

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
GRADO EN MEDICINA

## **“Incidencia de metales en el líquido folicular de pacientes estériles de las Islas Canarias. Relación con los ovocitos y la fertilización embrionaria”**

Autor: Jorge Eduardo Gómez Rodríguez



Tutores:

Dr. Arturo Hardisson de la Torre

Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y  
Salud Pública, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología.

Universidad de La Laguna.

Unidad de Reproducción. Hospital Universitario de Canarias

**Curso 2022-2023**



El estudio de investigación titulado: "**Estudio de la calidad ovocitaria, embrionaria y tasa de fertilización y su relación con la presencia de metales en líquido folicular**", versión 3, de 25 de julio de 2018, con código CHUC\_2018\_53, del que es Investigador Principal la Dra. RUBI NIEVES RODRIGUEZ DIAZ, ha sido evaluado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Complejo Hospitalario Universitario de Canarias (Provincia de Santa Cruz de Tenerife) en su sesión del 26 de julio de 2018, y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Protocolo con los objetivos del estudio.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el consentimiento informado, versión 1ª, de 19 de julio de 2018, es adecuado.

La capacidad del Investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por todo ello, el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Complejo Hospitalario Universitario de Canarias (Provincia de Santa Cruz de Tenerife) emite dictamen **FAVORABLE** para la realización de este estudio en el Hospital Universitario de Canarias.

Vicepresidente del CEIm  
Complejo Hospitalario Universitario de Canarias

Este documento ha sido firmado electrónicamente por:	
EMILIO JOSE SANZ ALVAREZ - FEA FARMACOLOGIA CLINICA	Fecha: 30/07/2018 - 10:51:26
En la dirección <a href="https://sede.gobcan.es/sede/verifica_doc">https://sede.gobcan.es/sede/verifica_doc</a> puede ser comprobada la autenticidad de esta copia, mediante el número de documento electrónico siguiente: 00aeY1h4a_oX605tbHEQxyRhqBfDB-Ueq	
El presente documento ha sido descargado el 30/07/2018 - 10:51:40	

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN/ABSTRACT.....	6
2.	INTRODUCCIÓN.....	8
	2.1. Concepto.....	8
	2.2. Metales pesados.....	9
	2.3. Clasificación de los metales.....	10
	2.4. Líquido folicular.....	11
	2.5. Relación entre metales y resultados reproductivos.....	12
3.	HIPÓTESIS.....	13
4.	OBJETIVOS.....	13
5.	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	13
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
	6.1. Muestra.....	14
	6.2. Tratamiento de reproducción asistida.....	15
	6.3. Determinaciones de metales.....	17
	6.4. Análisis de los datos.....	19
7.	RESULTADOS.....	20
	7.1. Muestra.....	20
	7.2. Metales.....	20
	7.3. Correlación entre metales.....	23
	7.4. Ovocitos.....	25
	7.5. Tasa de fertilización.....	25
8.	DISCUSIÓN.....	28
	8.1 Líquido folicular.....	28
	8.2 Metales.....	29
	8.3. Asociación entre metales y aspectos reproductivos.....	30
	8.4. Asociación entre Fe, ovocitos y TF.....	30
	8.5. Asociación entre Ca, ovocitos y TF.....	31
	8.6. Asociación entre Na, ovocitos y TF.....	32
	8.7. Asociación entre Al, ovocitos y TF.....	32
9.	CONCLUSIONES.....	33
10.	¿QUÉ HE APRENDIDO DURANTE ESTE TFG? ...	34

11. AGRADECIMIENTOS.....	34
12. BIBLIOGRAFÍA .....	35
13. ANEXOS.....	39
14. PUBLICACIONES .....	44

## ABREVIATURAS

- Pb: Plomo
- Cd: Cadmio
- Al: Aluminio
- Hg: Mercurio
- Ca: Calcio
- Mg: Magnesio
- K: Potasio
- Na: Sodio
- Fe: Hierro
- Zn: Zinc
- Cu: Cobre
- Cr: Cromo
- Co: Cobalto
- Mo: Molibdeno
- Se: Selenio
- Sr: Estroncio
- Bi: Bismuto
- V: Vanadio
- Ni: Níquel
- B: Boro
- Ba: Bario
- FIV: Fecundación in Vitro.
- ICSI: Inyección intracitoplásmica de espermatozoides
- ICP-OES: Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente
- LH: hormona luteinizante. FSH: hormona foliculoestimulante
- LF: líquido folicular
- MP: metales pesados
- IMC: índice de masa corporal
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- TF: Tasa de fertilización
- TRA: Técnicas de reproducción asistida

## 1. RESUMEN

**Introducción:** En las últimas décadas se ha producido un aumento de contaminantes ambientales que pueden afectar los resultados de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

**Material y Métodos:** Se han medido los niveles de veintidós metales en el líquido folicular (LF) de noventa y tres mujeres en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario de Canarias, y su influencia en las TRA, respecto al número y madurez de los ovocitos y en las tasas de fertilización. (TF) Los metales se determinaron por espectrometría de emisión óptica y plasma acoplado inductivamente.

**Resultados:** En la relación entre el número de ovocitos y los metales: el hierro ( $r_s=0.303$ ;  $p=0.003$ ) y el calcio ( $r_s=-0.276$ ;  $p=0.007$ ) fueron significativos, así como los ovocitos maduros con el hierro ( $r_s=0.319$ ;  $p=0.002$ ), calcio ( $r_s=-0.307$ ;  $p=0.003$ ) y sodio ( $r_s=-0.215$ ;  $p=0.039$ ) y estaban próximos a la significación en el caso del aluminio ( $r_s=-0.198$ ;  $p=0.057$ ). En el grupo con una TF  $\leq 75\%$ , 36% de las mujeres presentaron calcio  $>176.62$  mg/Kg comparado con el grupo con una TF  $\geq 75\%$  donde este porcentaje fue solo del 10% ( $p=0.011$ ).

**Conclusión:** Varios metales detectados en el LF como el calcio, hierro, sodio y aluminio tienen una influencia importante en la reproducción y demuestra que el análisis de los metales abre una nueva línea de estudio en la esterilidad femenina, con implicaciones en los resultados reproductivos. Muchos casos diagnosticados como esterilidad de origen desconocido podrían ser debido a ciertas alteraciones en los metales en el LF, con la posibilidad de establecer su tratamiento.

**PALABRAS CLAVE:** Líquido folicular; metales; FIV; ICSI; ovocito; fertilización.

## 1. ABSTRACT

**Introduction:** In the last decades there has been an increase in environmental pollutants that can affect ART outcome.

**Material and Methods:** The levels of twenty-two metals were measured in the Follicular fluid (FF) of ninety-three females in the Reproduction Unit of the Hospital Universitario de Canarias, and their influence on Assisted Reproduction Technique (ART) were examined, related to oocytes number and maturity and the fertilization rate (FR). The metals were determined by optical emission spectrophotometry.

**Results:** The relationships between the number of oocytes and metals: iron ( $r_s=0.303$ ;  $p=0.003$ ) and calcium ( $r_s=-0.276$ ;  $p=0.007$ ) are significant, as well as between the number of mature oocytes with iron ( $r_s=0.319$ ;  $p=0.002$ ), calcium ( $r_s=-0.307$ ;  $p=0.003$ ) and sodium ( $r_s=-0.215$ ;  $p=0.039$ ) and are near to significance in the case of aluminium ( $r_s=-0.198$ ;  $p=0.057$ ). In the group with a  $FR \leq 75\%$ , 36% of the women presented calcium  $>176.62$  mg/Kg compared to the group with a  $FR \geq 75\%$  where this percentage was only 10% ( $p=0.011$ ).

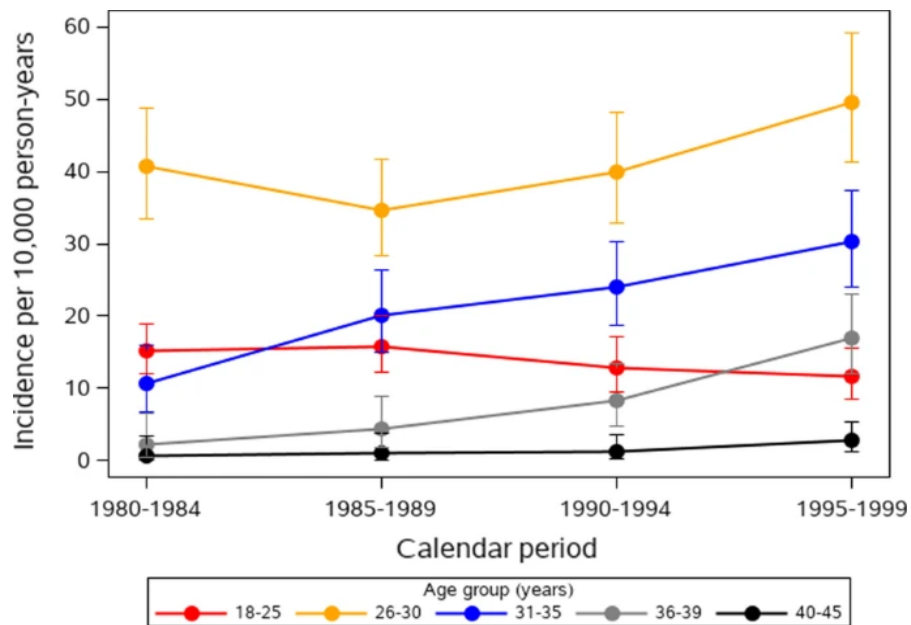
**Conclusion:** Several metals detected in FF, such as Ca, Fe, Na, and Al has an important influence on reproduction, and show that the analysis of metals opens a new line of study on female infertility with implications in reproductive outcomes. Many cases of unknown infertility could be due to metals in FF, and treatments could be aimed at correcting possible anomalies in metals levels in infertile women.

**KEY WORDS:** Follicular fluid; metals; IVF; ICSI; oocyte; fertilization.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Concepto

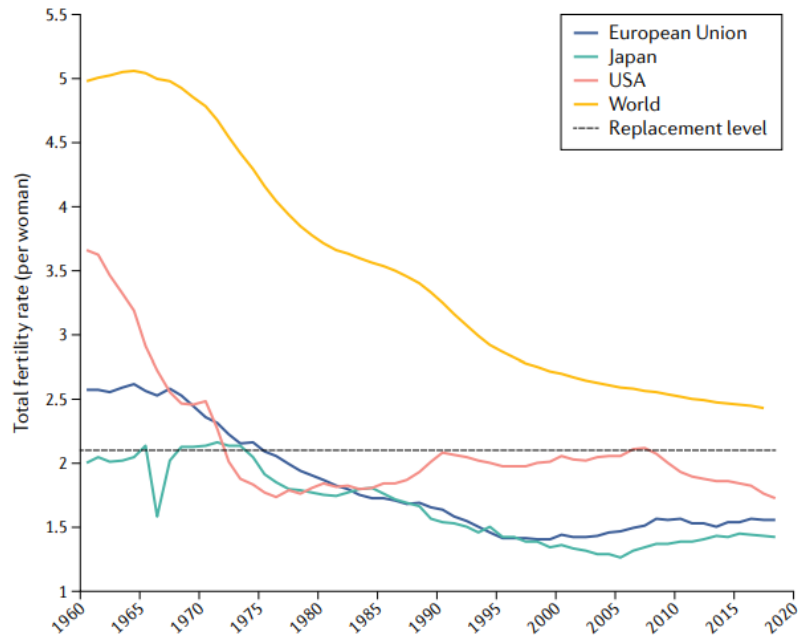
En los últimos años se ha evidenciado una disminución en los índices de fertilidad, que afecta a un número cada vez más elevado de parejas. Así, las tasas de esterilidad primaria han aumentado de 14 a 20 por 10.000 personas-año desde 1980 a 1999 (Figura 1), lo que ha motivado un grave descenso de los nacimientos en los últimos 50 años, y que provoca, a su vez, un declive considerable de la población, sobre todo en las regiones industrializadas (1).



**Figura 1.** Incidencia de diagnóstico de esterilidad primaria por 10.000 personas-año, estratificada por periodo de calendario y grupo de edad (2)

A pesar de las mayores tasas de natalidad en las zonas no industrializadas del mundo, la tasa total de fecundidad a nivel global parece estar disminuyendo hacia el 2.1, por debajo de la cual no se puede mantener una población (1) (Figura 2).





**Figura 2.** Tasas globales de fecundidad en la Unión Europea, Japón y Estados Unidos, 1960-2018 (1)

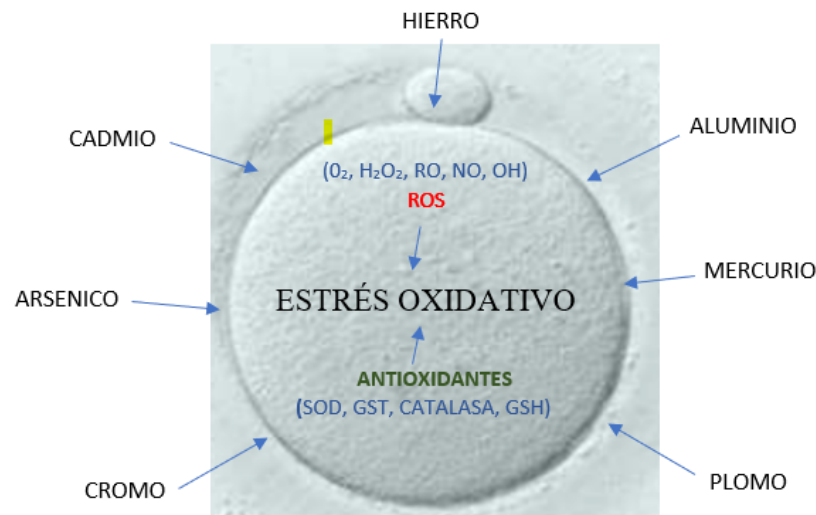
Se define la esterilidad como la incapacidad para obtener un embarazo tras un año de relaciones sexuales sin protección. Su etiología refleja probablemente una combinación de causas genéticas, impactos ambientales y alteraciones subyacentes de la homeostasis hormonal y endocrina (2), en las que la disfunción ovulatoria y el origen desconocido son las causas más frecuentes de esterilidad (3).

Uno de los factores que puede ser responsable del aumento de la esterilidad de origen desconocido sería la contaminación ambiental por metales tóxicos, en este sentido, se han objetivado efectos negativos de algunas toxinas como los MP (4), y su acumulación en los tejidos reproductivos corrobora la posibilidad de su toxicidad reproductiva (5).

## 2.2. Metales pesados

Si bien algunos MP son elementos químicos metálicos y metaloides tóxicos para el medio ambiente y el ser humano, otros son un elemento indispensable para el mantenimiento de los sistemas bioquímicos, aunque en ciertas cantidades también pueden ser tóxicos. Así, el Cd, el Hg y el Pb, no tienen funciones metabólicas y siempre son tóxicos, mientras que, el Cu, el Cr, el Mn y el Zn, son esenciales en

concentraciones muy bajas pero tóxicos en concentraciones más altas (6). Los metales, naturalmente presentes en el medio ambiente, han sido reconocidos como uno de los principales contaminantes de los ecosistemas. El mecanismo por el que la mayoría de estos elementos producen daño en la producción de radicales libres, ROS, y la generación de antioxidantes para desintoxicar los intermedios reactivos o reparar el daño resultante (7) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del ataque de los MP a una célula y el equilibrio entre la producción de ROS (radicales de oxígeno: superóxido ( $O_2$ ), y los radicales hidroxilos ( $H^*$ ), peroxilo ( $RO_2$ ), y alcoxilo (RO), y la defensa posterior presentada por los antioxidantes (Glutación (GSH), Glutación S-transferasa (GST))

Obasi et al. (8), al analizar diversos estudios sobre aspectos reproductivos, encuentra que los niveles elevados de MP/metaloides estaban implicados en la esterilidad y en el aborto espontáneo, y que sus resultados sugieren que puede contribuir a las tasas de fracaso de la FIV.

No obstante, el número de estudios que han evaluado el impacto de los MP en los resultados de las TRA son escasos.

### 2.3. Clasificación de los metales

#### *Metales pesados tóxicos*

Los metales tóxicos, como el Pb, Cd, Al, y Hg, tienen la capacidad de ser perjudiciales para la salud humana, incluso a bajas concentraciones o si se produce

una exposición prolongada. A pesar del conocimiento de sus efectos nocivos para la salud humana, su exposición persiste e, incluso, en algunas zonas se ha incrementado (1).

#### *Macroelementos*

El grupo de los macroelementos está representado por macronutrientes como son el Ca, Mg, K y Na. Éstos se precisan en grandes cantidades, encontrándose presentes en los tejidos de los seres vivos (9).

#### *Microelementos y metales traza*

- *Esenciales*: Un elemento esencial para el hombre es aquel cuya ausencia o deficiencia en la dieta causa alteraciones funcionales y estructurales. Estos elementos deben de ser consumidos en cantidades adecuadas para el mantenimiento normal de las funciones fisiológicas, pero hay que tener en cuenta que si se ingieren en exceso pueden ser tóxicos. Los elementos traza, esenciales para la salud humana son: Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Mo y Se (10).

- *No esenciales*: Los metales no esenciales como el Sr, Bi, V, Ni, B, Ba y Li, son constituyentes naturales de la corteza terrestre. La contaminación del aire, del suelo y de las aguas contribuye a la presencia de estos elementos.

### **2.4. Líquido folicular**

El LF humano es un líquido biológico complejo, en el que se sumerge el ovocito en desarrollo, en el interior del folículo ovárico. Desempeña un papel importante de apoyo al crecimiento y a la maduración del óvulo, además de brindar protección contra sustancias nocivas. Se compone de secreciones de células de la granulosa y la teca, y de plasma sanguíneo filtrado.

Las células foliculares, por los estímulos de la FSH y de los estrógenos, producen este líquido viscoso de color amarillo y de pH básico o superior a 7 y está formado, además, por un exudado ultrafiltrado de plasma. Contiene esteroides, metabolitos, polisacáridos, proteínas, factores de crecimiento, péptidos, ROS y enzimas antioxidantes (11).

Los nutrientes y componentes sanguíneos exógenos penetran en el antro folicular a través de la membrana basal, ya que los vasos ováricos no atraviesan la lámina basal, (12), constituyendo la “barrera sanguínea” de los folículos (13).

El LF constituye la primera exposición del ovocito a los contaminantes ambientales (14), y este ambiente puede afectar la calidad del embrión y, de esta forma, a la consecución de un embarazo, de tal manera que cuando hay alteraciones en su composición, se asocia con una menor capacidad reproductiva (15).

Por tanto, la calidad del ovocito está influida además de por el genoma nuclear y mitocondrial, por el microambiente proporcionado por el ovario y el folículo preovulatorio que influye en la transcripción y traducción y, como consecuencia, en la madurez citoplasmática (16). Si el ovocito se desarrolla en un ambiente tóxico que afecta a los folículos primordiales, se dañará la maduración y la calidad del embrión, y este deterioro podría ser uno de los efectos de los MP (17).

### **2.5. Relación entre metales y resultados reproductivos**

Diversos factores ambientales afectan a la maduración ovocitaria y a la calidad del embrión, así, Bloom et al. (18), encontraron una asociación entre la disminución de la fecundidad y fertilidad, con altas dosis y exposiciones profesionales al Hg, Cd, y Pb. Por otro lado, Ingle et al. (19), observaron una asociación negativa entre la presencia de Cr en el LF y el número de ovocitos maduros recuperados, y del Zn con la tasa de fertilización. Cuando se realizaban estas determinaciones en orina se encontró que cuanto más altos eran los niveles de Co, Cr, Cu, Mn, y Mo se asociaba con más ovocitos recuperados por mujer.

El mecanismo de la toxicidad de los MP en los seres humanos se debe principalmente a su interacción con los grupos enzimáticos sulfhidrilo en los sistemas antioxidantes no enzimáticos, ya que sustituyen preferentemente el átomo H de los grupos sulfhidrilo de las moléculas reducidas de glutatión, dando lugar a la formación de complejos organometálicos con potencial para desactivar cualquier otra reacción bioquímica posterior (20), y este proceso, por tanto, afectaría también a la gametogénesis, la fertilización y el desarrollo embrionario, y por tanto, disminuiría la tasa de implantación.

Aunque sus mecanismos y concentraciones sean desconocidas, el Pb en sangre y el Cu en LF, parecen tener impactos significativos sobre el resultado del ciclo de TRA (5).

Otros autores hallaron que una concentración más elevada de MP se asociaba con ovocitos y embriones de baja calidad (10), y por contra, se objetivó que un mayor nivel de Zn en suero y en el LF, podría tener un papel positivo en la TRA (17).

### **3. HIPÓTESIS**

Valorar la incidencia de metales en el LF de pacientes estériles de las Islas Canarias, y los posibles efectos de los metales estudiados en los resultados de ovocitos y en la fertilización en los ciclos de TRA, FIV/ICSI.

### **4. OBJETIVOS**

El objetivo de este estudio es la determinación de metales en el LF de pacientes estériles que acuden a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Canarias, procedentes de todas las islas a excepción de Las Palmas, para conocer su incidencia, y relacionarlo por un lado con los resultados de los ovocitos obtenidos, respecto a su número y madurez, y con las TF en los ciclos de TRA.

El objetivo primario del estudio fue valorar la incidencia de metales en el LF, y el objetivo secundario fue relacionarlo con los ovocitos, y con las TF.

### **5. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

La justificación de este trabajo es debida al desconocimiento de la incidencia de metales en el LF en pacientes estériles en las Islas Canarias y la escasez de referencias bibliográficas sobre los niveles de metales en LF, no sólo en mujeres estériles, y su relación con la alteración de los parámetros ovocitarios, así como su influencia en la TF.

### **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente estudio es de diseño experimental, con un seguimiento prospectivo. Los sujetos son 93 pacientes atendidas en la Unidad de Reproducción por

esterilidad, sometidas a TRA y que viven en las Islas Canarias. Se les realizó un protocolo de estudio de esterilidad y se les indicó la realización de TRA, con aspiración de LF, que se recogió para la detección de MP.

### 6.1. Muestras

Se realizó un estudio de detección de metales en el LF, en noventa y tres mujeres que acudieron a la Unidad de Reproducción, entre febrero de 2019 y diciembre de 2020.

Las mujeres a estudio tenían unas edades comprendidas entre los 20 y los 42 años, todas ellas habitantes de las Islas Canarias, a las que se les efectuó una estimulación de la ovulación con punción y aspiración del LF para extracción de ovocitos de FIV, para valorar la presencia de ovocitos, por un lado, y por otro, para el análisis de metales.

Los resultados de la punción de FIV/ICSI, se obtuvieron del programa SARA<sup>®</sup> (Sistema de Ayuda a la Reproducción Asistida) de la URH /HUC, mientras que el análisis de metales se realizó en el Instituto de Medicina Legal y Forense.

La recogida de datos personales de la paciente se efectuó previo consentimiento, mediante el acceso a su historia clínica recogida en el programa SAP<sup>®</sup> y SARA<sup>®</sup> del HUC.

Todos los sujetos aceptaron participar en el estudio y firmaron un consentimiento informado por escrito para la realización de todos los procedimientos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Canarias (Reg. N° CHUC 2018 53).

Todos los pacientes fueron entrevistados por el mismo profesional y completaron un cuestionario que incluía las siguientes variables:

- Ocupación: trabajos con poca/ nula, alguna o mucha exposición a metales.
- Residencia: zonas metropolitanas, afueras de las zonas metropolitanas e islas menores.
- Alcohol: ningún consumo o consumo regular de alcohol.
- IMC:

Bajo peso (IMC < 18.5 kg/m<sup>2</sup>)

Peso normal (IMC 18.5 - 24.9 kg/m<sup>2</sup>)

Sobrepeso (IMC 25.0 - 29.9 kg/m<sup>2</sup>)

Obesidad (IMC  $\geq$  30.0 kg/m<sup>2</sup>)

- Edad: edad fértil (entre 14 - 41 años) y avanzada edad (> 41 años).
- Tabaco, se ha codificado según el número de cigarrillos por día (CPD):
  - No Fumadores
  - Fumador normal (1 a 10 CPD)
  - Fumador extremo (> 10 CPD)
- Categoría laboral de los participantes fueron las siguientes (Tabla 1):

**Tabla 1.** Categoría laboral de las pacientes incluidas en el estudio

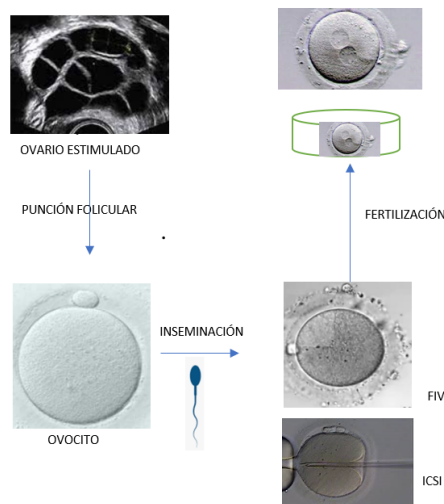
CATEGORÍA LABORAL	%	
Sanitario	15	Auxiliares de enfermería, cuidadores, enfermeros, esteticistas, farmacéuticos, masajistas, médicos y trabajadores sociales
Administrativo	31	Abogados, oficinistas, aparejadores, empleados de banca, contables, diseñadores gráficos, empresarias, funcionarios, agentes inmobiliarios, profesores y secretarios
Agricultura	3	Capataz y personal de embalaje
Transporte y comercio	28	Personal de aeropuertos, auxiliares de vuelo, dependientes de tiendas y supermercados
Hostelería	19	Camareras, camareros, cocineros, personal de limpieza, recepcionistas y personal de restaurantes
Otros	4	Parados y estudiantes

## 6.2. Tratamiento de reproducción asistida

Las participantes se sometieron a una punción y aspiración de los folículos ováricos para la extracción de ovocitos con evaluación de la presencia de estos y para el análisis de los metales en el LF.

Se realizó una estimulación ovárica controlada para recuperar los ovocitos. Se utilizó el protocolo antagonista: la estimulación farmacológica con gonadotropinas recombinantes comenzó el segundo día del ciclo, con la administración de una dosis variable de 225-300 UI de rFSH (Puregon®, Organon, Francia o Gonal-F®, Merck Serono, Francia) asociada o no a 100-150 UI de gonadotropina urinaria HMG (Menopur®). Una vez que el folículo principal alcanzaba los 14 mm. de diámetro, se añadía el antagonista de la GnRh por vía subcutánea, diariamente, comenzando con 0,25 mg de ganirelix o

cetrorelix (Ganirelix, Orgalutran®, Organon, Francia; Cetrorelix, Cetrotide®, Serono, Francia). Cuando los folículos tenían al menos 17 mm., se realizó la maduración final con rHCG (Ovitrelle® 250 microgramos de solución inyectable en pluma precargada, coriogonadotropina alfa, Merck Serono, Bari, Italia). La recogida de óvulos (OPU) se realizó treinta y seis horas después de la administración de rHCG, mediante una aguja transvaginal, bajo visión ecográfica (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema del estudio

El LF se separa del ovocito durante el procedimiento de la TRA, y se descarta de forma rutinaria, pero puede conservarse para su análisis. Se mezcló el LF de varios folículos, y se guardó en la nevera hasta la determinación del metal.

Una vez recuperados los ovocitos, el mismo día se recogió una muestra de semen y se procesó posteriormente para la TRA. A continuación, los ovocitos se inseminaron, ya sea mediante la técnica de FIV o de ICSI según la indicación, y tras ello tendría lugar la fecundación y la posterior división embrionaria.

La TF se evaluó a las dieciocho horas después de la inseminación y se definió como el porcentaje de ovocitos fecundados con respecto al número de ovocitos maduros, siempre que al menos uno fuera maduro (Metafase II). La TF es un indicador que refleja la capacidad del laboratorio para generar cigotos normales a partir de ovocitos maduros.



### 6.3. Determinación de metales

Las muestras de LF se recogieron en el laboratorio de FIV de la Unidad de Reproducción, y se identificaron con un número del 1 al 93 para anonimizarlas y garantizar la confidencialidad: identificadas, codificadas, anonimizadas o anónimas.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Departamento de Toxicología de la Universidad de La Laguna y en el Instituto de Medicina Legal y Forense. Se procesaron 93 muestras por triplicado mediante digestión por microondas (Multiwave Go, Antonpaar). En cada reactor se añadió 1 mL de muestra, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Honeywell, Fluka) y 4 mL de HNO<sub>3</sub> 65% (Honeywell, Fluka), que fueron sometidos al proceso de digestión. Este proceso duró 1 hora y 26 minutos y alcanzó una temperatura máxima de 180°C. Tras la digestión, el contenido de los reactores se enrasó a 10 mL con agua destilada (Milli-Q Gradient A10, Millipore, MA, EE. UU.) para su análisis.

La digestión de las muestras de LF se efectúa con Multiwave GO Digestion System, Anton Paar, que consta de un rotor en el cual hay 12 reactores.

En cada uno de los reactores se procesa una muestra de semen:

1. Pesar las muestras de LF en una balanza de precisión Mettler Toledo
2. Introducir en cada uno de los reactores los 0.5 mL de semen a procesar.
3. Añadir 2 mL de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 4 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>).
4. El programa de tiempo utilizado para la digestión por microondas fue el siguiente: 10 minutos hasta los 70°C, 20 minutos hasta 180°C y por último el enfriamiento durante 15 minutos hasta 50°C.
5. Tras terminar la digestión, se vierte el material digerido en un matraz de 10 mL con agua destilada.
6. Verter los 10 mL en frascos de polietileno almacenados en ausencia de luz y temperatura fría.

La detección de metales se llevó a cabo en el Servicio Canario de la Salud en asociación con el Departamento de Toxicología de la Universidad de La Laguna y en el Instituto de Medicina Legal y Forense. En el LF se midieron los siguientes

metales Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Si, Sn, Sr, V y Zn.

Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de emisión óptica y plasma acoplado inductivamente, modelo ICP-OES Thermo Scientific iCAP PRO (Waltham, MA, EE.UU.) con un muestreador automático Auto Sampler (Figura 5).



**Figura 5.** Espectrómetro de Masas de Plasma (ICP-OES)

Las condiciones instrumentales fueron:

- Flujo de gases (flujo de gas de nebulización y flujo de gas auxiliar): 0.5 L/min.
- Potencia aproximada de radiofrecuencia: 1150 W.
- Flujo de la bomba de inyección de muestra (flujo de estabilización y flujo de análisis): 50 rpm.

Las concentraciones se calcularon mediante extrapolación de las absorbancias leídas sobre las curvas de calibrado construidas previamente a partir de disoluciones patrón de diferentes concentraciones para cada uno de los elementos. Los límites instrumentales de detección y cuantificación se estimaron basándose en la respuesta instrumental del espectrómetro. Concretamente, se determinaron analizando quince blancos en condiciones reproducibles. Los límites de detección y cuantificación para cada nivel de metal en el LF se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Longitudes de onda, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

Metal	Longitud de onda (nm)	LOD mg/L	LOQ mg/L
Al	167.0	0.005	0.015
B	249.6	0.008	0.027
Ba	455.4	0.0006	0.002
Ca	315.8	1.629	5.432
Cd	214.4	0.0007	0.002
Co	228.6	0.001	0.005
Cr	267.7	0.001	0.005
Cu	324.7	0.003	0.011
K	766.4	1.764	5.883
Li	670.7	0.013	0.031
Mg	383.8	1.580	5.268
Mn	257.6	0.0008	0.003
Mo	202.0	0.0016	0.005
Na	818.3	2.221	7.404
Ni	221.6	0.0009	0.003
Pb	220.3	0.0009	0.003
Sr	407.7	0.003	0.011
V	292.4	0.0014	0.004
Zn	213.8	0.0027	0.009

#### 6.4. Análisis de los datos

Los datos se resumieron como frecuencias relativas para las variables categóricas, medias  $\pm$  desviación estándar para las variables de distribución normal y medianas (rango intercuartil IQR, P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>) para los datos no normales.

Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson, la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba U de Mann Whitney y ANOVA o *t*-student según el tipo de variable y el número de grupos a comparar. El grado de relación entre las variables continuas se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman según sus distribuciones.

El punto de corte o umbral de contenido metálico para discriminar el éxito de las diferentes fases reproductivas se estableció aplicando las curvas Receiver Operating Characteristics (ROC) y eligiendo el punto según el criterio del índice de Youden. Se incluyeron las curvas ROC y el área bajo la curva (AUROC). Se utilizó SPSS V 25 (IBM SPSS Statistics) y MedCalc V 19.5 (MedCalc Software Ltd.). Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Muestra

Las participantes tenían entre veinte y cuarenta y dos años de edad y todos vivían en las Islas Canarias, España. La edad media de las pacientes era de  $36.0 \pm 3.9$  años, y el índice de masa corporal (IMC) era de  $24.7 \pm 3.3$  kg/m<sup>2</sup>. Entre éstas, el 80.4% presentaba esterilidad primaria, el 3.2% secundaria y el 8.7% refería pérdida de embarazo previa. Otro 5.4% acudió como mujer sin pareja, y un 2.2% como mujer con pareja femenina. En cuanto a la patología que presentaban, el 24% tenían ovarios poliquísticos (OPQ), el 8.7% una patología tubárica, el 5.4% miomas, el 3.2% endometriosis, y patología cervical, en la misma proporción. Todas las pacientes seguían la dieta mediterránea y sólo tres participantes tenían una exposición leve a tóxicos como agricultores, como personal de envasado de frutas.

Se registraron hábitos tóxicos, como el tabaco (17.4% de las participantes) o la ingesta ocasional de alcohol (27%). En cuanto al lugar de residencia, el 65.6% vivía en la isla de Tenerife, el 10.7% en La Palma, el 10.7% en Lanzarote, el 10.7% en Fuerteventura, el 1.07% en La Gomera y el 1.07% en El Hierro.

Los varones tenían una edad media de  $38.2 \pm 5.2$  años y un IMC medio de  $27.4 \pm 4.3$  kg/m<sup>2</sup>.

### 7.2. Metales

La concentración de metales en las muestras de LF varía en función del metal. Los metales que presentaron concentraciones superiores al LOQ instrumental en mayor medida fueron Na (97.83%), Fe (95.65%) y K (93.47%), mientras que Co, Mo, Cr, B, Cd, Li y V, Hg, no se detectaron en ninguna muestra de LF de la cohorte. Y aquellas muestras en las que las señales eran inferiores al LOQ instrumental, no se tuvieron en cuenta en el análisis estadístico. Esto no significa que no estuvieran presentes, ya que podrían haber estado por debajo del límite de detección del dispositivo (ICP-OES), lo que no los descarta como potencialmente dañinos.

La concentración media (mg/Kg) fue mayor para los metales macroelementos Na, K y Ca. Seguidos de los metales esenciales Fe, Zn, Cu y Mn, y se detectaron los metales no esenciales Ba y Al (Tabla 3).

Según el nivel en el LF de cada metal, el orden hallado sería el siguiente:

Na>Ca>Fe>K>Zn=Cu>Al>Mn>Ni=Ba>Mg>Pb>Sr.

**Tabla 3.** Contenido de metales en el líquido folicular

Metales n (%)	N > LOQ	% >LOQ	mg/Kg
Metales esenciales			
Cu	85	92.39	0.88 ± 0.30
Fe	88	95.65	15.48 ± 13.89
Fe *	-	-	11.2 (7.0;17.8)
Zn	85	92.39	1.14 ± 0.39
Mn	58	63.04	0.04 ± 0.01
Metales no esenciales			
Ba	11	11.96	0.06 ± 0.07
Al	65	70.65	0.66 ± 0.66
Al*	-	-	0.50 (0.32;0.80)
Ni	11	11.96	0.31 ± 0.41
Pb	2	2.17	-
Sr	1	1.09	-

Macroelementos

Ca	85	92.39	148.51 ± 49.24
K	86	93.48	332.47± 118.73
Mg	10	10.87	68.80 ± 6.75
Na	90	97.83	4550.45± 1299.24

\*Media (rango intercuartil)

Se valoró la presencia de metales en el LF en pacientes con OPQ (Tabla 4). 22 pacientes (24%) tenían OPQ. No hay diferencias significativas en las características de las mujeres o en la presencia de metales según OPQ.

**Tabla 4.** Características y contenido de metales según OPQ

	OPQ		<i>p</i> -valor
	Sí (N = 22)	No (N = 71)	
Esenciales, n (%)			
Co	-	-	
Mo	-	-	
Cr	-	-	
Cu	19 (86)	66 (93)	0.388
Fe	20 (91)	68 (96)	0.589
Zn	19 (86)	66 (93)	0.388
Mn	12 (55)	46 (65)	0.453
Cu (mg/kg)	0.95 ± 0.45	0.86 ± 0.24	0.249
Fe (mg/kg)	17.87 ± 13.96	14.78 ± 13.90	0.385
Fe (mg/kg)*	14.2 (6.8; 26.0)	9.86 (7.0; 16.5)	0.282
Zn (mg/kg)	1.03 ± 0.37	1.17 ± 0.39	0.181
Mn (mg/kg)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.319
No esenciales, n (%)			
Ba	2 (9)	9 (13)	0.938
Al	13 (59)	52 (73)	0.287
B	-	-	
Cd	-	-	
Li	-	-	
Ni	3 (14)	8 (11)	0.718

Pb	1 (5)	1 (1)	0.419
Sr	1 (5)	-	0.237
V	-	-	
Ba (mg/kg)	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.07	0.488
Al (mg/kg)	0.81 ± 1.34	0.62 ± 0.35	0.358
Al (mg/kg)*	0.30 (0.26; 0.79)	0.54 (0.35; 0.80)	0.187
Ni (mg/kg)	0.17 ± 0.03	0.36 ± 0.48	0.517
Macroelementos, n (%)			
Ca	18 (82)	67 (94)	0.087
K	19 (86)	67 (94)	0.350
Mg	3 (14)	7 (10)	0.696
Na	20 (91)	70 (99)	0.138
Ca (mg/kg)	139.5 ± 33.8	151.3 ± 52.7	0.373
K (mg/kg)	351.0 ± 131.1	327.6 ± 115.4	0.450
Mg (mg/kg)	70.9 ± 7.0	67.9 ± 7.0	0.548
Na (mg/kg)	4609 ± 1672	4540 ± 1185	0.836

Usando punto de cortes según Índice de Youden para aquellos metales que más próximos están a la significación estadística, sugiere que bajos valores de Cu, Zn, Al y Ca favorece el OPQ.

El AUROC de este modelo es de 0.673 (IC<sub>95%</sub> 0.546; 0.801)  $p = 0.014$

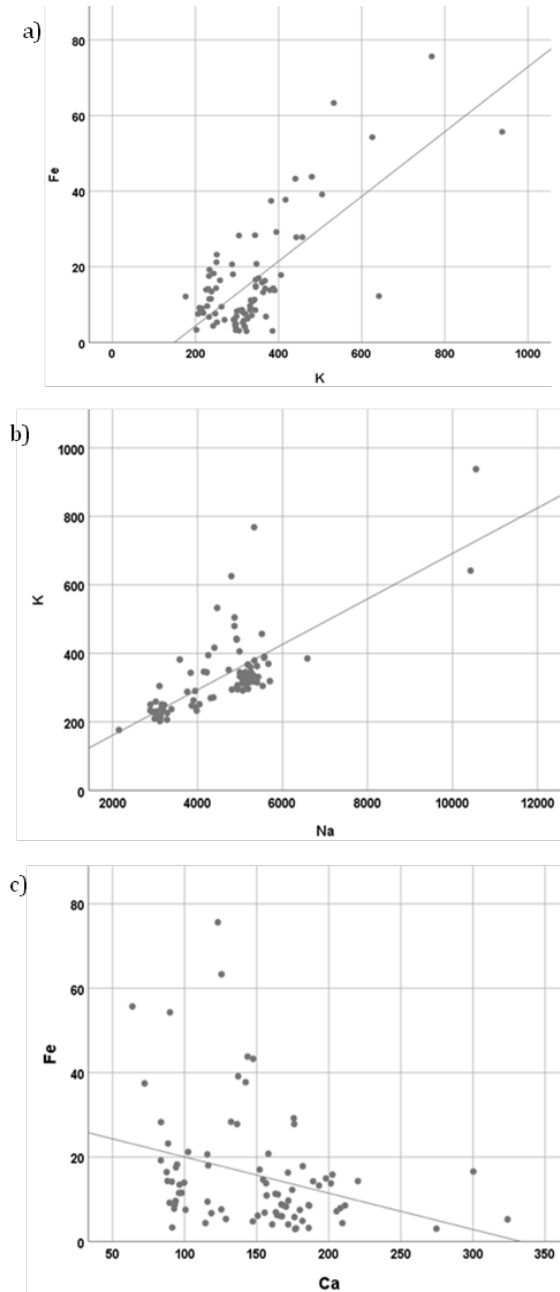
### 7.3. Correlación entre metales

Las correlaciones positivas indican que, cuando aumenta la concentración de un elemento, no interfiere con la otra, aumentando también su concentración. Así, el K se correlacionó positivamente con el Fe y el Zn y fue significativo con Na ( $r = 0.7389$ ;  $p < 0.001$ ), el Cu se correlacionó positivamente con el Zn, Ba, Ca y Na (la correlación más alta fue con Ba) y el Mn se lo hizo positivamente con Zn. El Ba se correlacionó positivamente con el Cu y el Zn.

Por otro lado, el Al se correlacionó positivamente con el Zn y Mn. El Na se correlacionó positivamente con el Cu, Ca y K, y Zn se correlacionó positivamente con Mn, Ba, Al y K (cabe señalar que la relación de Zn y Al puede estar condicionada por el valor excesivo obtenido de Al).

El Ca se correlacionó positivamente con el Cu y Na, y negativamente con Fe. Esta asociación negativa indica que cuando aumenta el contenido de Pb, disminuye el contenido de Ca, esto se debe a que el Pb interfiere en el metabolismo del Ca ya

que son químicamente similares y el Pb actúa desplazando al Ca. Ni no mostró correlaciones significativas con ningún metal (Figura 6).



**Figura 6.** Correlación entre a) K-Fe, b) Na-K, y c) Ca-Fe



#### 7.4. Ovocitos

Todas las pacientes tenían ovocitos maduros ( $n=91$ ), a excepción de dos participantes. El número de ovocitos maduros osciló entre uno y treinta y tres, con una media de nueve ovocitos por punción/paciente (5;13).

Se observó una relación inversa entre el número de ovocitos y la edad de las participantes ( $r = -0.353$ ;  $p = 0.001$ ), y no se evidenció una correlación entre el número de ovocitos maduros y la TF.

La relación entre el número de ovocitos y los metales ha sido la siguiente: con el Fe ( $r_s = 0.303$ ;  $p = 0.003$ ) y el Ca ( $r_s = -0.276$ ;  $p = 0.007$ ) fue significativa, y con el Al ( $r_s = -0.195$ ;  $p = 0.061$ ) y el Na ( $r_s = -0.174$ ;  $p = 0.095$ ) fue próxima a la significación.

La relación entre algunos metales con el número de ovocitos maduros fue significativa: con el Fe ( $r_s = 0.319$ ;  $p = 0.002$ ), Ca ( $r_s = -0.307$ ;  $p = 0.003$ ) y Na ( $r_s = -0.215$ ;  $p = 0.039$ ) y próximo a la significación con el Al ( $r_s = -0.198$ ;  $p = 0.057$ ).

#### 7.5. Tasa de fertilización

La TF se calculó sobre 91 intervenciones, al haber 2 pacientes sin ovocitos maduros. La TF media fue de 76.5% (52.6; 92.3). Veintidós participantes (23%) presentaron una TF del 100% y ocho (8.8%) tuvieron menos de 33%, con cuatro mujeres con un fracaso de fertilización, TF de 0% (4.4%).

La diferencia media entre los ovocitos maduros y la fertilización ovocitaria era de 1 (0; 3), con una variación entre 0 y 12 (Tabla 5).

**Table 5.** Características y niveles de metal en relación con la TF

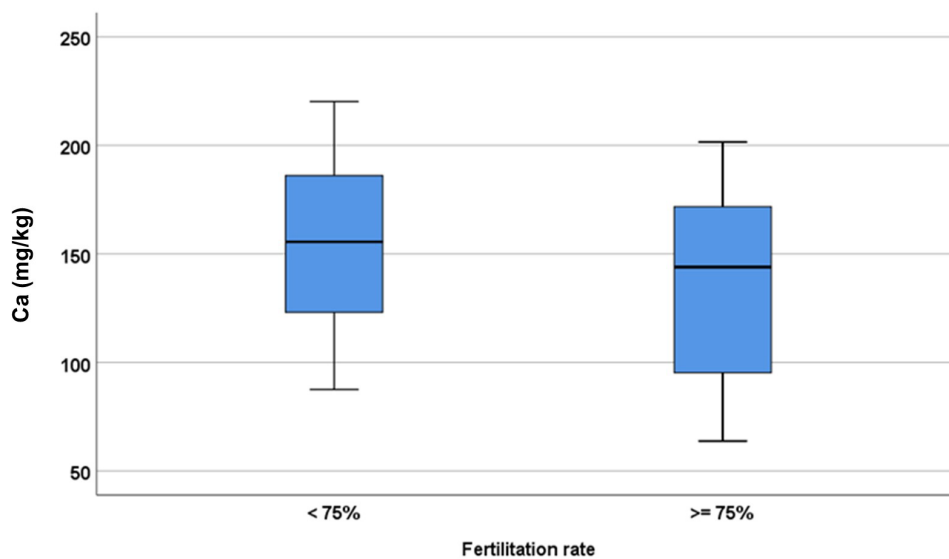
	TF		<i>p</i> -valor
	< 75% (N = 40)	≥ 75% (N = 51)	
Mujer			
Edad (años)	35.7 ± 4.6	36.1 ± 3.4	0.641
Peso (kg)	65.9 ± 9.4	64.8 ± 9.6	0.580
Altura (m)	1.64 ± 0.08	1.63 ± 0.07	0.467

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 ± 3.4	24.5 ± 3.3	0.861
IMC n (%)			0.588
Bajo/normal	23 (58)	26 (52)	
Sobrepeso	14 (35)	22 (44)	
Obeso	3 (7)	2 (4)	
Varón			
Edad (años)	39.5 ± 6.2	37.3 ± 4.3	0.092
Peso (kg)	87.0 ± 12.5	83.4 ± 14.5	0.279
Altura (m)	1.76 ± 0.05	1.76 ± 0.06	0.877
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.1 ± 4.1	26.9 ± 4.4	0.268
Espermiograma			0.674
Normal	24 (60)	28 (55)	
Patológico	16 (40)	23 (45)	
Técnica			0.002
FIV	7 (18)	-	
ICSI	33 (82)	51 (100)	
Metales			
Metales esenciales, n (%)			
Cu	34 (85)	49 (96)	0.132
Fe	37 (93)	49 (96)	0.651
Zn	34 (85)	49 (96)	0.132
Mn	20 (50)	37 (73)	0.031
Cu (mg/kg)	0.89 ± 0.31	0.88 ± 0.29	0.934
Fe (mg/kg)	15.17 ± 14.67	16.21 ± 13.49	0.734
Fe (mg/kg)*	10.0 (7.9; 18.6)	12.2 (7.9; 18.6)	0.390
Zn (mg/kg)	1.13 ± 0.43	1.14 ± 0.37	0.862
Mn (mg/kg)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.607
Metales no esenciales, n (%)			
Ba	4 (10)	7 (14)	0.588
Al	28 (70)	36 (71)	0.951
N	5 (13)	6 (12)	0.915
Pb	1 (3)	1 (2)	0.862

Sr	1 (3)	-	0.440
Ba (mg/kg)	0.10 ± 0.10	0.04 ± 0.03	0.258
Al (mg/kg)	0.67 ± 0.91	0.65 ± 0.39	0.910
Al (mg/kg)*	0.47 (0.30; 0.99)	0.61 (0.32; 0.87)	0.291
Ni (mg/kg)	0.40 ± 0.58	0.23 ± 0.24	0.541
Macroelementos, n (%)			
Ca	34 (85)	49 (96)	0.132
K	35 (87)	49 (96)	0.233
Mg	5 (13)	5 (10)	0.744
Na	39 (98)	49 (96)	0.706
Ca (mg/kg)	153.8 ± 40.9	135.7 ± 39.3	0.048
K (mg/kg)	331.0 ± 103.8	333.7 ± 131.2	0.921
Mg (mg/kg)	67.3 ± 5.4	70.3 ± 8.2	0.527
Na (mg/kg)	4473 ± 917	4567 ± 1537	0.735

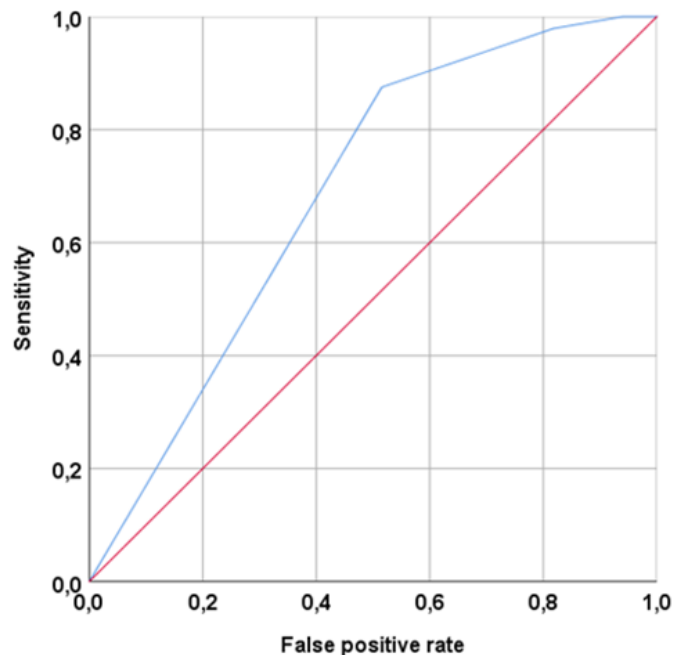
\*Media (Rango Intercuartil)

Si se usa el punto de corte de acuerdo con el índice de Youden  $\leq 176.62$  se obtiene ( $p$ -valor = 0.011). Así, los niveles de Ca superiores a 176.62 mg/kg disminuyen la TF (Figura 7).



**Figura 7.** Tasa de fertilización y niveles de Ca

Esto es, si  $p$  = probabilidad de tener una  $TF \geq 75\%$  luego  $\ln p(1-p) = -1.495 + 2.406 * (\text{si la técnica=ICSI}) - 1.630 * (\text{si Ca} > 176.6 \text{ mg/kg})$ . El AUROC de este modelo era 0.687 (95% CI 0.564; 0.810;  $p = 0.004$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Curva ROC para la  $TF \geq 75\%$

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Líquido folicular

El LF es el fluido que rodea al ovocito en el interior del folículo ovárico, y puede analizarse para evaluar el contenido de metales, así como para determinar la posible exposición a elementos tóxicos en mujeres que desean someterse a TRA (17). Butts et al. (21), estiman que "en comparación con las muestras de sangre y orina, el LF proporciona una mejor estimación de las exposiciones que podrían afectar a los resultados reproductivos, ya que refleja más fielmente el microambiente que rodea al ovocito en desarrollo", siendo un biomarcador razonable del ambiente folicular local (22).

Sin embargo, algunos autores (23), han detectado variabilidad en los niveles de metales entre distintos folículos de una misma mujer y, además, Freitas

et al. (11), encontraron que las concentraciones de elementos en folículos pequeños diferían frecuentemente de las de folículos grandes. Para evitar este problema, en el presente estudio se unió el LF de varios folículos y se midió el nivel medio del total del LF.

## 8.2. Metales

Los metales esenciales (Cu, Fe, Zn) estaban presentes en todas las muestras de LF analizadas, a excepción del Mn (62%). En cambio, los metales no esenciales (Ba, Ni, Pb, Sr) fueron menos frecuentes, como era de esperar, al no haber exposición ambiental ni laboral, excepto el Al (70%) presente en un mayor número de participantes. Por otro lado, el Co, Mo, Cr, B, Cd, Li y V no se detectaron, pero podría ser debido a estar por debajo del límite de detección del aparato (ICP-OES). Y, por último, los macroelementos (Ca, K, Na), salvo el Mg (11%), estaban presentes en la mayoría de las muestras de LF.

El llevar a cabo una comparación adecuada de la concentración de metales en el LF con otros autores es extremadamente difícil, no sólo por los diferentes métodos de detección, sino también, por las distintas unidades utilizadas: mg/l (22, 17), o µg/L (14, 21, 24, 22).

Algunos autores observaron que el contenido de metales en el LF era inconsistente, y que la mayoría de ellos eran más bajos en el LF que en el suero, a excepción del Cr, Mn, Ni y Pb (24). Además, en el presente estudio se observó una baja presencia de metales, salvo los macroelementos Ca, K, Mg y Na, y el Fe. Estos datos podrían sugerir un posible papel protector de la pared folicular, frente a ciertas toxinas. Sin embargo, Wu et al. (25), observaron que la mayoría de los elementos como Cr, Ni, Cd y Pb fueron altamente detectados (71.8-100%), aunque el Cr tuvo una tasa de detección del 66.0%.

En cuanto a estos metales, en el presente estudio no se detectaron Cr ni Cd, y el Ni (12%) y el Pb (2%) fueron muy bajos, y no se encontraron cantidades significativas de Pb en el LF de los pacientes estudiados, lo que puede estar directamente relacionado con el hecho de que el entorno en el que viven los pacientes son islas con un bajo nivel de industrialización y contaminación y, además, las mujeres participantes en este estudio no refirieron exposición ambiental ni laboral.

Respecto a la correlación entre los metales estudiados, Niehoff et al. (23), hallaron una correlación fuerte entre Fe y Mn, hecho que no hemos podido corroborar en el presente estudio. Y, aunque la mayoría de los autores han estudiado la relación entre elementos tóxicos como Cd, Se, Hg, Pb o As, nosotros no hemos detectado estos metales en el presente trabajo, por lo que no se pudo analizar esta correlación. Por otro lado, las que hemos encontrado, no fueron halladas por otros autores.

### **8.3. Asociación entre metales y aspectos reproductivos**

Existen pocas publicaciones sobre la acción de los MP en la TF y su influencia en la TRA, no obstante, varios estudios han demostrado que la exposición crónica a metales puede afectar al desarrollo embrionario (7, 19), mientras que, en el caso del Cu, Cd, Pb, Zn y Fe, algunos autores no encontraron ninguna relación (26), o informaron de un impacto negativo (5). Sin embargo, en el presente estudio hemos observado la influencia del Fe, Ca, Na y Al en los resultados de los ovocitos y en la TF.

Obasi et al. (8), en su metaanálisis, encontró varios estudios en los que habían investigado las asociaciones entre MP y metaloides en el LF y los resultados en la FIV, así, Bloom et al. (18), en un estudio realizado en 46 mujeres sometidas a FIV objetivaron una relación inversa entre la concentración de Pb en el FF y la TF, e Ingle et al. (19), descubrieron una correlación negativa entre los niveles de Cr y Mn en la TF y la proporción de ovocitos maduros.

### **8.4. Asociación entre Fe, ovocitos y TF**

Uno de los componentes clave del LF es el Fe. Este es un mineral esencial que juega un papel crucial en muchos procesos fisiológicos, incluido el transporte de oxígeno, la producción de energía y la síntesis de ADN.

La mayor parte del Fe en el ovario se va a almacenar como ferritina, una proteína transportadora que se une específicamente al Fe y lo secuestra. Durante el desarrollo del folículo, el Fe se libera de la ferritina y se transporta al LF, donde el ovocito en desarrollo lo absorbe y lo utiliza para varios procesos metabólicos. El Fe es necesario para la síntesis y reparación adecuadas del ADN, así como para la producción de energía en el ovocito y, además, tiene propiedades antioxidantes que protegen al ovocito en desarrollo de EO, de tal manera que el Fe folicular se correlacionó con los niveles de ROS (27).

El Fe favorece la ovulación, interviene en la implantación del óvulo fecundado y reduce el riesgo de desarrollar complicaciones al inicio del embarazo, y los niveles de Fe en el LF se correlacionan con los resultados de fertilidad, las mujeres con niveles más altos de Fe tienen tasas más altas de fertilización. Además, las mujeres con anemia por deficiencia de hierro pueden tener una fertilidad reducida debido a las interrupciones en la ovulación y los ciclos menstruales. Por ello, se ha valorado en usar suplementos de Fe para mejorar la fertilidad en mujeres con niveles bajos. Si bien algunos estudios han demostrado un beneficio de la suplementación con hierro, otros no han encontrado mejoras significativas en los resultados de fertilidad. Se necesita más estudios para determinar la dosis y el momento óptimos de la administración de suplementos de Fe con fines de fertilidad. (28).

Cabe mencionar que, en los resultados del presente estudio, hubo una relación inversa entre Ca y Fe, y que unas concentraciones más bajas de Ca se relacionaron con una mayor concentración de Fe y con una mejoría en el número de ovocitos y de ovocitos maduros.

### **8.5. Asociación entre Ca, ovocitos y TF**

El Ca es un mineral esencial que juega un papel crucial en varios procesos fisiológicos, incluida la foliculogénesis. El LF contiene varios componentes importantes, entre los que se encuentra el Ca, en este sentido, es bien conocido el importante papel que presenta en la maduración de los ovocitos y en la fecundación.

Para la homeostasis del Ca, el contenido intracelular se almacena en el retículo endoplásmico/sarcoplásmico (RE/RS). El Ca extracelular también es importante para las proteínas implicadas en la señalización y el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los ovocitos y embriones humanos tienen un sistema perfectamente organizado y diversificado de secuestro y liberación de Ca (29), en el que el Ca es esencial para desencadenar la activación del ovocito.

Los niveles bajos de Ca se han asociado con la mala calidad de los ovocitos, la disminución de las TF y la disminución de la calidad del embrión, mientras que los niveles altos se han relacionado con un aumento del EO y la apoptosis (30). Así, en el presente estudio se muestra que una concentración elevada de Ca en el LF por encima de 176.6 mg/kg, afecta significativamente a la TF, apuntando de

alguna manera a un desequilibrio en la homeostasis del Ca cuando se superan los niveles de Ca extracelular en el LF durante la maduración ovocitaria.

### **8.6. Asociación entre Na, ovocitos y TF**

El Na es un elemento esencial en el cuerpo humano y juega un papel crucial en diversos procesos fisiológicos, como la regulación del equilibrio de líquidos.

La concentración de Na en el LF está influida por varios factores, incluidos los cambios hormonales y la ingesta dietética. La concentración de Na en el LF está estrictamente regulada y varía según la etapa de desarrollo folicular, así es más alta durante las primeras etapas del desarrollo folicular y disminuye a medida que el folículo madura, los niveles altos de estrógeno aumentan la concentración de sodio en el LF, mientras que los niveles bajos de estrógeno tienen el efecto contrario (31).

En el presente trabajo hemos hallado una relación estadísticamente significativa entre el Na y el número de ovocitos maduros. Una posible explicación de este efecto es que los altos niveles de Na pueden provocar EO, lo que puede dañar el ovocito en desarrollo. Además, los altos niveles de Na pueden alterar el equilibrio de otros nutrientes y factores de crecimiento en el LF, que son necesarios para el desarrollo adecuado de los ovocitos (31). Habría que realizar estudios para valorar si las intervenciones dietéticas destinadas a reducir la ingesta de Na podrían ser beneficiosas para las mujeres que se someten a un tratamiento de reproducción.

### **8.7. Asociación entre Al, ovocitos y TF**

El Al esta de manera omnipresente en nuestro entorno y se puede encontrar en diversas fuentes, como alimentos, agua, cosméticos y medicamentos. La principal ruta de exposición es a través de la ingestión, pero también puede ser absorbido a través de la piel y el sistema respiratorio.

El uso de productos que contienen Al ha aumentado a lo largo de los años, y se encuentra en materias primas para la aplicación de cosméticos debido a su actividad cicatrizante, hidratante, de dispersión de pigmentos y de absorción de melanina, y también está presente en la arcilla, pero especialmente en la arcilla blanca utilizada en cosmética. El Al puede tener efectos tóxicos cuando alcanza el sistema circulatorio y se acumula en diferentes órganos (32), esto explicaría su



presencia en más del 70% de las mujeres aquí estudiadas, que no refirieron ninguna exposición ambiental. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que puede acumularse en el sistema reproductivo femenino y estar presente en el LF (32).

El Al interfiere en varios procesos celulares, incluida la síntesis y reparación de ADN, el estrés oxidativo y la apoptosis. Su presencia en el LF puede afectar la calidad de los ovocitos y, en última instancia, a la fertilidad y los resultados del embarazo. En el presente trabajo hemos encontrado una relación entre el Al y un menor número de ovocitos obtenidos, aunque con una tendencia no significativa.

## 9. CONCLUSIONES

- La concentración media de metales fue mayor para los metales macroelementos Na, K y Ca. Le siguen los metales esenciales Fe, Zn, Cu y Mn, y se detectaron los metales no esenciales Ba y Al.
- Bajos niveles de Cu, Zn, y Al favorecen el OPQ.
- Existe una relación entre el número de ovocitos con el Fe y el Ca, y con el Al y el Na fue próxima a la significación.
- Hay una relación positiva entre el Fe, Na, y Ca, y el número de ovocitos maduros, y próxima a la significación con el Al.
- Las mujeres con una concentración elevada de Ca en el LF por encima de 176,6 mg/kg, tienen una mayor probabilidad de tener una tasa de fertilización inferior al 75%.
- Hemos podido establecer el perfil de pacientes con buenos resultados en los ciclos de TRA: Las tasas de fertilización más altas se obtienen cuando los niveles de Ca son más bajos en el LF.

## **10. ¿QUÉ HE APRENDIDO DURANTE ESTE TFG?**

1. Manejo de catálogos en línea (PubMed), bases de datos, recursos de las bibliotecas como el Punto Q ULL, e Internet con la posterior evaluación y selección de dicha información.
2. Uso de las citas y las referencias bibliográficas según normas de Vancouver.
3. La elaboración de bases de datos (Excel) que permitan el acceso a información actualizada y precisa, asegurando la disponibilidad, confidencialidad e integridad de los datos almacenados.
4. La utilización de dichas bases de datos para obtener resultados estadísticos, así como la interpretación de estos de forma adecuada.
5. He ampliado mis conocimientos sobre la esterilidad, diagnóstico de esterilidad, las TRA, indicaciones del espermograma y estudio de metales en semen.
6. Ha servido como un primer contacto con la actividad investigadora básica en la Medicina.
7. Trabajo en equipo.

## **11. AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores, el Prof. Dr. Arturo Hardisson y la Prof. Dra. Rubí Rodríguez Díaz por su implicación en el desarrollo del presente trabajo, su dedicación y por solucionarme todas las dudas.

A la Dra. Raquel Blanes Zamora por la recogida de datos de las TRA, por su trabajo en el laboratorio de FIV y su participación en el presente trabajo, así como a los miembros de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario de Canarias.

Al Área de Toxicología de la ULL, en especial al Prof. Dr. Arturo Hardisson y a la Prof. Dra. Soraya Paz, por la determinación de los metales y su colaboración en el desarrollo del trabajo.

Al Prof. Dr. Enrique Francisco González Dávila, por su entrega, por el asesoramiento del análisis estadístico de los datos e interpretación de estos, por su disponibilidad en todo momento y por su gran colaboración.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Skakkebaek N, Lindahl-Jacobsen R, Levine H, Andersson A, Jørgensen N, Main K et al. Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 Mar; 18 (3): 139–157. <https://doi.org/accedys2.bbtck.ull.es/10.1038/s41574-021-00598-8>.
- 2.- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018 Dec; 62:2–10. <https://doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>.
- 3.- Sadecki E, Weaver A, Zhao Y, Stewart EA, Ainsworth AJ. Fertility trends and comparisons in a historical cohort of US women with primary infertility. *Reprod Health.* 2022 Jan 18;19(1):13. [https://doi: 10.1186/s12978-021-01313-6](https://doi:10.1186/s12978-021-01313-6).
- 4- Li D, Liang C, Cao Y, Zhu D, Shen L, Zhang Z et al. The associations of serum metals concentrations with the intermediate and pregnancy outcomes in women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Mar 15; 233:113309. [https://doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113309](https://doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113309).
- 5.- Tolunay HE, Şükür YE, Ozkavukcu S, Seval MM, Ateş C, Türksoy VA et al. Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Mar; 198:73-77. [https://doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.01.001](https://doi:10.1016/j.ejogrb.2016.01.001).
- 6.- Canipari R, De Santis L, Cecconi S. Female Fertility and Environmental Pollution. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Nov 26;17(23):8802. <https://doi:10.3390/ijerph17238802>.
- 7.- Jiang T, Hu Y, He S, Jiang R, Yao Y, Jin Z et al. Exposure to multiple toxic metals and the risk of early embryonic arrest among women undergoing assisted reproductive techniques. *Environ Res.* 2022 Aug; 211:113072. <https://doi:10.1016/j.envres.2022.113072>.

8.- Obasi CN, Frazzoli C, Orisakwe OE. Heavy metals and metalloids exposure and *in vitro* fertilization: Critical concerns in human reproductive medicine. *Front Reprod Health*. 2022 Nov 21; 4:1037379. <https://doi.org/10.3389/frph.2022.1037379>.

9.- Nieder R, Benbi DK, Reichl FX Macro- and Secondary Elements and Their Role in Human Health. In: *Soil Components and Human Health*. 2018. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1222-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1222-2_6).

10.- Nandi P, Banerjee S K, Basu S, Das M C, Dasgupta P, Varghese A C. A preliminary study on heavy metals (Lead, Cadmium and Arsenic) in follicular fluid and its effect on oocyte, embryo quality and outcome of IVF treatment. *Fertility and Sterility*. 2011 Sept; <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.609>.

11.- Freitas C, Neto AC, Matos L, Silva E, Ribeiro Â, Silva-Carvalho JL et al. Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res*. 2017 Jul 12;10(1):44. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0342-3>.

12.- Sun Y, Wang W, Guo Y, Zheng B, Li H, Chen J, Zhang W. High copper levels in follicular fluid affect follicle development in polycystic ovary syndrome patients: Population-based and *in vitro* studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019; 365: 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.008>.

13.- Siu M, Cheng C. The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 763:186-92. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4711-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4711-5_9).

14.- Galusha A, Haig A, Bloom M, Kruger P, McGough A, Lenhart N, Wong R, Fujimoto Y, Mok-Lind E, Parsons P. Ultra-trace element analysis of human follicular fluid by ICP-MS/MS: pre-analytical challenges, contamination control, and matrix effects. *J. Anal. At. Spectrom*. 2019; 34: 741. <https://doi.org/10.1039/C8JA00423D>.

15.- Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, Benian A. Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: Are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur*

- J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004; 10;115(2):194-9.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262355>.
- 16.- Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The Oocyte. Human Reproduction. 2012; 27, 1: i2– i21. <https://doi:10.1093/humrep/des200>.
- 17.- Kumar S, Mishra VV. Review: Toxins in reproductive fluid and in vitro fertilization (IVF) outcome. Toxicol Ind Health. 2010; 26: 505–11.  
<https://doi.org/10.1177/0748233710373081>.
- 18.- Bloom MS, Fujimoto VY, Steuerwald AJ, Cheng G. Background exposure to toxic metals in women adversely influences pregnancy during in vitro fertilization (IVF). Reprod Toxicol. 2012; 34:471–81.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732149>.
- 19- Ingle M, Bloom M, Parsons P, Steuerwald A, Kruger P, and Fujimoto V. Associations between IVF outcomes and essential trace elements measured in follicular fluid and urine: a pilot study. J Assist Reprod Genet. 2017; 34(2): 253–261. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27943108>.
- 20.- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology. 2011; 283(2-3):65–87. <https://doi:10.1016/j.tox.2011.03.001>.
- 21.- Butts C, Bloom M, McGough A, Lenhart N, Wong R, Mok-Lin E, Parsons P, Galusha A, Yucel R, Feingold B, Browne R, Fujimoto V. Variability of essential and non-essential trace elements in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021; 209: 111733. <https://doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111733>.
- 22.- El Mohr M, Faris M, Bakry S, Hozyen H, Elshaer F. Effect of Heavy Metals Levels In Follicular Fluid on ICSI Outcome. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. (C. Physiology and Molecular Biology). 2020; 12(2): 87-95.  
<https://doi:10.21608/eajbsc.2020.125100>.
- 23.- Niehoff N, Keil A, O'Brien K, Jackson B, Karagas M, Weinberg C, White A. Metals and trace elements in relation to body mass index in a prospective study of US women. Environ Res 2020; 184:109396. <https://doi:10.1016/j.envres.2020.109396>.

- 24.- Zhou L, Liang K, Li M, Rong C, Zheng J, Li J. Metal elements associated with in vitro fertilization (IVF) outcomes in 195 couples. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2021; 68: 126810. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126810>.
- 25.- Wu S, Wang M, Deng Y, Qiu J, Zhang X, Tan J. Associations of toxic and essential trace elements in serum, follicular fluid, and seminal plasma with In vitro fertilization outcomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020; 204: 110965. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110965>.
- 26.- Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I. Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2018; 25(2): 213–218. <https://doi.org/10.26444/aaem/75422>
- 27- Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol*. 2013; 42: 116–24. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.005>.
28. González-Rodríguez LG, López-Sobaler AM, Perea Sánchez JM, Ortega RM. Nutrición y fertilidad. *Nutr Hosp*. 2018; 35 (N.º Extra. 6):7-10 <http://doi.org/10.20960/nh.2279>.
- 29.- Wakai T, Mehregan A, Fissore R. Ca<sup>2+</sup> Signaling and Homeostasis in Mammalian Oocytes and Eggs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019; 11: a035162. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035162>.
- 30.- Meng L, Hu H, Liu Z, Zhang L, Zhuan Q, Li X, Fu X, Zhu S, Hou Y. The Role of Ca<sup>2+</sup> in Maturation and Reprogramming of Bovine Oocytes: A System Study of Low-Calcium Model. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 26;9: 746237. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.746237>.
- 31.- Rodriguez-Giustiniani P, Rodriguez-Sanchez N, Galloway. Fluid and electrolyte balance considerations for female athletes, *European Journal of Sport Science*. 2022; 22:5, 697-708, <https://doi.org/10.1080/17461391.2021.1939428>.
- 32.- Wargala E, Sławska M, Zalewska, A, Toporowska M. Health Effects of Dyes, Minerals, and Vitamins Used in Cosmetics. *Women*. 2021; 1, 223–237. <https://doi.org/10.3390/women1040020>.

### **13. ANEXOS**

#### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE (1ª versión 19 de julio de 2018)**

**TÍTULO DEL ESTUDIO: “ESTUDIO DE LA CALIDAD OVOCITARIA, EMBRIONARIA Y TASA DE FERTILIZACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE METALES EN LÍQUIDO FOLICULAR”**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz, Unidad de Reproducción, Edificio Actividades Ambulatorias Hospital Universitario de Canarias, Ginecología 2ª planta, consulta número 11. (Teléfono 922678735). CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CANARIAS**

#### **INTRODUCCION**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación correspondiente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier

momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

**DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:** Que conoce y acepta participar en el Estudio (código del protocolo):

“ESTUDIO DE LA CALIDAD OVOCITARIA, EMBRIONARIA Y TASA DE FERTILIZACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE METALES EN LÍQUIDO FOLICULAR”

Se realizará la determinación de metales en una muestra de líquido folicular, y se comparará con los resultados de la Fertilización in vitro (FIV). La finalidad es relacionar los resultados de la FIV con la presencia de metales, para valorar la influencia en los mismos. Los inconvenientes vienen derivados del tratamiento de reproducción y de la punción de FIV a la que usted se va a someter como parte de su tratamiento reproductivo, no suponiendo ningún riesgo añadido para la paciente. El líquido folicular que se obtiene en la punción de FIV y que normalmente se deshecha, en este caso será sometido a un análisis de metales. La paciente no va a obtener beneficio directo por su participación en el estudio, sino que contribuirá a ampliar los conocimientos en este campo de investigación. Se realizará un total de 150 pacientes con esterilidad y comenzará en septiembre de 2018 y terminará en marzo de 2019.

El investigador principal será la Dra.: Rubí Nieves Rodríguez Díaz,

Que se compromete a que cada sujeto sea tratado y controlado siguiendo lo establecido en el protocolo autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica.

Que respetará las normas éticas aplicables a este tipo de estudios.

Que dicho estudio se llevará a cabo contando con la colaboración de: Dr. Arturo Hardisson de la Torre y Dra. Raquel Blanes Zamora, como investigadores colaboradores.



## CONFIDENCIALIDAD

Con la aplicación de la nueva legislación en la Unión Europea (UE) sobre datos personales, en concreto el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y

del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD), es importante que conozca la siguiente información:

- Además de los derechos que ya conoce (acceso, modificación, oposición y cancelación de datos) ahora también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio. Le recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales y los requisitos de autorización de medicamentos. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

- Tanto el Centro como el Promotor y el Investigador son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

*Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar al/ a la Delegado de Protección de Datos del Promotor.*

## **INFORMACIÓN ADICIONAL**

Tal y como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de consentimiento informado.

El investigador principal de este estudio en este centro es la Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz.

Si durante la realización de este estudio le surge alguna cuestión relacionada con él puede consultar con la Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario de Canarias

\*\* Nota aclaratoria: en este documento aparecen en letra normal los aspectos que quedan fijos para todos los estudios, y en cursiva los aspectos variables dependiendo de las características del estudio, pero que deben obligatoriamente cumplimentarse.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (nombre y apellidos

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

La Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

**Firma del paciente:**

**Nombre:**

**Fecha:**

**Firma del investigador:**

**Nombre: Dra. Rubí**

**Rodríguez Díaz**

**Fecha:**

#### **14. PUBLICACIONES.**



## FOLLICULAR FLUID METALS. INFLUENCE ON EMBRYO DEVELOPMENT OUTCOME

Sonsoles Rodríguez Fiestas<sup>1\*</sup>, Rubí Rodríguez-Díaz<sup>1,2</sup>, Cintia Concepción-Lorenzo<sup>1</sup>, Soraya Paz-Montelongo<sup>3</sup>, Jorge Gómez-Rodríguez<sup>2</sup>, Raquel Blanes-Zamora<sup>1</sup>, Dailos González-Weller<sup>3</sup>, Carmen Rubio<sup>3</sup>, Arturo Hardisson<sup>3</sup>, Daniel Niebla-Canelo<sup>3</sup>, Samuel Alejandro Vega<sup>3</sup>, Enrique González-Dávila<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Human Reproduction Unit, Hospital Universitario de Canarias. <sup>2</sup>Obstetrics and Gynecology, <sup>3</sup>Toxicology, <sup>4</sup>Mathematics, Statistics and Operations Research. IMAULL. Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain.

**INTRODUCTION.** Metal environmental exposure associated with a toxic effect may increase reproductive disorders in patients undergoing assisted reproductive techniques (ART). Toxic metal exposure increases the content of reactive oxygen species (ROS) in the human body and eventually induces a series of oxidative damage processes, this disturbs the antioxidant defence system, promoting oxidative stress (OS), necrosis, and apoptosis. Their accumulation in reproductive tissues corroborates the possibility of their procreative toxicity. It is associated with oocyte maturation, ovulation, and fertilisation, and therefore, ART are affected. Although there are few publications about the action of HM in FF and their influence on ART, several studies have shown that chronic metal exposure can affect not only the oocyte, but later the embryo development. The presence and levels of some heavy metals (HM) in the follicular fluid (FF) could have an influence in fertility outcome in ART patients.

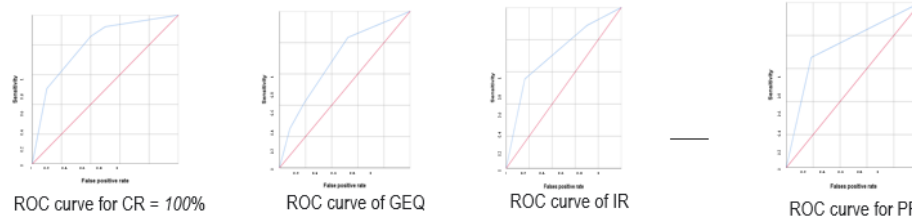
**MATERIAL AND METHODS.** A prospective study was performed between February 2019 and December 2020, in which a metal detection in FF of ninety-three women undergoing ART procedure were carried out. The participant underwent a puncture and aspiration of the ovarian follicles for oocyte extraction and for the analysis of FF metals. The levels of twenty-two metals were measured and their influence on ART (IVF/ICSI) outcomes were evaluated, related to cleavage rate, embryo quality, implantation, and pregnancy rates. The female participants were between twenty and forty-two years of age and they were all living in the Canary Islands, Spain. The mean age of the patients was  $36.0 \pm 3.9$  years, and the body mass index (BMI) was  $24.7 \pm 3.3$  kg/m<sup>2</sup>. A controlled ovarian stimulation was performed, and the follicles were picked up for oocyte extraction and for the analysis of metals in the FF by optical emission spectrophotometry.

**RESULTS.** Mean concentration (mg/Kg) was highest for the macroelement metals: sodium (Na) ( $4550.45 \pm 1299.24$ ), potassium (K) ( $332.47 \pm 118.73$ ), and calcium (Ca) ( $148.51 \pm 49.24$ ). Followed by essential metals as iron (Fe) ( $15.48 \pm 13.89$ ), zinc (Zn) ( $1.14 \pm 0.39$ ), copper (Cu) ( $0.88 \pm 0.30$ ), and manganese (Mn) ( $0.04 \pm 0.01$ ). The non-essential metals barium (Ba) ( $0.06 \pm 0.07$ ), and aluminium (Al) ( $0.66 \pm 0.66$ ), were also detected. If  $Fe \leq 7.525$ ,  $Cu \leq 1.04$  and  $Al > 0.31$  are presented with a value lower than that described, they are more likely to reach 100% CR. The AUROC was 0.799 (95% CI 0.648; 0.951;  $p = 0.002$ ). An excess of Cu and Al are harmful. The logistic regression model indicates that an excess of Fe ( $>10.043$  mg/kg) and Ca ( $>93.725$  mg/kg) would reduce the good embryo quality rate to less than 66.6%. Following the Youden index, high Ca ( $>170.335, 94$  mg/kg) and K ( $>304.7466$  mg/Kg) levels and the presence of Mn ( $>0.035$  mg/Kg) impaired blastocyst rate. The model AUROC determined that high K ( $>237.18$  mg/Kg) and low Ca ( $\leq 147.32$  mg/Kg) levels improved implantation rate. A positive correlation between the concentration of K above 237.18 mg/Kg and the improvement of pregnancy rate was found.

Table 2 Metal content in follicular fluid

Metals n (%)	N > LOQ	% >LOQ	mg/kg
<b>Essential metals</b>			
Cu	85	92.39	$0.88 \pm 0.30$
Fe	88	95.65	$15.48 \pm 13.89$
Fe*	—	—	$11.2 (7.0;17.8)$
Zn	85	92.39	$1.14 \pm 0.39$
Mn	58	63.04	$0.04 \pm 0.01$
<b>Non-essential metals</b>			
Ba	11	11.96	$0.06 \pm 0.07$
Al	65	70.65	$0.66 \pm 0.66$
Al*	—	—	$0.50 (0.32;0.80)$
Ni	11	11.96	$0.31 \pm 0.41$
Pb	2	2.17	—
Sr	1	1.09	—
<b>Macroelements</b>			
Ca	85	92.39	$148.51 \pm 49.24$
K	86	93.48	$332.47 \pm 118.73$
Mg	10	10.87	$68.80 \pm 6.75$
Na	90	97.83	$4550.45 \pm 1299.24$

\*Median (interquartile range)



**CONCLUSIONS.** An excess of Fe and Ca reduces the good quality embryo rate, and an excess of K impairs the blastocyst rate. Pregnancy is influenced by high K and low Cu levels. Controlling exposure to toxic elements is recommended for all couples with different aetiologies evolved in ART treatments.



## The Influence of Follicular Fluid Metals on Assisted Reproduction Outcome

Rubí Rodríguez-Díaz<sup>1,2</sup> · Raquel Blanes-Zamora<sup>1,2</sup> · Soraya Paz-Montelongo<sup>3</sup> · Jorge Gómez-Rodríguez<sup>2</sup> · Sonsoles Rodríguez Fiestas<sup>1,2</sup> · Dailos González-Weller<sup>3</sup> · Ángel J. Gutiérrez<sup>3</sup> · Carmen Rubio<sup>3</sup> · Arturo Hardisson<sup>3</sup> · Daniel Niebla-Canelo<sup>3</sup> · Samuel Alejandro Vega<sup>3</sup> · Enrique González-Dávila<sup>4</sup>

Received: 3 November 2022 / Accepted: 18 January 2023  
© The Author(s) 2023

### Abstract

Infertility has become more common, with an increased exposure to toxic compounds including heavy metals (HM). Follicular fluid (FF) surrounds the developing oocyte in the ovary and can be analysed to assess metal content. The levels of twenty-two metals were measured in the FF of ninety-three females in a reproduction unit, and their influence on assisted reproduction technique (ART), were examined. The metals were determined by optical emission spectrophotometry. Low values of copper, zinc, aluminium, and calcium favour polycystic ovary syndrome. The relationships between the number of oocytes and metals: iron ( $r_s=0.303$ ;  $p=0.003$ ) and calcium ( $r_s=-0.276$ ;  $p=0.007$ ) are significant, as well as between the number of mature oocytes with iron ( $r_s=0.319$ ;  $p=0.002$ ), calcium ( $r_s=-0.307$ ;  $p=0.003$ ) and sodium ( $r_s=-0.215$ ;  $p=0.039$ ) and are near to significance in the case of aluminium ( $r_s=-0.198$ ;  $p=0.057$ ). In the group with a fertilisation rate  $\leq 75\%$ , 36% of the women presented calcium  $> 176.62$  mg/kg compared to the group with a fertilisation rate  $\geq 75\%$  where this percentage was only 10% ( $p=0.011$ ). An excess of iron and calcium reduces the good quality embryo rate, and an excess of potassium impairs the blastocyst rate. If potassium is above 237.18 mg/kg and calcium is below 147.32 mg/kg, these conditions favour embryo implantation. Pregnancy is influenced by high potassium and low copper levels. Controlling exposure to toxic elements is recommended for all couples with reduced fertility or receiving an ART.

**Keywords** Metal · Follicular fluid · ART · Embryo quality · Pregnancy · Polycystic ovary syndrome

### Introduction

Fertility is currently decreasing, and reproductive disorders are affecting a growing number of couples [1]. One of the factors that may be responsible is toxic metal environmental contamination leading to the detection of the negative effects of some toxins such as heavy metals (HM) [2]. Their accumulation in reproductive tissues corroborates the possibility

of their procreative toxicity [3], and the worst consequences are observed in females, since the number of germ cells present in the ovary is fixed during foetal life which are not renewable [4], and this decreases over time.

The following are the main mechanisms of HM toxicity: generation of free radicals causing oxidative stress (OS) in body cells through lipid membrane disintegration [5], and damage of biological molecules such as enzymes, proteins, lipids, and nucleic acids, and to DNA [6]. Toxic metal exposure increases the content of reactive oxygen species (ROS) in the human body and eventually induces a series of oxidative damage processes [7], this disturbs the antioxidant defence system, thus promoting OS, necrosis, and apoptosis [8]. HM can bind to oestrogen receptors and may interfere with hormone signalling pathways, causing sexual hormone disruption [9].

Exposure to metals is associated with oocyte maturation [5], ovulation, and fertilisation [10], and therefore assisted reproduction treatments (ART) are affected [2]. If the oocyte

✉ Rubí Rodríguez-Díaz  
rubrod@ull.edu.es

<sup>1</sup> Human Reproduction Unit, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>2</sup> Obstetrics and Gynecology, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>3</sup> Toxicology, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>4</sup> Mathematics, Statistics and Operations Research. IMAULL, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain



develops in a toxic environment that disturbs the primordial follicles, the maturation and quality of the embryo is harmed, and this could be one of the effects of HMs [5, 11].

Bloom et al. [12], found an association between the decrease in fertility, with high doses and professional exposures to Hg, Cd, and Pb, and Ingle et al. [13], observed a negative association between the presence of Cr in follicular fluid (FF) and the number of mature oocytes recovered, and Zn with the fertilisation rate (FR). When these determinations were made in urine, it was found that the higher the levels of Co, Cr, Cu, Mn, and Mo were associated with more oocytes recovered per woman.

Other authors reported that a higher concentration of HM was associated with low-quality oocytes and embryos [14], and on the contrary, it was observed that a higher level of Zn in serum and FF could have a positive role in ART [15]. Although their mechanisms and concentrations are unknown, Pb in blood and Cu in FF seem to have significant impacts on the outcome of the ART cycle, but further studies with larger cohorts and in different patient populations are needed to define their effects on oocyte quality, embryo development, and human reproduction in general [3].

Thus, oocyte quality is not only influenced by the nuclear and mitochondrial genome, but also by the microenvironment provided by the ovary and the preovulatory follicle that influences transcription and translation, and consequently, cytoplasmic maturity [16]. The oocyte is immersed in FF inside the ovarian follicle and is the oocyte's first exposure to environmental contaminants [17]. Human FF is composed of ultra-filtered blood plasma exudates and granulosa and theca ovarian cell secretions. Since ovarian vessels do not penetrate the follicle basal lamina, FF directly provides the microenvironment of granulosa cells and oocytes. Nutrients and exogenous compounds in blood can enter the follicle antrum by passing through the basal lamina [18].

Therefore, the present study aims to examine the association between the presence of twenty-two metals in FF and the ART outcomes in terms of fertilisation rate, embryo quality, implantation, and pregnancy rates.

## Material and Methods

### Samples

A prospective study was conducted with ninety-three women seeking ART in the Reproduction Unit of the Hospital Universitario de Canarias, between February 2019 and December 2020, who underwent a metal detection procedure in FF.

All subjects agreed to participate in the study and signed a written informed consent form for all procedures to be carried out. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitario de Canarias (Reg. No. CHUC

2018 53). Participant recruitment and clinical procedure has been previously described in detail [19].

The employment categories of the participants are as follows: health 15% (nursing assistants, caregivers, nurses, beauticians, pharmacists, masseuses, doctors, and social workers), administrative 31% (lawyers, office workers, quantity surveyors, bank employees, accountants, graphic designers, business women, civil servants, real estate agents, teachers, and secretaries), farming 3% (foreman and packaging staff), transport and retail 28% (airport staff, flight attendants, shop, and supermarket assistants), hospital-ity 19% (waitresses, chambermaids, cooks, cleaning staff, receptionist, and restaurant staff), and others 4% (unemployed and students).

### Assisted Reproduction Treatment

The participant underwent a puncture and aspiration of the ovarian follicles for oocyte extraction with assessment of oocyte presence and for the analysis of metals in the FF.

A controlled ovarian stimulation (COS) to retrieve the oocytes was performed. The following antagonist protocol was used: pharmacological stimulation with recombinant gonadotropins began on day two of the cycle, with the administration of a variable dose of 225–300 IU of rFSH (Puregon®, Organon, France or Gonal-F®, Merck Serono, France) associated or not with 100–150 IU of urinary gonadotropin HMG (Menopur®). Once the main follicle reached 14 mm. in diameter, the GnRh antagonist was added subcutaneously, daily, starting with 0.25 mg of ganirelix or cetrorelix (Ganirelix, Orgalutran®, Organon, France; Cetrorelix, Cetrotide®, Serono, France). When the follicles were at least 17 mm, final maturation was carried out with rHCG (Ovitrelle® 250 microgram solution for injection in a pre-filled pen, choriogonadotropin alfa (Merck Serono, Bari, Italy).

The ovum pick up (OPU) was performed thirty-six hours after the administration of rHCG, and the oocyte was obtained via transvaginal needle under ultrasound vision. The FF is separated from the oocyte during processing and is routinely collected and discarded during ART but can be retained for analysis.

The FF of several follicles of each patient, both small and large, was pooled and stored in the fridge until the metal determination. Once the oocytes had been retrieved, a semen sample was collected on the day of the OPU and subsequently processed for the ART procedure. The oocytes were then inseminated, either by IVF or ICSI technique according to indication, prior to fertilisation and subsequent embryo division taking place.

Fertilisation rate (FR) was assessed at eighteen hours post insemination and was defined as the percentage of fertilised

The Influence of Follicular Fluid Metals on Assisted Reproduction Outcome

oocytes with respect to the number of mature oocytes, provided at least one had matured (MII).

Embryo cleavage rate (CR) was established as the number of divided embryos with respect to fertilised embryos, provided that at least one had been fertilised. A good prognosis for CR was 100% of the embryo cohort. Good embryo quality (GEQ) was established according to the ASEBIR (Association for the Study of the Biology of Reproduction) parameters for ART cycles. Embryo quality grades A and B on day three of division were considered good quality embryos [20]. A cycle is considered of good prognosis when the value of GEQ is greater than 66.6% of the total embryo cohort.

The achieved blastocyst rate (BR) was also considered a measure of the degree of the cycle's quality. Out of the total number of cycles, sixty-one had at least one cultured embryo until days 5–6, and the cycle was considered of good prognosis when at least 50% of the cultured embryos reached the blastocyst stage.

The embryo implantation rate (IR) was defined as the percentage of embryos transferred to the uterus resulting in a pregnancy. Pregnancy rate (PR) was defined as the number of cycles with at least one gestational sac among the number of cycles with embryo transfer (ET); 106 fresh ET were performed in a total of fifty-five patients and sixty-six frozen embryo transfers (FET) in a total of thirty-six patients.

The study group was divided into two groups based on the ART outcome. Special attention was paid to patients diagnosed with PCOS. The primary aim of the study was pregnancy and live birth achieved, and the secondary aims were to obtain the FR, CR, PR, and GEQ.

Treatment of the Samples

Sample processing was performed at the Toxicology Department of the University of La Laguna and in the Legal and Forensic Medicine Institute. Ninety-three samples were processed in triplicate by microwave digestion (Multiwave Go, Antonpaar). A total of 1 mL of sample, 2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Honeywell, Fluka), and 4 mL of HNO<sub>3</sub> 65% (Honeywell, Fluka) were added to each reactor which were then submitted to the digestion process. This process lasted 1 and 26 min and reached a maximum temperature of 180°C (Fig. 1). After digestion, the reactor contents were made up to 10 ml with distilled water (Milli-Q Gradient A10, Millipore, MA, USA) for analysis.

Metal detection was conducted in the Canary Health Service which is in association with the Toxicology Department of the University of La Laguna and in the Legal and Forensic Medicine Institute. The following metals were measured in the FF: aluminium (Al), boron (B), barium (Ba), calcium (Ca), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), potassium (K), lithium (Li), magnesium

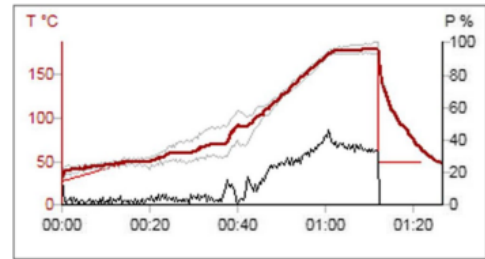


Fig. 1 Digestion process. Graphic temperature (°C) vs time (hh:mm)

Table 1 Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for each level of follicular fluid metal

Metal	Wavelength (nm)	LOD mg/L	LOQ mg/L
Al	167.0	0.005	0.015
B	249.6	0.008	0.027
Ba	455.4	0.0006	0.002
Ca	315.8	1.629	5.432
Cd	214.4	0.0007	0.002
Co	228.6	0.001	0.005
Cr	267.7	0.001	0.005
Cu	324.7	0.003	0.011
K	766.4	1.764	5.883
Li	670.7	0.013	0.031
Mg	383.8	1.580	5.268
Mn	257.6	0.0008	0.003
Mo	202.0	0.0016	0.005
Na	818.3	2.221	7.404
Ni	221.6	0.0009	0.003
Pb	220.3	0.0009	0.003
Sr	407.7	0.003	0.011
V	292.4	0.0014	0.004
Zn	213.8	0.0027	0.009

(Mg), manganese (Mn), molybdenum (Mo), sodium (Na), nickel (Ni), lead (Pb), silica (Si), tin (Sn), strontium (Sr), vanadium (V), and zinc (Zn).

The samples were analysed using an inductively coupled plasma–optical emission spectrometer (ICP-OES), model ICP-OES Thermo Scientific iCAP PRO (Waltham, MA, USA) with an automatic Auto Sampler. The instrumental limits of detection and quantification were estimated based on the instrumental response of the instrument. Specifically, they were determined by analysing fifteen blanks under reproducible conditions [21]. The limits of detection and quantification for each level of FF metal are shown in Table 1.



### Data Analysis

Data were summarised as relative frequencies for categorical variables, means  $\pm$  standard deviation for normally distributed variables, and medians (interquartile range IQR, P25; P75) for non-normal data. Comparisons were performed using Pearson's chi-square test, Kruskal-Wallis test, or Mann Whitney *U* test and ANOVA or *t*-student according to the type of variable and number of groups to be compared. The degree of relationship between continuous variables was calculated using the Pearson or Spearman correlation coefficient according to their distributions. The cut-off points or threshold of metal content to discriminate between the success of the different reproductive phases was established by applying receiver operating characteristics (ROC) curves and choosing the point according to the Youden index criterion. Subsequently, logistic regression with Wald's backward variable selection method was used to model success in the different phases including variables from the spermogram, as well as metal content. ROC curves and the area under the curve (AUROC) were included. A generalised linear mixed model with binary logistic distribution and logit link, including random intercept and slope, was applied in the study of embryo implantation to consider couples with different numbers of interventions. The selection of variables was made using a backward type of procedure ( $p$ -out = 0.10) to prevent a possible multicollinearity effect. The value of Akaike information criterion (AICc) and percentage of concordance was provided. SPSS V 25 (IBM SPSS Statistics) and MedCalc V 19.5 (MedCalc Software Ltd.) were used. A value of  $p \leq 0.05$  was considered significant.

### Results

#### Demographic and Clinical Characteristic

The participants were between twenty and forty-two years of age and they were all living in the Canary Islands, Spain. The mean age of the patients was  $36.0 \pm 3.9$  years, and the body mass index (BMI) was  $24.7 \pm 3.3$  kg/m<sup>2</sup>.

Among the participants, 80.4% had primary infertility, 3.2% secondary, and 8.7% reported previous pregnancy loss. Another 5.4% attended as a woman without a partner, and 2.2% as a woman with a female partner. Regarding the pathology of the participants, 24% had PCO, 8.7% had a tubal pathology, 5.4% had fibroids, 3.2% had endometriosis, and cervical pathologies, in the same proportion. All the patients followed the Mediterranean diet and only three participants had mild exposure to toxicants as farmers, such as packaging staff. We recorded toxic habits, such as tobacco (17.4% of the participants) or occasional intake of alcohol (27%). Regarding the place of residence, 65.6% lived in the

island of Tenerife, 10.7% in La Palma, 10.7% in Lanzarote, 10.7% in Fuerteventura, 1.07% in La Gomera, and 1.07% in El Hierro.

The male participants had a mean age of  $38.2 \pm 5.2$  years, and a mean BMI of  $27.4 \pm 4.3$  kg/m<sup>2</sup>.

#### FF and Metals

The concentration of metals in the FF samples varied depending on the metal. The metals that had concentrations above the instrumental LOQ to the greatest extent were Na (97.83%), Fe (95.65%), and K (93.47%), while Co, Mo, Cr, B, Cd, Li and V, Si, Hg were not detected in any FF sample of the cohort. And those samples where the signals were lower than the instrumental LOQ were not considered in the statistical analysis. This does not mean they were not present, as they could have been below the detection limit of the device (ICP-OES), which does not rule them out as being potentially harmful [17].

Mean concentration (mg/kg) was highest for the macroelement metals Na, K, and Ca, followed by essential metals Fe, Zn, Cu, and Mn. The non-essential metals Ba and Al were detected (Table 2).

#### Metal Correlation

K was positively correlated with Fe and Zn, and was significant with Na ( $r = 0.7389$ ;  $p < 0.001$ ); Cu was positively related to Zn, Ba, Ca, and Na (the highest correlation was

**Table 2** Metal content in follicular fluid

Metals n (%)	N > LOQ	% >LOQ	mg/kg
<b>Essential metals</b>			
Cu	85	92.39	0.88 $\pm$ 0.30
Fe	88	95.65	15.48 $\pm$ 13.89
Fe*	–	–	11.2 (7.0;17.8)
Zn	85	92.39	1.14 $\pm$ 0.39
Mn	58	63.04	0.04 $\pm$ 0.01
<b>Non-essential metals</b>			
Ba	11	11.96	0.06 $\pm$ 0.07
Al	65	70.65	0.66 $\pm$ 0.66
Al*	–	–	0.50 (0.32;0.80)
Ni	11	11.96	0.31 $\pm$ 0.41
Pb	2	2.17	–
Sr	1	1.09	–
<b>Macroelements</b>			
Ca	85	92.39	148.51 $\pm$ 49.24
K	86	93.48	332.47 $\pm$ 118.73
Mg	10	10.87	68.80 $\pm$ 6.75
Na	90	97.83	4550.45 $\pm$ 1299.24

\*Median (interquartile range)

The Influence of Follicular Fluid Metals on Assisted Reproduction Outcome

with Ba); and Mn was positively correlated with Zn. Ba was positively correlated with Cu and Zn.

In addition, Al was positively correlated with Zn and Mn. Na was positively correlated with Cu, Ca, and K, and Zn correlated positively with Mn, Ba, Al, and K (it should be noted that the ratio of Zn and Al may be conditioned by the excessive value of Al).

Ca was positively correlated with Cu and Na, and negatively with Fe. This negative association indicates that when the Pb content increases, the Ca content decreases, this is since Pb interferes with Ca metabolism since they are chemically similar and Pb acts by displacing Ca. Ni did not show significant correlations with any metal (Fig. 2).

**FF and Metals in PCO**

Twenty-two participants (24%) had PCO. The presence of metals in PCO patients was analysed. There were no significant differences in the characteristics of women or in the presence of metals according to PCO (Table 3).

Using the cut-off point according to the Youden Index for the metals that are closest to significance (Table 3) suggests that low values of Cu, Zn, Al, and Ca favour PCO. The AUROC of this model is 0.673 (95% CI 0.546; 0.801;  $p = 0.014$ ).

**Oocytes**

Two of the ninety-three participants did not have mature oocytes, which means that the FR and CR were calculated based on a total of ninety-one interventions. The number of oocytes varied between one and thirty-three, with a median number per OPU of nine (5; 13).

An inverse correlation was also observed between the number of oocytes and the participant's age ( $r = -0.353$ ;  $p = 0.001$ ). No correlation was observed between the number of mature oocytes and the FR.

The PCO participants presented a mean oocytes number of 14.3 (7.2) significantly higher ( $p < 0.001$ ) than the group of non-PCO women where the mean number of oocytes was 8.3 (5.1). However, no significant differences were observed between the number of oocytes and that of mature oocytes ( $p = 0.159$ ), which was 2.1 in the PCO group (s.e. 0.25) and 1.4 (s.e. 0.30) in no PCO patients.

Regarding the relationship between oocyte number and metals: Fe ( $r_s = 0.303$ ;  $p = 0.003$ ) and Ca ( $r_s = -0.276$ ;  $p = 0.007$ ) were significant and Al ( $r_s = -0.195$ ;  $p = 0.061$ ) and Na ( $r_s = -0.174$ ;  $p = 0.095$ ) were close to significance.

The relationship between the number of mature oocytes and Fe ( $r_s = 0.319$ ;  $p = 0.002$ ), Ca ( $r_s = -0.307$ ;  $p = 0.003$ ), and Na ( $r_s = -0.215$ ;  $p = 0.039$ ) were significant; and next to significance was Al ( $r_s = -0.198$ ;  $p = 0.057$ ).

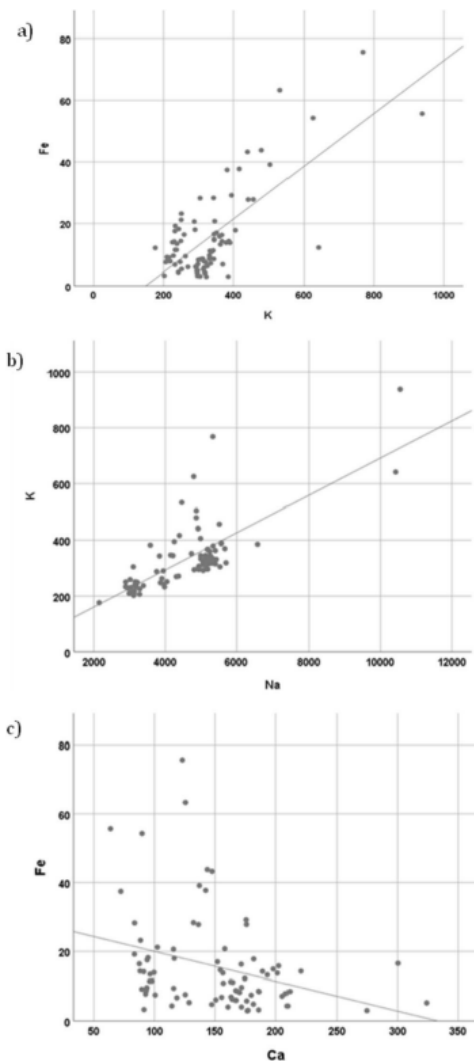


Fig. 2 Correlation between a) K-Fe, b) Na-K, and c) Ca-Fe

**Fertilisation Rate**

The median FR was 76.5% (52.6; 92.3). Twenty-one participants (23%) presented 100% FR and eight participants (8.8%) had an FR below 33.3%, with four participants (4.4%) having a FR of 0%. The median difference between mature oocytes and fertilised oocytes was 1 (0; 3), with this varying between 0 and 12.

**Table 3** Characteristics and metal content according to PCO

	PCO		p-value
	Yes (N = 22)	No (N = 71)	
Age (years)	35.1 ± 4.5	36.3 ± 3.7	0.208
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.1±3.3	24.5±3.4	0.457
Essential metals, n (%)			
Cu	19 (86)	66 (93)	0.388
Fe	20 (91)	68 (96)	0.589
Zn	19 (86)	66 (93)	0.388
Mn	12 (55)	46 (65)	0.453
Cu (mg/kg)	0.95 ± 0.45	0.86 ± 0.24	0.249
Cu ≤ 0.51	7 (32)	6 (9)	0.010
Fe (mg/kg)	17.87 ± 13.96	14.78 ± 13.90	0.385
Fe (mg/kg)*	14.2 (6.8; 26.0)	9.86 (7.0; 16.5)	0.282
Zn (mg/kg)	1.03 ± 0.37	1.17 ± 0.39	0.181
Zn ≤ 0.8	10 (46)	16 (23)	0.041
Mn (mg/kg)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.319
Non-essential metals, n (%)			
Ba	2 (9)	9 (13)	0.938
Al	13 (59)	52 (73)	0.287
Al ≤ 0.2967	16 (73)	27 (38)	0.007
Ni	3 (14)	8 (11)	0.718
Pb	1 (5)	1 (1)	0.419
Sr	1 (5)	–	0.237
Ba (mg/kg)	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.07	0.488
Al (mg/kg)	0.81 ± 1.34	0.62 ± 0.35	0.358
Al (mg/kg)*	0.30 (0.26; 0.79)	0.54 (0.35; 0.80)	0.187
Ni (mg/kg)	0.17 ± 0.03	0.36 ± 0.48	0.517
Macroelements, n (%)			
Ca	18 (82)	67 (94)	0.087
Ca ≤ 176.62	21 (96)	52 (73)	0.035
K	19 (86)	67 (94)	0.350
K > 405.7167	6 (27)	5 (7)	0.019
Mg	3 (14)	7 (10)	0.696
Na	20 (91)	70 (99)	0.138
Ca (mg/kg)	139.5 ± 33.8	151.3 ± 52.7	0.373
K (mg/kg)	351.0 ± 131.1	327.6 ± 115.4	0.450
Mg (mg/kg)	70.9 ± 7.0	67.9 ± 7.0	0.548
Na (mg/kg)	4609 ± 1672	4540 ± 1185	0.836

\*Median (interquartile range)

High Ca impairs FR. Using the cut-off point according to the Youden index, ≤ 176.62 is obtained (p-value = 0.011). Ca above 176.62 mg/kg decreases FR (Fig. 3).

That is, if p = probability of having an FR ≥ 75% then  $\ln p/(1-p) = -1.495 + 2.406*(if\ technique=ICSI) - 1.630*(if\ Ca > 176.6\ mg/kg)$ . The AUROC of this model was 0.687 (95% CI 0.564; 0.810; p = 0.004).

### Cleavage Rate

The CR was calculated in the group that had at least one fertilised oocyte. In this data set, there were four participants that did not achieve at least one fertilised oocyte and therefore the number of valid interventions for this calculation was eighty-seven. Seventy-seven interventions (88.5%) achieved 100% CR and only five participants (5.7%) had a rate ≤80%.

Regarding the availability of metals, no significant differences were found in any of them between the two CR groups. The classification of the spermogram is also noteworthy, although not significant. In the group with <100% division, 70% presented pathology, compared to 39% in the group with 100% embryo division (p = 0.090).

For Cu, Fe and Al a study has been carried out, using the Youden index criterion, to determine a possible cut-off point, which could give significance. If Fe ≤ 7.525, Cu ≤ 1.04 and Al > 0.31 are presented with a value lower than that described, they are more likely to reach 100% CR. If p = probability of having a CR = 100%, then  $\ln p / (1-p) = 0.177 + 2.025*(if\ Cu \le 1.04\ mg/kg) + 1.448*(if\ Al > 0.31\ mg/kg)$ . The AUROC of this model was 0.799 (95% CI 0.648; 0.951; p = 0.002). An excess of Cu and Al are harmful.

### Embryo Quality

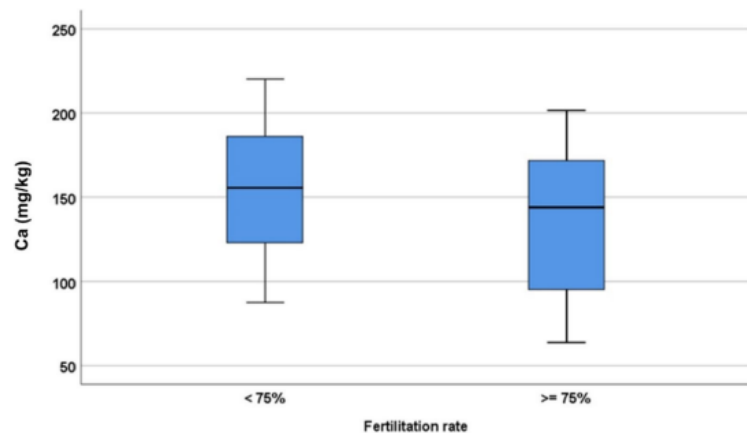
GEQs were obtained from the group that had at least one fertilised oocyte, that is, from eighty-seven participants. Their values varied between 0 and 9, with a median of 2 (1; 4). A GEQ was not achieved in eighteen (20.7%) participants, a single GEQ was achieved in sixteen (18.4%) participants, and five or more GEQs were achieved in seventeen (19.5%) participants. The rate exceeded 50% in half of the cases and reached a rate of 66.7% in 25% of the cases, although 25% had a GEQ rate of less than 20%. Seven participants reached a 100% GEQ rate (Table 4).

If the Youden index criterion was used for the metals that are closest to being significant, a cut-off point > 10.043 would be obtained for Fe and a cut-off > 93.725 for Ca. If Fe > 10.043, GEQ is less than 66.6%. Introducing these two variables in the logistic regression model (forward selection of Wald variables) would indicate that an excess of Fe (>10.043) and an excess of Ca (> 93.725) would reduce the GEQ rate. The AUROC of this model would be 0.627 (95% CI 0.569; 0.815) p = 0.006.

In the present study, high Ca and Fe levels were harmful to GEQ.

### Blastocyst Rate

Out of the total number of cycles, the culture was started in sixty-nine (79.3%) of the eighty-seven participants who

**Fig. 3** Fertilisation rate and Ca levels

presented embryos with FR of at least one cultured embryo by days 5–6. The median number of cultured embryos was three (1; 6). Twenty-seven participants (39.1%) presented 0% BR and nine participants (13%) presented 100% BR and a median of 33% (0; 50).

If the cut-off points are calculated following the Youden index, it is obtained that for Ca and K an excess of these metals impairs the BR. Applying logistic regression with these two variables, only K would remain in the model (of those with Ca > 170.335, 94 also have K > 304.7466 mg/kg).

The ROC curve shows an area of 0.641 (IC<sub>95%</sub> 0.503; 0.779;  $p = 0.030$ ).

Forty-eight participants had frozen embryos, in a total of sixty cycles (twelve of the participants had two frozen cycles). The median in this case was 75 (0; 100). Of these sixty cycles, blastocysts were not obtained in seventeen (28.3%) and 100% was achieved in twenty-eight (46.7%). Attempts were made to form groups with <50% and ≥50%, as well as equal to 100% or not, but in this case, it was not significant.

There was a total of 129 cycles (69 fresh and 60 frozen). The median BR was 50% (0; 100%). Forty-four cycles (34.1%) presented a BR of 0% while thirty-seven (28.7%) had a BR of 100%.

High Ca and K levels impaired BR and, on the contrary, low Ca levels improved BR. The presence of Mn was detrimental to BR, particularly in those with BR ≥ 50%, 91% had an Mn ≤ 0.035 mg/kg, compared to only 67% if BR < 50% ( $p = 0.039$ ).

### Embryo Transfer

In a total of 110 cycles, at least one embryo was transferred (52 of the 69 fresh and 58 of the 60 frozen). The total

number of participants who performed at least one cycle was eighty, eighteen of whom underwent both fresh and frozen transfer (ECT), thirty-four only in fresh, and twenty-eight only in ECT. There were fifty-one participants (63.7%) who had only one cycle, twenty-eight (35%) two cycles, and only one (1.3%) three cycles.

In 62% of the cycles, a single embryo was transferred and in the remaining 38% two embryos were transferred. These proportions do not differ significantly between fresh and ECT ( $p = 0.653$ ) (fresh two embryos were transferred in 40% of the cycles and in ECT in 36% of the cycles).

The IR did not differ significantly according to the number of embryos transferred ( $p = 0.915$ ). In the case of ECT, implantation occurred in 32.4% of the cases, compared to 33.3% when two embryos were transferred. In the case of fresh embryos, the IR was 25.8% when one embryo was transferred and 23.8% in the case of two embryos being transferred ( $p = 0.870$ ), while in the frozen embryos this was 37.8% when one embryo was transferred versus 42.9% when two embryos were transferred ( $p = 0.707$ ).

### Implantation Rate

Among the 110 cycles with embryo transfer, no implantation occurred in seventy-four cycles (67.3%), one embryo was implanted in thirty-three cycles (30%), and two embryos were implanted in three cycles (2.7%). Although it is not significant, implantation was achieved in thirteen cycles (25%) in the case of fresh embryos compared to twenty-three cycles (39.7%) with frozen embryos ( $p = 0.110$ ).

No differences were found regarding the technique between fresh and frozen embryos, ICSI was used in 94% of fresh and 91% of frozen embryos ( $p = 0.719$ ).



**Table 4** Characteristics and metal content according to the GEQ rate

	GEQ		p-value
	< 66.6% (N = 63)	≥ 66.6% (N = 24)	
<b>Female</b>			
Age (years)	35.9 ± 3.6	36.4 ± 3.6	0.577
Weight (kg)	66.0 ± 10.3	64.4 ± 7.8	0.499
Height (m)	1.64 ± 0.08	1.63 ± 0.07	0.813
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 ± 3.6	24.2 ± 3.0	0.599
BMI n (%)			0.356
Low/normal	34 (55)	14 (58)	
Overweight	23 (37)	10 (42)	
Obese	5 (8)	–	
PCO	16 (25)	6 (25)	1.000
<b>Male</b>			
Age (years)	37.8 ± 5.4	38.4 ± 4.7	0.661
Weight (kg)	83.6 ± 13.2	86.2 ± 13.9	0.452
Height (m)	1.76 ± 0.05	1.76 ± 0.06	0.796
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.0 ± 4.1	27.7 ± 4.3	0.508
Spermiogram			0.809
Normal	37 (59)	13 (54)	
Pathological	26 (41)	11 (46)	
Technique			0.997
IVF	4 (6)	1 (4)	
ICSI	59 (94)	23 (96)	
<b>Metals</b>			
<b>Essential metals n (%)</b>			
Cu	59 (94)	20 (83)	0.208
Fe	61 (97)	21 (88)	0.126
Zn	59 (94)	20 (83)	0.208
Mn	43 (68)	12 (50)	0.139
Cu (mg/kg)	0.87 ± 0.28	0.90 ± 0.33	0.685
Fe (mg/kg)	16.71 ± 14.42	13.10 ± 13.33	0.317
Fe (mg/kg)*	13.2 (7.5; 18.1)	9.4 (5.3; 15.4)	0.176
Fe > 10,043	37 (59%)	8 (33)	0.038
Zn (mg/kg)	1.15 ± 0.41	1.09 ± 0.36	0.595
Mn (mg/kg)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.403
<b>Non-essential metals, n (%)</b>			
Ba	8 (13)	2 (8)	0.720
Al	46 (73)	15 (63)	0.433
Ni	9 (14)	2 (8)	0.720
Pb	1 (2)	–	0.724
Sr	–	1 (4)	0.276
Al (mg/kg)	0.68 ± 0.77	0.60 ± 0.32	0.676
Al (mg/kg)*	0.50 (0.30; 0.81)	0.49 (0.34; 0.89)	0.821
Ni (mg/kg)	0.36 ± 0.44	0.07 ± 0.02	0.406
Ni (mg/kg)*	0.16 (0.08; 0.54)	0.07 (0.06; 0.09)	0.098
<b>Macroelements, n (%)</b>			
Ca	59 (94)	20 (83)	0.208
Ca > 93.725	51 (81)	14 (58)	0.034
K	60 (95)	20 (83)	0.088

**Table 4** (continued)

	GEQ		p-value
	< 66.6% (N = 63)	≥ 66.6% (N = 24)	
Mg	6 (10)	3 (13)	0.702
Na	62 (98)	22 (92)	0.183
Ca (mg/kg)	148.1 ± 47.2	140.0 ± 40.7	0.496
K (mg/kg)	337.9 ± 127.9	319.7 ± 103.7	0.567
Mg (mg/kg)	68.5 ± 7.5	70.9 ± 6.9	0.656
Na (mg/kg)	4534 ± 1201	4530 ± 1592	0.991

\*Median (interquartile range)

Although it is not significant ( $p < 0.1$ ), around 15% of those who did not implant, presented Ba and Mg, while in those implanted this percentage was only 3% (a single cycle).

If  $K > 237.18$  and  $Ca \leq 147.32$ , this favours implantation. This model had an AUROC of 0.716 (95% CI 0.611, 0.822);  $p < 0.001$ . The overall accuracy of this model was 74.5% (83.8% of those not implanted and 55.6% of those implanted).

In the present study, high Fe and K and low Ca levels improved IR.

### Pregnancy Rate

Of the 110 cycles with ET, thirty-six resulted in pregnancy (two of which were multiple), thirteen of these (36.1%) were from fresh cycles and twenty-three (63.9%) were from ECT. In other words, of the fifty-two total fresh cycles with ET, thirteen (25.0%) resulted in pregnancy, compared to twenty-three (39.7%) out of the fifty-eight ECT cycles ( $p = 0.110$ ). Of the thirty-six pregnancies, twenty-seven (70.0%) evolved positively (two twin pregnancies), eight (22.2%) ended in abortions, and one in an ectopic pregnancy. In the case of fresh cycles, ten (76.9%) of the thirteen pregnancies evolved positively (one twin) compared to ECT where seventeen (73.9%) evolved positively (one also with twins) ( $p = 0.981$ ).

If the cut-off points (Youden index) of the variables that best discriminate between pregnancy success are used. This model has an AUROC of 0.741 (95% CI 0.539, 0.943).

PR is influenced by high Fe and K levels and low Cu levels.

### Discussion

#### Follicular Fluid

FF is the fluid that surrounds the developing oocyte in the ovary and can be analysed to assess metal content as well as to determine potential exposure to toxic elements in women

seeking ART [17]. Butts et al. [22], estimated that “compared to blood and urine specimens, FF provides a better estimate of exposures that might impact reproductive outcomes, as it more closely reflects the microenvironment surrounding the developing oocyte,” being a reasonable biomarker of the local microfollicular environment [23]. However, another clinical study [22] reported variation in metal levels in inter-follicles in the same woman, and some authors [24] found that element concentrations in small follicles frequently differed from those of large follicles. To get round this issue, FF from several follicles of the same patient, both small and large, was pooled and the mean average level of the total FF was measured in the present study.

### Metals

Essential metals (Cu, Fe, Zn) were present here in all the analysed FF samples, except for Mn (62%). On the other hand, non-essential metals (Ba, Ni, Pb, Sr) were less common, as expected since there was no environmental or occupational exposure, except for Al (70%) with a more frequent presence, Co, Mo, Cr, B, Cd, Li, and V were not detected and they could have been below the detection limit of the device (ICP-OES). Finally, the macroelements (Ca, K, Na), with the exception of Mg (11%), were present in most of the FF samples.

The proper comparison of the metal concentration with other authors was extremely difficult, not only because of the different detection methods used, but also, because of the different units used: mg/l [15, 23] or µg/L [17, 22, 25, 26].

Some authors observed that metal contents in FF were inconsistent, and most of them were lower in FF than in serum, except for Cr, Mn, Ni, and Pb [26]. In addition, low presence of metals except for the macroelement Ca, K, Mg, and Na, and Fe was found in the present study. These data could suggest a possible protective role against certain toxins of the follicle wall. However, Wu et al. [25] reported that most of the elements such as Cr, Ni, Cd, and Pb were highly detected (71.8–100%), except for Cr in FF, which had a detection rate of 66.0%.

Regarding these above mentioned metals, Cr and Cd were not detected in the present study, and Ni (12%) and Pb (2%) were very low, and no significant amounts of Pb in the FF of the patients studied were found, and this may be directly related to the fact that the environment in which the patients live is an island with a low level of industrialisation and pollution and, furthermore, the female participants in this study did not report environmental or occupational exposure.

### Association Between Metals and ART

Although there are few publications about the action of HM in FF and their influence on ART, several studies

have shown that chronic metal exposure can affect not only the oocyte, but later the embryo development [11, 13]; while in the case of Cu, Cd, Pb, Zn, and Fe, some authors did not find any relationship [5] or reported a negative impact [3]. However, an influence of Ca, Cu, Fe, K, Mn, and Al on the ART results was observed in the present study.

Regarding the possibility that metal mixtures may have interactive effects (additive, synergistic or antagonistic) on human health, it is necessary to consider its potential effect on pregnancy outcomes, even at very low concentrations [2]. These metal mixtures may reflect a common source for the metals [27].

Niehoff et al. [28], reported the strongest correlation between Fe and Mn. Most authors studied the mixture of toxic elements such as Cd, Se, Hg, Pb, or As that were not detected in the present study.

### Association Between Cu and ART

Cu is a component of the antioxidant superoxide dismutase (SOD) metalloenzyme which neutralises superoxide radicals and prevents the formation of more reactive and harmful free radical species [29]. In addition, SOD activity is inversely associated with fertilisation [30].

But HM are not always associated with harmful effects, thus the average number of oocytes recovered was positively associated with higher urine Cu concentrations, embryos generated and more total embryos [13], also more fertilised oocytes [31], and more pregnancies [5] were found in patients with higher concentration of Cu.

On the other hand, several authors found no relationship between the FF Fe levels and the effect on A

RT and embryonic development or with PR [32].

Tolunay et al. [3] found no relationship between Cu concentration in FF and ART outcome. However, several authors, as is the case of the present study, found lower PR in patients with higher concentrations of Cu in FF, as well as a negative effect on CR, and found that for every 1 mg/dL higher concentration of Cu in the FF there is a 71.9% lower chance of pregnancy, with a possible negative effect on follicular maturation and embryonic development. Furthermore, Wodiak et al. [5] observed that the highest concentrations of Cu were accompanied by shorter times for each of the various embryo development stages, and as we know [20], alterations in embryonic morphokinetic harm reproductive results. The results of the present study show that Cu levels should be less than 1.04 mg/kg so as not to affect the CR. This negative effect on follicular maturation and embryo development is suggested when exposure to Cu is chronic [3].

### Association Between Fe and ART

Regarding the Fe outcome, this was positively correlated with ROS levels. Fe can be delivered to granulosa cells by soluble transferrin transporter, which captures Fe released in interstitial spaces [33].

It should be mentioned that in the results reported here, there was an inverse relationship between Ca and Fe, and lower concentrations of Ca were linked to a higher concentration of Fe and improved oocytes number and mature oocytes obtained.

It is known that when mature oocytes could be extracted, they would increase GEQ [34]. Although Fe may affect the development of the oocytes, it does not seem to affect the embryo quality, since no correlation was observed between ferritin levels in the follicles and embryo quality [5].

In the present study, Fe was related to GEQ. Thus, participants with Fe levels lower than 7.52 mg/kg in the FF had a higher CR and GEQ, and participants whose Fe levels in FF were higher than 14.32 mg/kg, presented worse values in the CR and poorer GEQ, despite having a better IR. In addition, when Fe concentration was higher than 0.0433 mg/kg, associated with a Ca concentration higher than 93.725 mg/kg, there was a detrimental effect on GEQ.

In summary, high levels of Fe were associated with low CR and low GEQ, although it improved the IR.

Several authors have not been able to demonstrate that ARTs were affected by the presence of Fe in blood or in FF [3], but in the present study we did.

### Association Between Ca and ART

In this study, low levels of Ca were observed to improve FR, IR and BR, while higher levels harmed FR, BR, GEQ rates. The concentration of Ca needs to be less than 93.72 mg/kg for the GQE to improve, and values below 170 mg/kg improves BR, while values not exceeding 147 mg/kg do not affect IR. FF Ca levels should not exceed 93.72 mg/kg to expect the best results in ART. On the other hand, Ca does not seem to be influencing CR.

In this regard, the important role of  $\text{Ca}^{2+}$  in oocyte maturation, fertilisation, and early embryo development is well known. For the homeostasis of Ca, the intracellular content is stored in the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER/SR), and extracellular Ca is also important for the proteins involved in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and transport. Human oocytes and embryos have a perfectly organised and diversified system for Ca sequestration and release [35]. Ca is essential to trigger oocyte activation. Several authors reported that FF Ca concentrations were higher in participants who did not achieve any pregnancy, the difference did not reach statistical significance level, compared to those who did; following

ICSI attempts [36], this result does not clarify the role of Ca in ART.

Other authors postulated that a higher intracellular ovum concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  could be represented as a higher FF level of  $\text{Ca}^{2+}$  [36]. In the ICSI cycle, the dysfunction of oocyte activation caused by insufficient release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum is one of the main reasons for repeated fertilisation failure. Calcium ionophore (A23187) is a highly selective calcium ionophore, which can form a stable complex with  $\text{Ca}^{2+}$  and pass through the cell membrane, increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels, and can activate oocytes [37]. Furthermore, treatment with  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore improved embryo development and reproductive outcomes in cases with previous developmental problems [38].

The present study shows that an elevated concentration of Ca in FF above 176.6 mg/kg, significantly affects the FR, pointing somehow to an imbalance in the homeostasis of Ca when extracellular Ca levels are exceeded in the FF during oocyte maturation. Another finding of this study is the confirmation that significantly smaller concentrations of Ca were recorded in the FF of PCO patients.

### Association Between K and ART

As regards K ions, we know they are involved in many important functions such as transmembrane transport, activation of glycolytic enzymes and synthesis of macromolecules [39], and a relationship is suggested with the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase being directly implicated in blastocyst formation [40].

To the best of the authors' knowledge here are no current studies on the subject, but it has been observed in animal research that increasing K concentrations in embryo culture media resulted in an increase in BR and morulae and blastocysts also had an increased number of cells indicating an acceleration in cell proliferation. This effect was reversed when the K concentration notably increased [39], a fact that is confirmed in the present study. A positive correlation between the concentration of K above 237.18 mg/kg, and the improvement of IR and PR was found. It should be mentioned that the K level was measured in the FF, with the K in culture media being directly related with embryo development and physiologic K measured in FF being more implicated in implantation processes.

Another noteworthy finding in the present study was that higher quantities of K above 405.71 mg/kg were associated with the PCO pathology.

### Association Between Al and ART

As for Al, which is a non-essential metal, humans are not immune from the burgeoning presence of Al in the biotic cycle. It is an unsafe metal whose presence is not banned



in many countries and no legislation exists limiting Al human exposure. Nevertheless, humans are exposed to Al not only through food, but topically applied with cosmetics and hygiene products, especially anti-transpirants and sunscreens. Al is found in raw materials for the application of cosmetics due to their healing activity, hydration, pigment dispersion, and melanin adsorption. Al is also present in clay, but especially in the white clay used in cosmetics and it should be mentioned that Al may exert toxic effects when it reaches the circulatory system and accumulates in different organs [41], this would explain its presence in more than 70% of the women studied here did not report any environmental exposure. It is also used as medicine and vaccines adjuvant as well as in prostheses in surgery and dentistry [42], and it is important to be aware that human exposure to high concentrations of Al will result in toxicity although it is not common to find cases of intoxication from Al in the population. As the authors found in a previous study [19], elevated concentrations of Al in semen samples reduce GEQs that are related to the BR of the embryo cohort in ART. Along the same lines, when studying FF, a harmful influence of high Al presence was found on the CR in the embryo cohort, suggesting a negative effect of high amounts of Al on reproductive results. A relationship was found between Al and a lower number of obtained oocytes, but with a non-significant tendency. Al in FF should be below 0.31 mg/kg in order not to negatively influence the CR. This indicates the importance of having a convenient balance between exposure and excretion.

#### Association Between Mn and ART

On the other hand, the participants with higher levels of Mn in urine had more oocytes retrieved and more embryos. Additionally, there was a relationship between obese and smoking women and lower trace elements implicated in anti-OS activities, such as Mn [43]. The present study found that Mn is detrimental to the BR, no influence on oocyte maturity was detected. Furthermore, the presence of Mn in the FF was negatively associated with the proportion of mature oocytes, and a lower likelihood for an oocyte to be recovered in metaphase-II arrest was detected. FF Mn was negatively associated with the rate of recovered mature oocytes [13].

#### Association Between PCO and Metals

Several authors have demonstrated the relationship between metals and PCO [44]. The findings in the present study show that Al is present in more than 50% of PCO participants, even at low doses, and this is due to the impact of HMs on OS, which is a paramount cause in the aetiology of PCO, and OS and HM toxicity should be monitored in females to reduce the risk of PCO [44]. The PCO patient group was

found to have lower levels of Cu, Zn, Al, and Ca but greater levels of K in FF.

It should be noted that the highest levels of Ca correlated with a decrease in the number of oocytes and in PCO patients the Ca level is lower when accompanied by the greatest number of oocytes which is a usual guideline in this pathology. The findings here show that participants with higher levels of Ca have lower oocyte numbers.

#### Conclusions

Several metals detected in FF, such as Ca, Fe, Cu, Al and K, have an important influence on reproduction, and show that the analysis of metals opens up a new line of study on female infertility with implications in reproductive outcomes. Many cases of unknown infertility could be due to metals in FF [45], and treatments could be aimed at correcting possible anomalies in metals levels in infertile women.

Based on all the evidence, HM levels impact ART outcome, and controlling exposure to toxic elements for all couples with reduced fertility or receiving an ART is recommended. More studies with larger cohorts and different patient populations are needed to define their effects on oocyte quality and, therefore, on embryo development and human reproduction.

#### Strengths and Limitations of the Study

It is known that environmental toxicants exposure affects human health. This prospective study analysed the association between twenty-two HM in infertile couples, and their effect on ART outcomes.

We conducted a long-term clinical screening; ninety-three couples were included in the present study. We tested the FF samples including twenty-two HM, combined with clinical data, and used statistical models to analyse the effects of the HM on the participants, the oocyte number and maturity, quality of embryonic development and pregnancy rates, among others. Our research will provide new tools for the prevention, diagnosis, and treatment of infertility.

Our subjects were all from different places. The geographical area where the participants come from are islands, and at the same time they come from different places on those islands, this gives us an idea of the factor geographic location and geographic differences and the test results may reflect the situation in a large area, although they have all been attended in the same reference hospital.

A strength of this work is that the FF of several follicles, both large and small, was pooled, considering that several authors [22] have detected variability in metal levels in inter-follicles in the same woman, and other authors [24] found that element concentrations in small follicles



frequently differed from those in large follicles. To get round this issue, FF from several follicles was pooled and the mean average level of the total FF was measured in the present study.

We also analysed the impact of elements on the outcomes of ART and did consider the interference of factors such as living habits (smoking, drinking), or occupational exposure. Furthermore, our results are not vulnerable to confounding by factors related to exposure and outcome, such as related environmental exposures, health behaviours, or dietary factors that may be important and have been assessed. The limited number of previous studies characterising predictors of FF metals in infertility patients, and in humans in general, may limit our ability to assess impact.

Our data are only for these couples who need ART, and does not involve the general population, but it would be very difficult to perform follicular punctures on patients who are not going to undergo ART.

The study has some limitations and thus the results should be interpreted with caution. The participants did not refer to exposure to environmental or professional factors, and as such toxic metals as important as Pb and Hg have not been detected, and Al with a very low incidence and, therefore, we were unable to assess their importance. This prevented us from an exact assessment of the influence of HM toxic on ART.

We were also limited by the inability to stratify for infertility factors that are likely to modify the association between FF metal contents and ART outcomes, including diagnosis.

Other important limitations relate to the possibility of FF contamination by blood during the ovum pick up aspiration procedure. However, we excluded the red-coloured specimen, so we avoided that possible effect. In addition, we used a surgical grade stainless steel needle that could imply contamination of the samples but the non-detection of metals such as Pb, Hg, or Cd ruled out this possibility.

On the other hand, if we were to increase the sample size, type II errors would be reduced which is why this study mainly emphasises significant results. When the study was initially proposed, it was thought that the contents of the different metals evaluated would be compared in two independent groups defined on ART outcome. It was considered that the groups would be formed with a 1:4 design (because they were mainly defined by quantiles) and that the standardised difference in metal content to detect between groups would be 0.75 units with a confidence level of 95% and a power of 80%, including 5% for possible losses.

In fact, we consider this study as a preliminary basis to extend it, in the near future, to a more in-depth study of various pathologies within the different aetiologies of infertility.

Finally, it has not been possible to explain whether elements will specifically harm fertility, larger studies in the ART population are required to find the association between

the outcomes of the treatment and HM, for future diagnostic and treatment protocols.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03578-3>.

**Acknowledgements** We would like to thank the Human Reproduction Unit of the Hospital Universitario de Canarias for their collaboration in performing the clinical and laboratory procedures.

**Author contribution** R-D designed the study. R-D and B-Z interpreted the results and edited the manuscript. R-F and G-R analysed the data, interpreted the results, and revised the manuscript. AH, G-W, G-R, SP, AG, CR, N-C and V measured the metals and interpreted the results. GD performed the statistics study, interpreted the results, and edited the manuscript. All the authors critically revised the review. All the authors have approved the submitted version.

**Funding** Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature.

**Data availability** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Ethical standards** The authors affirm that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. The present study protocol was reviewed and approved by the institutional review board of Hospital Universitario de Canarias (Reg. No. CHUC 2018 53), and all eligible participants signed an informed consent form prior to inclusion.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. Angelis C, Nardone A, Garifalo F, Pivonello C, Sansone A, Conforti A, Di Dato C, Sirico F, Alviggi C, Isidor A, Colao A, Pivonello R (2020) Smoke, alcohol and drug addiction and female fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 18:21. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-0567-7>
2. Li D, Liang C, Cao C, Zhu D, Shen L, Zhang Z, Jiang T, Zhang Z, Zong K, Liu Y, Liang D, Cao Y, Ji D, Xu X (2022) The associations of serum metals concentrations with the intermediate and pregnancy outcomes in women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol Environ Saf* 233. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113309>

The Influence of Follicular Fluid Metals on Assisted Reproduction Outcome

3. Tolunay H, Şükür Y, Ozkavukcu S, Seval M, Ateş C, Türksoy V, Ecemiş T, Atabekoğlu C, Özmen B, Berker B, Sönmezer M (2016) Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 198:73–77 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26802253>
4. Canipari R, De Santis L, Cecconi S (2020) Female fertility and environmental pollution. *Int J Environ Res Public Health* 17:8802 <https://doi.org/10.3390/ijerph17238802>
5. Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I (2018) Evaluation of trace metals in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 25(2):213–218 <https://www.aaem.pl/Evaluation-of-trace-metals-in-follicular-fluid-in-ICSI-treated-patients,75422,0,2.html>
6. Engwa GA, Ferdinand PU, Nwalo FN, Unachukwu MN (2019) Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. In: Karcioğlu O, Arslan B (eds) *Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?* IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.825111>
7. Fu Z, Xi S (2020) The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicol Mech Methods* 30(3):167–176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
8. Bhardwaj JK, Panchal H, Saraf P (2021) Ameliorating effects of natural antioxidant compounds on female infertility: a review. *Reprod Sci* 28:1227–1256. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00312-5>
9. Castiello F, Olmedo P, Gil F, Molina M, Mundo A, Romero R, Ruiz C, Gomez- Vida J, Vela-Soria F, Freire C (2020) Association of urinary metal concentrations with blood pressure and serum hormones in Spanish male adolescents. *Environ Res* 182:108958. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108958>
10. Cheng Y, Zhang J, Wu T, Jiang X, Jia H, Qing S, An Q, Zhang Y, Su J (2019) Reproductive toxicity of acute Cd exposure in mouse: resulting in oocyte defects and decreased female fertility. *Toxicol Appl Pharmacol* 379:114684. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114684>
11. Jiang T, Hu Y, He S, Jiang R, Yao Y, Jin Z, Shen J, Tao F, Ji Y, Liang C (2022) Exposure to multiple toxic metals and the risk of early embryonic arrest among women undergoing assisted reproductive techniques. *Environ Res* 211:113072. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113072>
12. Bloom MS, Fujimoto VY, Steuerwald AJ, Cheng G (2012) Background exposure to toxic metals in women adversely influences pregnancy during in vitro fertilization (IVF). *Reprod Toxicol* 34:471–481 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732149>
13. Ingle M, Bloom M, Parsons P, Steuerwald A, Kruger P, Fujimoto V (2017) Associations between IVF outcomes and essential trace elements measured in follicular fluid and urine: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 34(2):253–261 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27943108>
14. Nandi P, Banerjee SK, Basu S, Das MC, Dasgupta P, Varghese AC (2011) A preliminary study on heavy metals (Lead, Cadmium and Arsenic) in follicular fluid and its effect on oocyte, embryo quality and outcome of IVF treatment. *Fertil Steril*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.609>
15. Kumar S, Mishra V, Thaker R, Gor M, Perumal S, Joshi P, Sheth H, Shaikh I, Gautam A, Verma Y (2018) Role of environmental factors & oxidative stress with respect to in vitro fertilization outcome. *Indian J Med Res* 148(Supplement):125–133. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1864\\_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1864_17)
16. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J (2012) The oocyte. *Hum Reprod* 27(S1):i2–i21 <https://doi.org/10.1093/humrep/des200>
17. Galusha A, Haig A, Bloom M, Kruger P, McGough A, Lenhart N, Wong R, Fujimoto Y, Mok-Lind E, Parsons P (2019) Ultra-trace element analysis of human follicular fluid by ICP-MS/MS: pre-analytical challenges, contamination control, and matrix effects. *J Anal At Spectrom* 34:741. <https://doi.org/10.1039/C8JA00423D>
18. Sun Y, Wang W, Guo Y, Zheng B, Li H, Chen J, Zhang W (2019) High copper levels in follicular fluid affect follicle development in polycystic ovary syndrome patients: Population-based and in vitro studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 365:101–111. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.008>
19. Rodríguez-Díaz R, Blanes Zamora R, Vaca Sánchez R, Gómez Rodríguez J, Hardisson A, González Weller D, Gutiérrez AJ, Paz S, Rubio C, González Dávila E (2022) Influence of seminal metals on assisted reproduction outcome. *Biol Trace Elem Res*. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03256-w>
20. Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción (2015) *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*. España. 3ª ed, p 94
21. Rodríguez-Díaz R, Alcaide-Ruggiero L, Rodríguez-Fiestas S, Hess-Medler S, González-Pérez J, Gutiérrez A, Hardisson A, Rubio C, Paz S, González-Weller D, Blanes-Zamora R (2021) Associations of semen quality with seminal non-essential heavy metals in males from the Canary Islands. *Biol Trace Elem Res* 199(12):4525–4534. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02605-5>
22. Butts C, Bloom M, McGough A, Lenhart N, Wong R, Mok-Lin E, Parsons P, Galusha A, Yucler R, Feingold B, Browne R, Fujimoto V (2021) Variability of essential and non-essential trace elements in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Ecotoxicol Environ Saf* 209:111733. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111733>
23. El Mohr M, Faris M, Bakry S, Hozyen H, Elshaer F (2020) Effect of heavy metals levels in follicular fluid on ICSI outcome. *Egypt Acad J Biol Sci (C Physiology and Molecular Biology)* 12(2):87–95
24. Silberstein T, Saphier O, Paz-Tal O, González L, Keefe DL, Trimarchi JR (2009) Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. *Fertil Steril* 91(5):1771–1774. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.007>
25. Wu S, Wang M, Deng Y, Qiu J, Zhang X, Tan J (2020) Associations of toxic and essential trace elements in serum, follicular fluid, and seminal plasma with In vitro fertilization outcomes. *Ecotoxicol Environ Saf* 204:110965. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110965>
26. Zhou L, Liang K, Li M, Rong C, Zheng J, Li J (2021) Metal elements associated with in vitro fertilization (IVF) outcomes in 195 couples. *J Trace Elem Med Biol* 68:126810. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126810>
27. Zafar A, Mustjab S, Eqani A, Bostan N, Cincinelli A, Tahir F, Abbas S, Shah S, Hussain A, Alamdar A, Huang Q, Peng S, Shen H (2015) Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility. *Environ Geochem Health* 37:515–527. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9666-8>
28. Niehoff N, Keil A, O'Brien K, Jackson B, Karagas M, Weinberg C, White A (2020) Metals and trace elements in relation to body mass index in a prospective study of US women. *Environ Res* 184:109396. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109396>
29. Al-Gubory K (2014) Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod BioMed Online* 29(1):17–31. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.03.002>
30. Freitas C, Neto A, Matos L, Silva E, Ribeiro A, Silva-Carvalho J, Almeida H (2017) Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *Journal of Ovarian Research* 10:44. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109396>
31. Tulić L, Vidaković S, Tulić I, Čurčić M, Bulat Z (2019) Toxic metal and trace element concentrations in blood and outcome of

- in vitro fertilization in women. *Biol Trace Elem Res* 188:284–294. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1421-z>
32. Skalnayaa M, Tinkova A, Lobanova Y, Changd J, Skalnaya A (2019) Serum levels of copper, iron, and manganese in women with pregnancy, miscarriage, and primary infertility. *J Trace Elem Med Biol* 56:124–130. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.08.009>
  33. Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K (2013) Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol* 42:116–124. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.005>
  34. Sánchez AM, Papaleo E, Corti L, Santambrogio P, Levi S, Viganò P, Candiani M, Panina-Bordignon P (2014) Iron availability is increased in individual human ovarian follicles in close proximity to an endometrioma compared with distal ones. *Hum Reprod* 29:577–583. <https://doi.org/10.1093/humrep/det466>
  35. Wakai T, Mehregan A, Fissore R (2019) Ca<sup>2+</sup> Signaling and homeostasis in mammalian oocytes and eggs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a035162 <http://cshperspectives.cshlp.org/o>
  36. Özdamar O, Gün I, Hira S, Devranoglu B (2015) Assessment of the relationship between follicular fluid calcium ion concentration and reproductive outcomes. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol* 4(6):1984–1987. <https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20151299>
  37. Xu Z, Yao G, Niu W, Fan H, Ma X, Shi S, Jin H, Song W, Sun Y (2021) Calcium ionophore (A23187) rescues the activation of unfertilized oocytes after Intracytoplasmic Sperm Injection and Chromosome Analysis of Blastocyst After Activation. *Front Endocrinol* 12:692082. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.692082>
  38. Ebner T, Oppelt P, Wöber M, Staples P, Mayer RB, Sonnleitner U, Bulfon-Vogl S, Gruber I, Haid AE, Shebl O (2015) Treatment with Ca<sup>2+</sup> ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study. *Hum Reprod* 30(1):97–102. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu285>
  39. Pogorelov AG, Smirnov AA, Pogorelova VN (2017) High potassium concentration during culturing of early mammalian embryo: normal or extreme situation? *Cell Technologies in Biology and Medicine* 1:163–168. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3758-2>
  40. Fujishima A, Takahashi K, Goto M, Hirakawa T, Iwasawa T, Togashi K, Maeda E, Shirasawa H, Miura H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y (2021) Live visualisation of electrolytes during mouse embryonic development using electrolyte indicators. *PLoS One* 16(1):e0246337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246337>
  41. Wargala E, Sławska M, Zalewska A, Toporowska M (2021) Health effects of dyes, minerals, and vitamins used in cosmetics. *Women* 1:223–237. <https://doi.org/10.3390/women1040020>
  42. Djuricic S, Jakobsen JC, Petersen SB, Kenfelt M, Klingenberg SL, Gitud C (2018) Aluminium adjuvants used in vaccines. *Cochrane Database Syst Rev* 2(7):CD013086. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013086.PMCID:PMC6373706>
  43. Fedele D, De Francesco A, Riso S, Collo A (2021) Obesity, malnutrition, and trace element deficiency in the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: an overview. *Nutrition* 81:111016. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.111016>
  44. Abudawood M, Tabassum H, Alanazi A, Almusallem F, Aljaser F, Naiman M, Alenzi N, Alanazi S, Alghamdi M, Altoum G, Alzeer M, Alotaibi M, Abudawood A, Ghneim H, Abdullah L, Al-Nuaim L (2021) Antioxidant status in relation to heavy metals induced oxidative stress in patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *Sci Rep* 11:22935. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02120-6>
  45. Karaer A, Tanrikut E, Urhan R, Rukiye DU, Bahar Ö, Onal Y (2014) The role of the blood metal concentrations in the etiology of unexplained infertility. *Reprod BioMed Online* 28:S14–S15

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.