antioxidants(Basel, Switzerland)*, 12(1), 86. <https://doi.org/10.3390/antiox12010086>
3. Espino, J., Macedo, M. L. R., Lozano, G. M., Ortiz, Á., Rodríguez, C., Rodríguez, A., & Bejarano, I. (2019). Impact of melatonin supplementation in women with unexplained infertility undergoing fertility treatment. *Antioxidants*, 8(9), 338. <https://doi.org/10.3390/antiox8090338>
4. Espino, J., Macedo, M., Lozano, G., Ortiz, Á., Rodríguez, C., Rodríguez, A. B., & Bejarano, I. (2019). Impact of Melatonin Supplementation in Women with Unexplained Infertility Undergoing Fertility Treatment. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 338. <https://doi.org/10.3390/antiox8090338>
5. González-Rodríguez, L. G., López-Sobaler, A. M., Perea Sánchez, J. M. y Ortega Anta, R. M., (2018). Nutrición y fertilidad. *Nutrición Hospitalaria*. 35(6). <https://dx.doi.org/10.20960/nh.2279>
6. Guerrero, J. M., Carrillo-Vico, A., y Lardone, P. J. (2007). La melatonina. *Investigación y ciencia*, 373, 30-38.
7. Monllor, F., Espino, J., Marchena, A. M., Ortiz, Á., Lozano, G., García, J. F., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Bejarano, I. (2017). Melatonin diminishes oxidative damage in sperm cells, improving assisted reproductive techniques. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 41(6), 881–889. <https://doi.org/10.3906/biy-1704-45>
8. Moslemi, M. K., & Tavanbakhsh, S. (2011). Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *International journal of general medicine*, 4, 99–104. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S16275>

9. Ramirez Moran, A. F., Cala Bayeux, Á., Fajardo Iglesia, D., & Scott Grave de Peralta, R. (2019). Factores causales de infertilidad. *Revista Información Científica*, 98(2), 283-293.
<https://revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/2235/3998>
10. Rivera Mayoral, M. (2017). Factores y tratamiento nutricional para fertilidad humana masculina.
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/24940/TFG-MN989.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. Rodríguez, P.D. D., (2022). Esterilidad e Infertilidad: diagnóstico y tratamiento. *FMC- Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. 29 (2), 70-73. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2021.03.009>
12. Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., & Fougerou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current neuropharmacology*, 15(3), 434–443.
<https://doi.org/10.2174/1570159X14666161228122115>