

MENOPAUSIA: NUEVOS CONOCIMIENTOS Y DERIVACIONES TERAPÉUTICAS

MENOPAUSE: NEW KNOWLEDGE AND THERAPEUTICAL CONSEQUENCES

POR EL EXCMO. SR. D. JESÚS A. FERNÁNDEZ-TRESGUERRES HERNÁNDEZ,
S. PAREDES, L. RANCAN, C. BORRAS, E. VARA, R. NUÑEZ

Académico de Número. Dpto. Fisiología y Depto. de Bioquímica, Fac.
Medicina¹, U.C.M. y Clínica Tambre Madrid, Depto. de Fisiología Facul-
tad de Medicina³ Universidad de Valencia.

Resumen

A lo largo del presente trabajo se estudian a la luz de las más recientes investigaciones los procesos que conducen a la aparición de la menopausia en la mujer y las posibilidades de retrasar o interferir dicho proceso. En esta parte se analizan concretamente los mecanismos que contribuyen al envejecimiento de los ovarios y las razones para que este proceso sea más o menos rápido en las distintas mujeres, determinando los parámetros de estrés oxidativo de inflamación y apoptosis que tienen lugar en los folículos ováricos estudiando asimismo en dichas estructuras foliculares la producción de antioxidantes. Se analizan también los tratamientos actualmente vigentes para disminuir en lo posible la sintomatología que aparece en función de la disminución de niveles estrogénicos con sus pros y sus contras.

Abstract

In the present paper the most recent results of the research carried out to investigate the processes that lead to the appearance of menopause in women have been reviewed and also the possibilities to retard or interfere these processes. More concretely in this part the mechanisms that contribute to the aging of the ovaries and the reasons for the quicker or slower pace of these processes in the different women are studied by determining oxidative, inflammation and apoptosis parameters in the ovarian follicles and also by measuring in these structures the production of antioxidants. The actually in use treatments to reduce the symptoms that appear in menopause due to the lack of estrogens are also analyzed with its pros and cons.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, la menopausia se define como el cese permanente de la menstruación derivado de la pérdida de la actividad folicular del ovario. (Ausin 1992) El proceso no es brusco y viene precedido de un período de transición denominado perimenopausia, que puede oscilar entre 2 y 8 años durante el cual se produce inicialmente un acortamiento de la longitud de los ciclos menstruales por una disminución de la fase folicular, con incremento de la FSH como compensación de la disminución del número de folículos presentes en el ovario o una reducción en la secreción de inhibina (Tresguerres *et al.* 2000).

La edad media de la menopausia son los 51 años, con un intervalo que oscila entre los 35 y los 58. (Celades 1992) Los factores que pueden contribuir a la aparición más o menos tardía de la menopausia fisiológica no están totalmente clarificados. (Tresguerres 2008).

Progresivamente, aparecen baches amenorreicos intercalados con ciclos cortos y también con ciclos normales ovulatorios. En esta fase pueden aparecer ya síntomas clínicos en forma de sofocos y menorragias por hiperplasia endometrial que aparece por déficit de progesterona. La última etapa de la perimenopausia se caracteriza por la ausencia de ovulación y por concentraciones de estradiol inferiores a 20 pg/mL (73 pmol/L).

Según el conocimiento vigente hasta hace muy poco la menopausia se produce por el agotamiento definitivo de la reserva folicular ovárica, lo que supone la pérdida de la capacidad reproductiva, y además como la producción hormonal de la gónada femenina está ligada a las células del folículo, el agotamiento de estos conlleva toda una serie de cambios en la secreción de los esteroides ováricos que llega a ser insuficiente para mantener el retrocontrol (feed back) sobre las gonadotropinas hipofisarias, lo cual implica un aumento paralelo de FSH y LH (Tresguerres *et al.* 2000).

Las principales hormonas femeninas y por lo tanto antiandrogénicas, se dan en los ovarios durante la época reproductiva. Cuando esta cesa el déficit de estrógenos y progesterona que ocurre al desaparecer los folículos ováricos, condiciona un aumento de la actividad de la androstenediona y la testosterona sobre sus receptores. Por este motivo, es frecuente encontrar durante la postmenopausia una relativa androgenización. (Tresguerres 1992).

La edad media a la cual la mujer alcanza la menopausia varía en los diferentes estudios publicados. La O.M.S. asigna la edad de 50 años para

la mujer occidental y el estudio Massachusetts, uno de los más importantes da una edad media para la menopausia de 51,3 años. Si se produce antes de los 40 años se considera una menopausia precoz, lo cual afecta al 1 -3% de las mujeres que pueden sufrir un fallo ovárico precoz que les situará en condiciones de hipoestrogenismo de forma prematura (Cohen y Speroff 1991).

Hay casos de menopausia precoz sin origen determinado donde últimamente ha empezado a ganar importancia la posibilidad de que se deba a la existencia de un aumento del estrés oxidativo ovárico. (Cohen y Speroff 1991).

Las manifestaciones clínicas de la menopausia ocurren por la disminución de las hormonas sexuales femeninas. (Tresguerres *et al.* 2000) que desarrollan además de los conocidos efectos en el sistema reproductor toda otra serie de acciones que se ejercen sobre los vasos sanguíneos y el corazón, donde es perfectamente reconocible su acción antioxidante y facilitadora de una función cardiovascular normal, (Borras *et al.* 2003).y sobre los lípidos plasmáticos donde genera una disminución de los mismos y sobre el SNC, donde ejercen una acción neuroprotectora (García Segura *et al.* 2001).

El déficit estrogénico tiene una presentación gradual en el tiempo y sus efectos pueden dividirse en función del momento de aparición: a corto, medio o largo plazo.

Las crisis vasomotoras (sofocos) son oleadas de calor y rubor que afectan fundamentalmente a la piel del pecho, cuello y cara que se acompañan de sudoración profusa, y en ocasiones de palpitaciones.

La respuesta simpaticomimética que aparece con la menopausia implica la posibilidad de aparición de palpitaciones por aceleración del ritmo cardíaco. También hay otras alteraciones neurovegetativas, menos frecuentes, como cefaleas y náuseas o vértigo. (Palacios *et al.* 2000).

Aparecen además una serie de síntomas psicológicos como la irritabilidad y el nerviosismo (alrededor de un 40% de las mujeres), estado de ánimo depresivo (30-40%), astenia (30-40%), disminución del rendimiento, insomnio y descenso del deseo sexual.

Hay atrofia a nivel de las mucosas vulvar y vaginal que afectan tanto a su aspecto como a su funcionalismo.

Desde etapas iniciales hay disminución de las secreciones de la mucosa lo que provoca sequedad vaginal en el 25% de las mujeres perimenopáusicas. Los genitales externos sufren también modificaciones, provocando además la disminución del vello. (Semmens y Wagner 1982).

En las vías urinarias inferiores, el adelgazamiento de la mucosa y el déficit circulatorio submucoso, provocan atrofia con incontinencia urinaria, escozor vaginal y/o vulvar y disuria. (Bhatia *et al.* 1989, Smith 1993).

La menopausia favorece la sequedad de la piel y la aparición de arrugas como consecuencia de la atrofia epitelial y el consiguiente adelgazamiento de la piel (Castelo Branco 1992, Tresguerres Centeno 2006, Montagna y Carlisle 1990).

Durante los primeros 20 años tras el cese de las menstruaciones, aparece una pérdida importante de masa ósea, que puede llegar a suponer una reducción del 50% del hueso trabecular y de un 30% del hueso cortical. Esta situación se denomina osteoporosis y consiste la reducción de la estructura mineral ósea por lo que el hueso tiene una mayor fragilidad y se incrementa el riesgo de fracturas (Kanis 1998, Palacios *et al.* 2000).

Los estrógenos reducen los niveles plasmáticos de colesterol LDL e incrementan las HDL con lo cual disminuyen el riesgo cardiovascular Losordo *et al.* (1994). Es necesario mencionar el papel de los estrógenos como agentes antioxidantes (Borras 2003), ya que pueden prevenir la oxidación de las LDL, disminuyen la producción de O_2^- y peroxinitritos, y mejoran la biodisponibilidad de NO (Vanhoutte 1990). Si el endotelio vascular funciona correctamente la acetilcolina determina vasorrelajación, a través de NO () pero si este se encuentra alterado se produce constricción La acción vasodilatadora de la acetilcolina es por lo tanto un índice de la integridad funcional del endotelio vascular y éste se encuentra alterado tanto en la menopausia (Vanhoutte 1990), como también en la arterioesclerosis. La administración de estrógenos es capaz de revertir la vasoconstricción inducida por acetilcolina en situación de menopausia. (Ho *et al.* 2006), lo cual supone que tiene un efecto muy beneficioso sobre el funcionalismo vascular. Por un lado existe una modificación favorable del patrón lipídico (Walsh *et al.* 1991) y se inhibe la hiperplasia endotelial (Fisher *et al.*, 1981).

Entre las mujeres premenopaúsicas, la enfermedad coronaria es extremadamente rara sin embargo en las mujeres postmenopáusicas la incidencia de enfermedad cardiovascular es mucho mayor. (Nabulsi *et al.* 1993). La disminución de la secreción de estrógenos durante la menopausia determina un aumento de las enfermedades cardiovasculares, una alteración del perfil lipídico y un aumento de las alteraciones cerebro-vasculares. (Kannel 1987).

En la mujer se puede producir una redistribución de la grasa corporal al llegar la menopausia que supone un aumento de los depósitos en el tronco. La grasa central aumentada se relaciona con aumentos del colesterol total, LDL-c y triglicéridos, con una disminución de los niveles de HDL-c y probablemente con cierta resistencia a la insulina. (Hong *et al.* 1992).

La tensión arterial aumenta con la edad, siendo el incremento más llamativo en la mujer a partir de la última regla. Parte de la protección cardiovascular puede deberse al efecto de los estrógenos sobre el mantenimiento de la tensión arterial, ejercido a través de receptores para hormonas femeninas que hay en el endotelio y en las fibras musculares lisas de las arterias. (Losordo *et al.* 1994).

TRATAMIENTO HORMONAL SUSTITUTIVO (THS)

El tratamiento tiene que ir encaminado a resolver la sintomatología clínica, en primer lugar (sofocos, depresión, algias articulares, calidad de vida, incontinencia urinaria, sequedad vaginal) y en segundo lugar tiene que ser capaz de limitar la aparición de problemas óseos (osteoporosis) y cardiovasculares (infarto de miocardio, u otros) (Hulley *et al.* 1998).

El tratamiento que ha venido utilizándose desde hace muchas décadas es el denominado tratamiento de sustitución hormonal (THS) con estrógenos solos en caso de ausencia uterina o bien estrógenos combinados con progestágenos, si hay útero (Palacios *et al.* 2000).

En el caso de los estrógenos, se utilizan los conjugados equinos (Equin0,6) por vía oral o diversos parches transdérmicos de estradiol. El progestágeno con menos problemas en la actualidad es la progesterona micronizada, que se puede dar por vía oral, vaginal y transdérmica..(Goodman 2012, Stevenson 2009).

La transformación de estradiol a estrona es máxima en los tratamientos de sustitución por vía oral, mientras que es mínima en la vía transdérmica y la nasal (Palacios *et al.* 2000). Como la afinidad por los receptores es distinta para los dos compuestos en cada subtipo de receptor, esto también influye en la acción biológica, que presenta diferencias con los distintos tipos de medicación.

Los tratamientos se realizan de forma continua en el caso de ausencia uterina, y de forma secuencial en presencia del mismo, remediando los ciclos naturales con progestágenos en las dos últimas semanas de

tratamiento para evitar la hiperplasia del endometrio y su posible ulterior malignización. Se ha observado un efecto positivo sobre estructura y función carotídea utilizando parches transdérmicos de estradiol (Sumino *et al.* 2005). Probablemente los efectos no favorables encontrados en los estudios HERS y WHI podrían deberse al hecho que el tratamiento comienza tarde con lo que ya ha podido instaurarse la arterioesclerosis, con aparición de placas de ateroma. Cuando los estrógenos empiezan a hacer efecto estas podrían liberarse como consecuencia paradójica de la mejoría vascular y dar lugar a problemas cardio o cerebrovasculares. (Tresguerres *et al.* 2007).

El THS contribuye a la desaparición de los sofocos, lo que repercute de forma positiva en los trastornos del sueño y en la calidad de vida de la mujer. El THS repercute de forma positiva sobre las enfermedades mentales durante la postmenopausia. La demencia y la enfermedad de Alzheimer ocurren menos frecuentemente en usuarias de terapia estrogénica y la piel mejora de forma evidente

La administración de estrógenos determina el incremento de sus receptores a nivel de la vagina, uretra y vejiga. (Kuiper *et al.* 1997) En menos de un mes, se observa una disminución de la sequedad vaginal y un aumento de la lubricación que contribuyen a la desaparición del prurito o escozor y de molestias en las relaciones sexuales. La mejor irrigación de las mucosas favorece el aumento de grosor de la mucosa vaginal. El tratamiento estrogénico determina un aumento del espesor de la mucosa uretral con lo que disminuye la incontinencia urinaria.

Los estrógenos poseen un efecto antioxidante y antiaterogénico en la pared vascular, inhibiendo el acúmulo de LDL-colesterol (Borras *et al.* 2003). Además, inhiben la agregación plaquetaria y favorecen la vasodilatación arterial, actuando sobre factores (Hong *et al.* 1998) endoteliales como el óxido nítrico o las prostaciclinas. Se venía considerando que el tratamiento hormonal sustitutivo era capaz de reducir el riesgo cardiovascular entre un 45 y un 63% mediante sus efectos beneficiosos tanto sobre el perfil lipídico, como a través de sus acciones sobre la pared vascular. De hecho se consideraba que la protección contra las enfermedades cardiovasculares era el mayor beneficio del THS. (Hulley *et al.* 1998).

Se habían visto valores más elevados de HDL-colesterol con este tratamiento en multitud de estudios observacionales y una mayor protección ante la oclusión de arterias coronarias medida por angiografía. (Vanhouste 1990) Aunque todos los datos experimentales confirman el efecto beneficioso de los estrógenos sobre los vasos sanguíneos, aumen-

tando su capacidad de dilatación, disminuyendo su capacidad de constricción (Stevenson 2012), disminuyendo las placas de ateroma y disminuyendo también los niveles de lípidos plasmáticos, en los dos ensayos clínicos doble ciego mencionados y con una población elevada el HERS (2800 mujeres con manifestaciones previas de alteraciones vasculares) y el WHI (16000 mujeres) (Rousow *et al.* 2002, Lemay 2002) no ha podido constatar el efecto beneficioso en este terreno. Más aún, se ha observado una mayor incidencia de problemas lo que ha dado lugar a un replanteamiento de dicho tratamiento. (Nelson *et al.* 2002).

En ambos estudios la administración de estrógenos y progestágenos se hizo utilizando estrógenos conjugados equinos por vía oral y progevera (acetato de medroxiprogesterona) como progestágeno, administrados de forma conjunta permanente, con lo que algunos de los problemas encontrados podrían deberse precisamente a esta circunstancia. De hecho, los datos de la rama del WHI que utilizan el tratamiento con estrógenos solos por tratarse de mujeres histerectomizadas, no muestran esas tendencias negativas (Lyytinen *et al.* 2006).

También hay que tener en cuenta, que no es lo mismo comenzar un tratamiento THS, en fase perimenopausica, que 10 años más tarde, y la aparición de problemas cardiovasculares ha sido mayor precisamente en el grupo de comienzo tardío. (Harman *et al.* 2005b). Ello es debido a que cuando ya ha transcurrido un tiempo importante desde la ausencia estrogénica aparecen placas de ateroma sobre unas paredes rígidas arteriales. Con el tratamiento estrogénico, las paredes arteriales vuelven a ser flexibles por lo que las placas pueden soltarse y dar lugar a eventos cardio o cerebrovasculares. (Stevenson 2012).

Efectos sobre la masa ósea

El THS frena la pérdida de masa ósea por lo cual previene la osteoporosis. Con la terapia estrogénica se reduce el riesgo de fractura de cadera en un 50-60%. (Kiel *et al.* 1987).

Se recomienda el tratamiento estrogénico lo más temprano posible tras la privación hormonal. Su efecto sobre el hueso se mantiene mientras haya niveles estrogénicos adecuados en sangre. Estos niveles se ha visto que pueden disminuirse de forma importante sin que se comprometa su acción positiva (García Pérez *et al.* 2006)

Ademas se debe dar en asociación con un suplemento de calcio de hasta 1500 mg/día. El tratamiento produce también una mejora en la absorción intestinal de calcio, que hace posible la suplementación con dosis mas bajas (Liel *et al.* 1992).

Efectos secundarios

Los meta-análisis realizados parecen revelar un ligero incremento del riesgo relativo (aproximadamente 1,3) de la incidencia de cáncer de mama aunque en ningún caso, de la mortalidad por este hecho. También aparece un mayor incremento de cáncer endometrial pero solo cuando se hacen tratamientos estrogénicos sin oposición gestagénica en mujeres con útero. (Tresguerres 2008)

Debemos considerar pues obligatoria la vigilancia de la mama, mediante un control mamográfico anual y tener siempre en cuenta la relación riesgo-beneficio (Ruan *et al.* 2012) Sin embargo tenemos que tener en cuenta que no es lo mismo el tipo de tratamiento que se lleva a cabo en EEUU con estrógenos equinos orales y progestágeno de síntesis (acetato de medroxiprogesterona: Progevera) que el que se realiza actualmente en Europa con parches transdérmicos de estradiol y progesterona natural micronizada. Este último tipo de tratamiento no parece que lleve aparejado riesgos adicionales de cáncer de mama mientras que el primer tipo si lo hace. (Lignieres *et al.* 2002, Goodman 2012) El efecto de primer paso a nivel hepático y las características del progestágeno parecen jugar un papel preponderante puesto que no aparecen con estrógenos solos o con progesterona micronizada. (Schmidt *et al.* 2006).

La vía percutánea en parches es la de elección hoy día ,ya que evitan el efecto de primer paso por el hígado con lo que afectan menos la función hepática con la correspondiente síntesis de proteínas relacionadas con la coagulación. Concretamente hay datos de incremento de proteína C reactiva con el uso de estrógenos por vía oral que no aparecen cuando se usa la vía transdérmica (Ho *et al.* 2006, Fait *et al.* 2006). El progestágeno que se prefiere hoy es la progesterona micronizada a una dosis de 200-400 mg/día por vía vaginal u oral, durante los 10-12 días finales de cada ciclo estrogénico (Lignieres *et al.* 2002, Fournier *et al.* 2008). También pueden administrarse conjuntamente con los estrógenos y de forma continuada, siendo en este caso menor la dosis de progestágeno que se utiliza (200mg/día). La administración cíclica conduce a hemorragia mensual, mientras

que con la administración continua no suele producirse. La administración de progestágenos puede obviarse en ausencia de útero.

SERMs Hemos visto como la acción de los estrógenos está mediada por dos tipos de receptores diferentes $ER\alpha$ y $ER\beta$, que determinan acciones distintas dependiendo del tejido donde actúan. Existen también diferentes compuestos no esteroideos que pueden producir efectos estrogénicos selectivos dependiendo del tipo celular en el que ejercen su acción. Son los denominados SERMs (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos) que presentan efectos anti-estrogénicos de gran interés farmacológico y clínico, unidos a acciones estrogénicas beneficiosas en otros tejidos como vasos sanguíneos o hueso. Así, el tamoxifeno actúa como un antagonista puro del receptor de estrógenos en la mama, inhibiendo el crecimiento de la mayoría de los tumores mamarios pero sin embargo a nivel endometrial estimula su hiperplasia. Más recientemente se ha desarrollado otro SERM llamado raloxifeno que no solo disminuye el cáncer de endometrio y el de mama, sino que también tiene efectos beneficiosos sobre la osteoporosis. El toremifeno es otro SERM más reciente aún. Existe la posibilidad de obtener SERMs ideales que se puedan utilizar en terapias de reemplazamiento hormonal para prevenir la osteoporosis y las alteraciones vasculares de la menopausia y reducir la incidencia de cáncer de mama y endometrio sin otros efectos secundarios significativos. La existencia de las dos isoformas de los ERs, (Kuiper *et al.* 1997, 1998) ha creado además la oportunidad de obtener ligandos específicos para cada una de ellas. Sería posible, por ejemplo, el desarrollo de un antagonista específico del $ER\alpha$ para prevenir el cáncer de mama, o de un agonista específico del $ER\beta$ con efectos beneficiosos en el sistema nervioso.

NUEVAS TEORÍAS SOBRE LA MENOPAUSIA

Durante muchos años todos los médicos involucrados en el estudio de la reproducción habíamos aceptado la teoría, que la producción de gametos en el ovario ocurría exclusivamente durante el periodo intrauterino. Que al final del 5º mes las células del saco vitelino que habían colonizado la cresta genital se habían dividido dando origen a oocitos que iniciaban la meiosis y quedaban bloqueados en la fase de leptotene en la cortical del ovario. Estos oocitos rodeados por una capa de células epiteliales planas daba origen a los folículos primordiales ováricos de los

que podían contarse hasta 6 millones en el 6º mes de vida embrionaria. (Findlay *et al.* 2015).

El número de folículos primordiales que constituyen la «reserva ovárica» es un importante determinante de la longitud de la vida del ovario y por lo tanto de la fertilidad del individuo. El número máximo se establece durante la vida intrauterina en el 5º mes de embarazo. En condiciones fisiológicas el número dependerá de las células germinales primordiales que aparecen en el epiblasto del embrión que migraran a las gónadas en desarrollo. (Findlay *et al.* 2015) y que se encuentran sometidas a atresia generalmente por autofagia.

Una parte de estos folículos va a sufrir procesos de apoptosis de forma que en el momento del nacimiento solo quedan 2.000.000. De estos a su vez en la pubertad solo hay medio millón que son los que van a iniciar los procesos de reclutamiento, desarrollo y dominancia dando lugar a los ciclos menstruales con las variaciones hormonales asociadas que suponen aumento de estrógenos en la primera fase del ciclo y a partir de la ovulación de nuevo aumento de estrógenos y esta vez también con progesterona. Al final del ciclo disminuyen todas las hormonas y comienza un nuevo ciclo con el reclutamiento de varias docenas de folículos que van a seguir todo el proceso de nuevo.

De esta forma transcurridos 35 años de vida fértil, se agotaría la población de folículos y aparecería la menopausia.

En la especie humana y también en la ratona, las cantidades de folículos primordiales que se forman en la etapa prenatal y luego en la etapa reproductiva se encuentran frenadas en su ulterior desarrollo por la hormona Antimülleriana. Si eliminamos esta hormona mediante un KO para la misma los folículos maduran de forma explosiva de manera que desaparecen en semanas generando un equivalente a la menopausia precoz. (Rodrigues *et al.* 2008).

Sin embargo recientemente (Bukovsky & Caudle 2012) ha conseguido demostrar de forma evidente que durante el periodo que va desde la menarquia hasta los 38 años más o menos se produce un nuevo periodo de producción de gametos femeninos a partir de células troncales ováricas que están presentes en la falsa túnica albugínea del ovario. Estos datos han sido también constatados por (Gougeon 2015).

Estas células troncales van a seguir dos caminos paralelos en su evolución de forma que van a conducir por un lado y gracias a su migración directa hacia la cortical ovárica, a la aparición de las células granulosas que primero forman una especie de cordones celulares (Bukovsky 2011)

y luego forman una especie de nidos a donde van a alojarse los oocitos con lo que estos quedan rodeados por dichas células granulosas. Por el otro, y a través de una migración a través del sistema vascular intraovarico y con la colaboración de niveles hormonales adecuados y la de células del sistema inmunitario, a la aparición de los propios oocitos que se alojaran en los nidos de células granulosas.. De esta forma existe un nuevo periodo durante el cual se vuelve a reanudar la formación de folículos ováricos entre los 15 y los 38 años.

El propio Bukovsky (2015) señala la necesidad de disponer de un sistema inmunitario en pleno funcionamiento para que se verifique la oogenesis durante el denominado «prime time» reproductivo. De hecho, aunque en la túnica albugínea de los ovarios de las mujeres menopáusicas siguen existiendo células troncales (Joo *et al.* 2014, Bhartiya *et al.* 2016) estas no son capaces de derivar hacia oocitos y células granulosas precisamente porque el sistema inmunitario ya ha disminuido su función (Gaytan *et al.* 1994). De hecho si cultiva las células troncales en presencia de células mononucleares y Th8 consigue restablecer la formación de folículos con posibilidad de fecundación. (Gilrichst *et al.* 2004, Bukovsky 2016). Incluso es más, simplemente con la transfusión de una cantidad pequeña (500 ml) de sangre procedente de una mujer joven en la mitad de la fase folicular se puede conseguir de nuevo fertilidad en mujeres menopáusicas. Esto se puede conseguir también transplantando solo los monocitos y células asociadas. (Bukovsky 2015). Esto se basa en datos previos de Kaiser (2014) y de Villeda *et al.* (2014) que demostraron en otros modelos de envejecimiento el poder rejuvenecedor de las transfusiones de sangre de individuos jóvenes a viejos.

La oogenesis de los mamíferos que conduzca a disponer de oocitos fertilizables es un complejo fenómeno que lleva aparejada la interacción de diferentes tipos celulares a la vez que una muy precisa relación recíproca entre oocito y folículo con variedad de nutrientes, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas en función de la fase de desarrollo en que se encuentren. (Wang *et al.* 2017) pero que puede ser reproducido *in vitro*.

La criopreservación de oocitos y de ovarios es hoy en día la manera en que se puede preservar o restaurar la función reproductiva en mujeres que han sido sometidas a tratamientos que conducen a una esterilidad total o parcial. La tecnología que permite la preservación de los oocitos conocida como banco de huevos es también la vía para mantener la biodiversidad de organismos raros, o en peligro de extinción o también para la cría de individuos con interés médico o agrícola.

La clave es que la oogenesis es un proceso gradual en el que se van adquiriendo en diferentes etapas de diferenciación las propiedades necesarias para presentar capacidad de desarrollo de manera que son especialmente importantes los momentos en que las diferentes estrategias de intervención se llevan a cabo para conseguir la calidad oocitaria deseada en cada caso. (Rodrigues *et al.* 2008).

Si se transplantan células troncales procedentes del líquido amniótico (Xiao *et al.* 2014) o de medula ósea (Lee *et al.* 2007) procedentes de hembras fértiles a la sangre de hembras sometidas a irradiación ovárica y por lo tanto estériles, dan lugar a la formación en dichos ovarios de folículos que son potencialmente fecundables. Como se ha visto en los experimentos de estos autores donde se consiguen crías con coloración de proteína verde fibrilar (Xiao *et al.* 2014). Esto indicaría la existencia en líquido amniótico y en la medula ósea de células vinculadas al ovario.

También si se transplantan células troncales ováricas (OSC) procedentes de los ovarios de una ratona transfectada con proteína fibrilar verde a los ovarios de una ratona irradiada de forma que sus ovarios no tiene folículos de ninguna clase los folículos se desarrollan y si esta hembra se cruza da lugar a crías con el marcaje correspondiente. (Abban y Johnson 2009, Silvestris *et al.* 2015).

Estos datos extremadamente recientes abren nuevas perspectivas a todo lo que significa por un lado prolongar los años de fertilidad en fallo oarico precoz e incluso en la menopausia normal propiamente tal.

MENOPAUSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Hay muchas evidencias que sugieren que el declive en la función ovárica que tiene lugar en la menopausia se asocia a un incremento espontáneo del estrés oxidativo y de las citoquinas pro-inflamatorias en dicho órgano. La deficiencia de estrógenos también parece aumentar la respuesta inflamatoria celular a través de estas citoquinas mediante el estímulo del número de receptores y otros cofactores, potenciando de esta forma sus efectos [Pfeilschifter 2002].

Existe una disminución de la función mitocondrial con la edad, y más concretamente una disminución de la expresión de varios genes que codifican algunas de las proteínas que intervienen en la síntesis de ATP. Este fenómeno puede deberse al incremento de estrés oxidativo que se puede observar en el líquido folicular.

Alrededor de un 2% del oxígeno empleado por la mitocondria no es reducido completamente, «escapando» del sistema en forma de radicales libres $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 .

El organismo ha desarrollado mecanismos de defensa, generalmente conocidos como *antioxidantes*, para protegerse de la acción de dichos radicales. El «modus operandi» es o bien evitar su formación, o neutralizarlos o facilitar la reparación del daño inducido. Estos antioxidantes están constituidos fundamentalmente por: Superóxido dismutasa (SOD) que constituye al primera línea de defensa enzimática frente a la producción de radicales intracelulares.

Glutatión peroxidasa (GPx) La GPx cataliza la reducción del H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos a H_2O y alcohol, respectivamente, usando glutatión reducido (GSH) como donante de electrones.

Catalasa (CAT). Este enzima cataliza la descomposición de H_2O_2 a H_2O . Se localiza principalmente en los peroxisomas, y su distribución tisular es similar a la de SOD. Glutatión Se trata de un tripéptido tiólico presente en la mayoría de las células de animales y plantas (Ji y Hollander, 2003). Que interviene en reacciones redox. Es uno de los antioxidantes más abundante de la célula, reaccionando directamente con los radicales libres, o bien por medio de la GPx.

El estrés oxidativo tiene lugar cuando exista un exceso de producción de especies reactivas, a una deficiencia de agentes antioxidantes, o a una conjunción de ambas circunstancias.

Las especies reactivas, y especialmente el radical $\cdot\text{OH}$, reaccionan con los dobles enlaces de las bases púricas y pirimidínicas del DNA, generando derivados con alta capacidad mutagénica. De especial importancia es el daño inducido al DNA mitocondrial (mtDNA), ya que está expuesto a gran cantidad de especies reactivas generadas durante la respiración mitocondrial (Shigenaga y cols., 1994).

Daño oxidativo a lípidos: peroxidación lipídica. Se trata de un proceso por el cual los lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son atacados por radicales libres, originando una reacción en cadena que se autopropaga hasta oxidar; teóricamente, todos los ácidos grasos del sistema afectado (membrana celular, membrana mitocondrial, etc.). (Oh-ishi y cols., 2003; Mallol Mirón y cols., 2004).

Oxidación de proteínas El daño oxidativo afecta también a las proteínas, alterando su estructura y función. Estos procesos inducen alteraciones de la estructura función de las proteínas alteradas, lo que afectaría a la fisiología celular (Quiles y cols., 2004; Sastre y cols., 2000).

Estrés oxidativo y ovario

Se ha visto que existe una disminución de la función mitocondrial con la edad en varios tejidos, y más concretamente una disminución de la actividad de varios enzimas mitocondriales y de algunos elementos de la cadena de transporte electrónico.

El líquido folicular supone el microambiente específico para el desarrollo del oocito (Agarwal *et al.* 2003). Y tiene un importante papel en su calidad, implantación y desarrollo temprano. Este entorno, unido a las células granulosas, esteroides y factores de crecimiento contiene leucocitos y macrófagos y citoquinas que son productores de ROS. (Attaran *et al.* 2000). Un desequilibrio en la producción de ROS bien sea por dichos elementos o por un metabolismo alterado en el líquido folicular puede tener un efecto adverso sobre todos los procesos mencionados.

El aumento de radicales libres puede ser tóxico para la formación del embrión mientras que unos niveles fisiológicos de ROS puede ser indicativo de oocitos sanos que se desarrollan normalmente [Jana *et al.* 2010]. Por eso el estudio que hemos llevado a cabo ha sido medir los parámetros de estrés oxidativo en el líquido folicular de donantes de oocitos sanos y jóvenes y compararlos con dichos parámetros medidos en pacientes de menos de 35 años con baja respuesta a las gonadotropinas. Se han medido, TNF alfa, IL1, IL 6, Malonildialdehído, VEGF etc que se viene usando como marcadores en muchos tejidos en alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo [Shacter 2000; Dalle-Donnel *et al.* 2003; Cherubinia *et al.* 2005; Lykkesfeldt 2007].

El folículo antral la diferenciación de las células somáticas que rodean al oocito a células del cúmulo es esencial para el desarrollo y viabilidad del oocito (Eppig *et al.* 1996. Dumesic *et al.* 2015). Las células del cúmulo llevan a cabo características funcionales distintas de las granulosa con un mayor grado de proliferación, baja capacidad esteroidogénica y baja expresión de los receptores para LH (Thomas *et al.* 2003, Gilchrist *et al.* 2004). Estos cambios son dependientes de los factores secretados por el oocito (Wei *et al.* 2016, When *et al.* 2010).

Los valores de LPO tienen una correlación negativa con la fertilización, como vieron ya Oyawoye *et al.* (2003), que también observaron que valores bajos de actividad antioxidante total predicen la existencia de un potencial de fertilización reducido. Igualmente la reducción de los antioxidantes tiene la misma significación. (Paszowski *et al.* 1995).

La melatonina es capaz de proteger la función mitocondrial en algunas situaciones patológicas en las que se liberan radicales libres que son precisamente los responsables de la lesión mitocondrial. Esto ocurre en la isquemia reperusión o en la administración de sustancias inflamatorias o también en modelos experimentales de envejecimiento acelerado. Además de reducir el estrés oxidativo, la melatonina puede disminuir la NO sintasa mitocondrial reduciendo por lo tanto la producción de NO y peroxinitritos en la mitocondria que son moléculas capaces de alterar su función. (Kireev *et al.* 2013, Paredes *et al.* 2015).

DATOS DEL ESTUDIO TAMBRE

En lo que respecta a nuestros propios resultados, hemos podido ver que comparando los valores de los distintos parámetros medidos en el líquido folicular de pacientes con pobre respuesta a las gonadotropinas, procedentes de un programa de FIV, con los de donantes de oocitos de ese mismo programa, hemos obtenido los resultados que se describen a continuación:

Se compararon los niveles de enzimas antioxidantes en ambos grupos de mujeres, pacientes y donantes encontrándose unas diferencias significativas en los niveles de antioxidantes encontrados en el líquido folicular.

Concretamente las concentraciones de glutatión transferasa (GST), glutatión reductasa (GR) así como la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) son significativamente más bajas en las pacientes con baja respuesta al compararlas con las donantes de oocitos. (Figura 1).

Los datos de malondialdehído (MDA) del líquido folicular correspondientes a las medidas de estrés oxidativo estaban incrementados significativamente en las pacientes con baja respuesta al compararlas con las donantes. (Figura 2).

Los niveles de los metabolitos del óxido nítrico (NOx) fueron también significativamente mayores en las pacientes (Figura 3).

Los datos de los marcadores de inflamación pueden verse en la tabla 3. Los niveles de IL-6 eran más elevados significativamente en las pacientes con baja **respuesta** ($0,083 \pm 0,01$ pg/ml) comparadas con las donantes de oocitos ($0,023 \pm 0,003$ pg/ml) ($p < 0,004$) (Figura 4) lo mismo que los niveles de interleuquina (IL-8) que era más alta en pacientes ($2,71 \pm 0,16$ pg/ml) que en donantes ($1,85 \pm 0,1$ pg/ml) ($p = 0,0024$) (Figura 5).

El nivel de factor de crecimiento endotelial (VEGF) era casi el doble en las pacientes ($20,6 \pm 1,67$ pg/ml) que en las donantes ($12,6 \pm 0,6$ pg/ml) ($p=0.0156$) (Figura 6).

No se encontraron diferencias significativas en el líquido folicular en las concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) entre ambos grupos (Figura 7).

Table I. – Enzimas antioxidantes del líquido folicular : *glutathione peroxidase (GPx)*, *Glutathione transferase (GST)* and *glutathione reductase (GR)* en donantes y pacientes con baja respuesta ovárica.

Media \pm SD	Donantes	Pacientes	P valor
GPX (nmol x min/mg de proteínas)	8,4 \pm 0, 3	7,4 \pm 0, 3	0,083
GST (nmol / min/mg de proteínas)	0, 7 \pm 0,03	0,5 \pm 0,03	0,002
GR (nmol / min/mg de proteínas)	1,509 \pm 0,064	0,94 \pm 0,045	<0,0001

Table II. –Marcadores de estrés oxidativo en el líquido folicular *malondialdehído (MDA)* y *metabolitos del óxido nítrico (NOx)* en donantes y pacientes con baja respuesta ovárica .

Media \pm SD	Donantes	Pacientes	P valor
MDA (μmol/mg de proteínas)	25,3 \pm 1,4	39,5 \pm 4,1	0,039
NOx (nmol/ml de proteínas)	0,34 \pm 0,03	1,2 \pm 0,08	0,0039

Tabla III.- Citoquinas como marcadores de inflamación: *interleukina-6 (IL-6)*, *interleukina-8 (IL-8)*, *tumor necrosis factor alpha (TNF- α)* y *vascular endothelial growth factor (VEGF)* en donantes y pacientes con baja respuesta ovárica .

Media \pm SD	Donantes	Pacientes	P valor
IL-6 (pg/ml)	0,023 \pm 0,003	0,083 \pm 0,01	<0,004
IL-8 (pg/ml)	1,85 \pm 0,1	2,71 \pm 0,16	0.0024
TNF- (pg/ml)	0,0044 \pm 0,0008	0,0038 \pm 0,0004	0.63
VEGF (ng/ml)	12,6 \pm 0,6	20,6 \pm 1,67	0.0156

Figura 1. - Actividad de Glutation transferasa (GST) en liquid follicular de donantes y pacientes

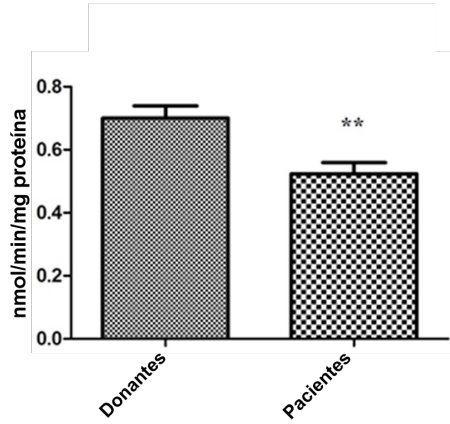


Figure 2.- Contenido en Malondialdehido (MDA) ($\mu\text{mol/mg}$ of proteínas) en liquido follicular de donantes y pacientes .

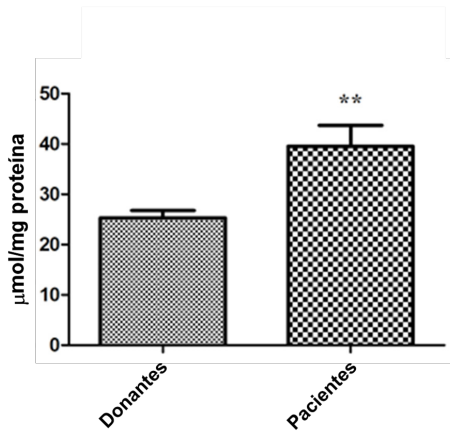


Figura 3.- Niveles de metabolitos de oxido nitrico (NOx) (nmol/mg de proteinas) en donantes y pacientes.

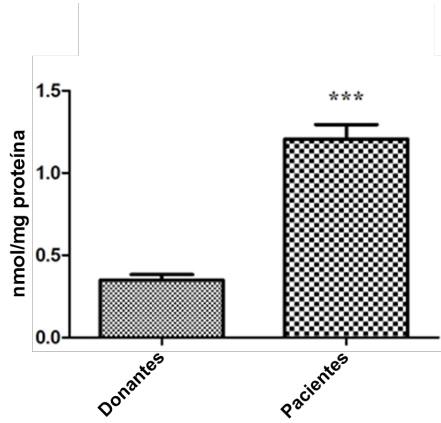


Figura 4.- Niveles de Interleukina-6 (IL-6) en liquid follicular de donantes y pacientes.

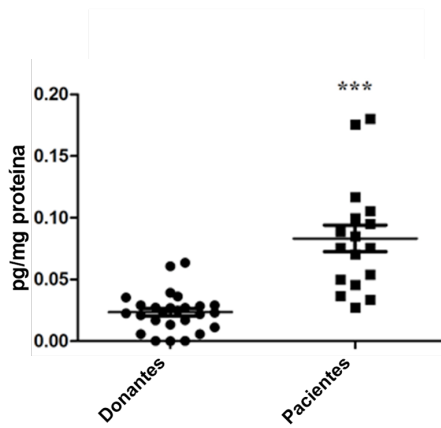


Figure 5- Niveles de Interleukina-8 (IL-8) en liquid follicular de donantes y pacientes.

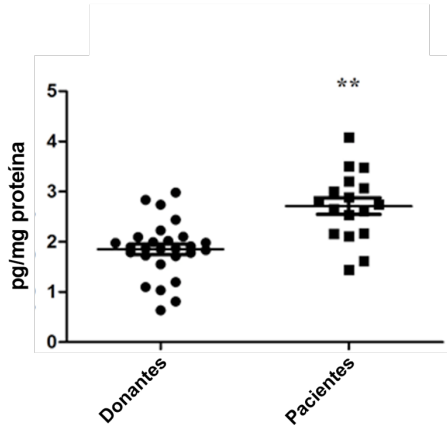


Figure 6- Niveles de vascular endothelial growth factor (VEGF) en liquid follicular de donantes y pacientes.

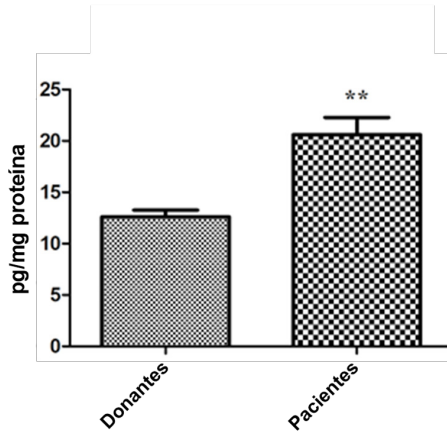
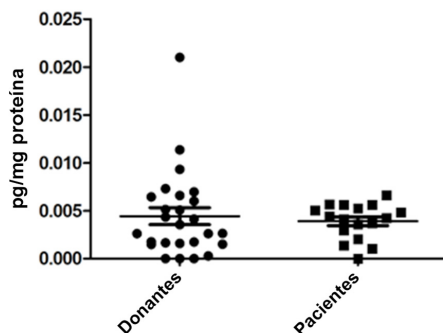


Figure 7.-Niveles de Tumoral necrosis factor (TNF alpha) en liquid follicular de pacientes y donantes.



Por todo lo anteriormente mencionado, podemos deducir que el exceso de marcadores de estrés oxidativo y la disminución de antioxidantes endógenos en el líquido folicular, puede contribuir en un primer escalón a la disminución de la capacidad de respuesta folicular a las gonadotropinas, y en un segundo escalón a un aumento de la apoptosis de los mismos, con la aparición de una menopausia precoz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abban G Johnson J Stem cell support of oogenesis in the human Human Reproduction 12: 2974-8 (2009).
2. Acuña-Castroviejo, D, G Escames Rosa, J León López, H Khady, 2004, Melatonina, ritmos biológicos y estrés oxidativo, in Salvador-Carulla L, Cano Sanchez A, and Cabo-Soler JR (eds), Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida: Madrid, Editorial Médica Panamericana, pp. 216-224.
3. Agarwal, A., Gupta, S. and Sharma, R. K. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3:28.
4. Agarwal, A., Saleh, R. A. and Bedaiwy, M. A. (2003) Role of oxidative oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79 :829-843.
5. Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J. M., Miller, K. F., Agarwal, A., *et al.* (2000) The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 45:314-320.
6. Ausin J.»Definición y epidemiología de la menopausia». En: *Climaterio y menopausia*. S. Palacios ed. Mirpal (Madrid): 1992.

7. Bhatia N N, Bergman A, Karram M M. «Effects of estrogen on urethral function in women with urinary incontinence» *Obstet Gynecol* 160: 176, 1989.
8. Bhartiya D, Hinduja I, Patel H, Bhilwadikar R. Making gametes from pluripotent stem cells - a promising role for very small embryonic-like stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:114. doi: 10.1186/1477-7827-12
9. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Variations at different ages. *Acta Anat (Basel)* 1952;14:108–23. doi: 10.1159/000140595.].
10. Bukovsky A Novel methods for treating ovarian infertility in older and POF women testicular infertility and other human functional diseases *Reprod Biol Endocrinol* 13:10 (2015).
11. Bukovsky A, Caudle MR. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:97. doi: 10.1186/1477-7827-10-97.
12. Bukovsky A. How can female germline stem cells contribute to the physiological Neo-oogenesis in mammals and why menopause occurs? *Microsc Microanal*. 2011;17:498–505.
13. Bukovsky A. Involvement of blood mononuclear cells in the infertility age associated disease and cancer treatment *World J Stem cells* (2016); 26:399–427.
14. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV and Viña J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Rad. Biol. Med* 34:546-552.
15. Castelo-Branco C. «Piel, envejecimiento y menopausia». En: *Climaterio y menopausia*. S. Palacios ed. Mirpal (Madrid): 1992, pp. 113.
16. Cherubinia, A., Ruggiero, C., Polidorib, C.M. and Mecocchia, P. (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Rad Biol Med* 39:841–852.
17. Celades M. «Aspectos Clínicos en la Menopausia». En: *Climaterio y menopausia*. S. Palacios ed. Mirpal (Madrid): 1992 pp. 64.
18. Cohen I, Speroff L. «Premature ovarian failure: update». *Obstet Gynecol Surv*. 46: 156-162,1991.
19. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9(4):169–176.
20. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 959:66-81.
21. Dumesic D A, Meldrum D R, Katz-Jaffe M G, Krisher R L, Schoolcraft WB Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health *Fertility Sterility* 103: 303-316 (2015).
22. Eppig J J, O'Brien M, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev* 1996;44:260.
23. Erickson B H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*. 1966;25:800–5.
24. Fait Tk, Vrablik M, Kostirova M, Trnkova B. «Changes in C-reactive protein levels induced by different application forms of estrogen replacement therapy». *Cas Lek Cesk*.2006;145(7):571-4; discussion 574.

25. Fischer GM, Cherian K, Swain ML. Increased synthesis of aortic collagen and elastin in experimental atherosclerosis: inhibition by contraceptive steroids. *Atherosclerosis*. 1981;39:463-467.
26. Findlay J K, Hutt K J, Hickey M, Anderson R A. How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol Reprod* 2015
27. Fournier A, Berrino F, Clavel Chapelon F. Unequal risks for breast cancer associated with different hormone therapies : Results from the E3N cohort study *Breast Cancer Research Treat* (2008).107: 103-11.
28. García-Pérez M A, Moreno-Mercer J, Tarin J J, Cano A.»Similar efficacy of low and standard doses of transdermal estradiol in controlling bone turnover in postmenopausal women.*Gynecol Endocrinol*. 2006 Apr; 22(4):179-84.
29. García Segura L. M., Azcoitia I., Don Carlos L L. «Neuroprotection by estradiol» *Progress in Neurobiol* (2001) 63(1): 29-60.
30. Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, Van Rooijen N. Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J Androl*. 1994;15:558-64.
31. Gougeon A. Is neo-oogenesis in the adult ovary, a realistic paradigm? *Gynecol Obstet Fertil*. 2010;38:398-401. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.04.013.
32. Gilchrist R B, Ritter L J, Armstrong D T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004;82(83):431.
33. Goodman M P. Are all estrogens created equal? A review of oral versus transdermal therapy *J womens health* (2012), 21: 161-167.
34. Harman Sm, Brinton E A, Cedars M, Lobo R, Manson J E, Merriam G R, Miller V M, Naftolin F, Santoro N. «KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study» *Climacteric*. 2005b Mar;8(1):3-12.
35. Ho J Y, Chen M J, Sheu W H, Yi Y C, Tsai A C, Guu H F, Ho Es. «Differential effects of oral conjugated equine estrogen and transdermal estrogen on atherosclerotic vascular disease risk markers and endothelial function in healthy postmenopausal women». *Hum Reprod*.2006 Oct; 21(10):2715-20.
36. Hong M G, Romn P A, Reagan K, Green C E, Rackley C E. «Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women.» *Am J Cardiol* 69: 176,1992.
37. HULLEY S, GRADY D, BUSH T. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280:605-613.
38. Jana, S. K., Babu, N., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B. and Chaudhury, K. (2010) Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol* 29:447-451.
39. Joo B S, Jung J K, Park M J, Joo J K, Kim K H, Lee K S. Differential expression of pluripotent and germ cell markers in the ovarian surface epithelium according to age in female mice, *Reprod Biol Endocrinol* !2: 113 (2014).
40. Jung.
41. Kaiser J. Aging. 'Rejuvenation factor' in blood turns back the clock in old mice. *Science*. 2014;344:570-1. doi: 10.1126/science.344.6184.570.

42. Kannel W B. «Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study.» *Am Heart J*, 114: 413,1987.
43. Kanis J A. Are the oestrogen deficiency and hormone replacement a distraction to the field of osteoporosis? *Osteoporosis Int* 1998; 1 (supp. 1):51-56.
44. Kiel D P, Felson D T, Anderson J J, Wilson P W F, Moskowitz M A. «Hip fracture and the use of estrogen in postmenopausal women: The Framingham Study.» *New Engl J Med* 317: 1169,1987.
45. Kireev R, Samuel Bitoun, Sara Cuesta, Alejandro Tejerina, Carolina Ibarrola, Enrique Moreno, Elena Vara, Jesus A. F. Tresguerres Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis *European Journal of Pharmacology* 701:185-193 (2013).
46. Kuiper G, Carlsson B, Grandien K et al: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138 (3) 863-870 (1997).
47. Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B. «Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β », *Endocrinology* 139:4252-4263 (1998).
48. Lemay A. «The relevance of the Women's Health Initiative results on combined hormone replacement therapy in clinical practice». *J Obstet Gynaecol Can.* 2002 Sep;24(9):711-5.
49. Lee H J, Salesniemi K, Nikura T, Klein R, Domkowski D M, Tilly J L. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long term fertility in a preclinical mouse model of ovarian failure. *J Clin Oncology* 1: 25 3198-204 (2007).
50. Lignieres B, Vathaire F, Fournier S, Urbinelli R, Allaert F, Le M G, Kuttann F «Combined hormone replacement therapy and risk of breast cancer in a French cohort study of 3175 women.» *Climacteric* 2002, 5:332-340.
51. Liel Y, Kraus S, Levy J, Shany S. «Evidence that estrogens modulate activity and increase the number of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8).» *Endocrinology* 130: 2597,1992.
52. Losordo D W, Kearney M, Kim E A, Jekanowski J, Isner J M. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89(4):1501-1510.
53. Lyytinen H, Pukkala E, Ylikorkala O. «Breast cancer risk in postmenopausal women using estrogen-only therapy». *Obstet Gynecol.* 2006 Dec;108(6):1354-60.
54. Lykkesfeldt, J. (2007) Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 380:50-58.
55. Mallol Mirón J, Giralt Batista M, Nogués Llorc MR, Sureda Batlle FX, Romeu Ferrán M, Mulero Abellán M. Concepto y valoración del estrés oxidativo. En: Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida. Salvador-Carulla L, Cano Sánchez A, Cabo-Soler JR (eds.). Editorial Médica Panamericana, Madrid 2004; pp. 86-95.
56. Matsuo M y Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. En: Free radicals in exercise and aging. Radák Z (ed.). *Human Kinetics* 2000; pp. 1-33.
57. Montagna M and Carlisle K. Structural changes in ageing skin. *British Journal of Dermatology*, 1990; 112(35):61-70.

58. Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu K K, Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1993;328:1069-1075.
59. Nelson Hd, Humphrey L L, Nygren P, Teutsch S M, Allan J D. «Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review». *JAMA.* 2002 Aug 21;288(7):872-81.
60. Nuñez R , Cortes S; Gutierrez-Gonzalez L M; Kireev R; Vara E, Ortega L; Rancan L , Caballero Peregrin P ; Tresguerres J A F, Oxidative Stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reproductive BioMedicine Online* 2015 RBMO-D-14-00662R3.
61. Oyawoye, O., Abdel Gadir, A., Garner A., Constantnovici, N., Perrett, C. and Hardiman, P. (2003) Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 18:2270–2274.
62. Palacios S, Jurado AR, Menendez C, «Menopausia» en E Aguilar, J Devesa. B Moreno Y J A F. Tresguerres , *Endocrinología básica y clínica*. Editorial Síntesis. Madrid 2000 pp 865- 909.
63. Paredes S D, Rancan I, Kireev R, Gonzalez A, Louzao P, Gonzalez P, Rodriguez-Bobada C, Garcia C, Vara E, and. Tresguerres JAF Melatonin Counteracts at a Transcriptional Level the Inflammatory and Apoptotic Response Secondary to Ischemic Brain Injury Induced by Middle Cerebral Artery Blockade in Aging Rats *BioResearch Open Access* Volume 4: 407-16, 2015 DOI: 10.1089/biores.2015.0032.
64. Paszkowski T, Traub AI, Robinson S Y and McMaster D (1995) Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 236,173–180.
65. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002 Feb; 23(1): 90-119.
66. Quiles J L, Ochoa J J, Huertas J R, Mataix J. Aspectos mitocondriales del envejecimiento. Papel de la grasa de la dieta y el estrés oxidativo. *Endocrinología y nutrición* 2004; 51: 107-120.
67. Reiter R J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology* 1998; 56: 359-384.
68. Reiter, R J, D X Tan, S Burkhardt, 2002, Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin: *Mech. Ageing Dev.*, v. 123, pp. 1007-1019.
69. Rodrigues P, D Limback, LK Mc Ginnis, CE Plancha DF Albertini Oogenesis: Prospects and challenges for the future *J Cell Physiol* 216: 355-365 (2008).
70. Rossouw J E *et al.* Risks and benefits of estrogens plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the women health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-333.
71. Ruan X, Seeger H , Mueck AO Breast cancer risk during hormone therapy: Experimental vs clinical data *Minerva Endocrinologica* (2012), 37: 59-75
72. Sastre J, Pallardo F V, Viña J: Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* 2000; 45: 427-435.
73. Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32:307–326.

74. Shigenaga M K, Hagen T M, Ames B N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:10771-10778.
75. Silvestris E, D'Oronzos S, Cafforio P, D'Amato G, Loverro G Perspective in infertility the ovarian stem cells *J Ovarian Res* 2015.
76. Semmens J P, Wagner G. «Estrogen deprivation and vaginal function in postmenopausal women.» *JAMA* 248: 445,1982.
77. Schmidt J W, Wollner D, Curcio J, Riedlinger J, Kim Ls. «Hormone replacement therapy in menopausal women: Past problems and future possibilities». *Gynecol Endocrinol*. 2006 22(10):546-77.
78. Smith P. «Estrogens and the urogenital tract. Studies on steroid hormone receptors and a clinical study on a new estradiol-releasing vaginal ring.» *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*. 157 1:26 ,1993
79. Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Kumakura H, Takayama Y, Sakamaki T, Kurabayashi M. «Effect of transdermal hormone replacement therapy on carotid artery wall thickness and levels of vascular inflammatory markers in postmenopausal women». *Hypertens Res*. 2005 Jul;28(7):579-84.
80. Stevenson J C Type and route of estrogen administration. *Climacteric* 2009,12: 86-90.
81. Thomas F H, Walters K A, Telfer E E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. *Hum Reprod Update* 2003;9:541.
82. Tresguerres J A F, Tresguerres Centeno AF, Salamé F, 2000, Reproducción II: Eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, in Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E, Devesa Múgica J, and Moreno Esteban B (eds), *Tratado de endocrinología básica y clínica: Madrid, Editorial Síntesis*, pp. 621-653.
83. Tresguerres, J A F, Tresguerres AF, Ariznavarreta C» *Envejecimiento del Sistema Endocrino» Rev Geriatria y Gerontologia En prensa* 2006.
84. Tresguerres, J A F «Mecanismo de acción de los esteroides» en Péptidos reguladores gastrointestinales y recepción y transducción de señales generales por hormonas polipeptídicas tiroideas y esteroideas. (Blazquez, E., Tamarit, J, eds). *Fundación Ramón Areces, Madrid, 1992*, pp. 635-646.
85. Tresguerres, J A F, Tresguerres-Centeno, A., y Salamé, F. «Eje hipotálamo hipofísico ovárico» en *Tratado de Endocrinología, básica y clínica* (Tresguerres, JAF, ed) Editorial Síntesis Madrid, 2000, pp. 621-654.
86. Tresguerres J A F, Tresguerres AF y Ariznavarreta C *Estrógenos amigos o enemigos Anales de la Real Academia Nacional de Medicina CCXXIV: 131-155 (2007)*.
87. Tresguerres Jesus A F «Menopausia» *Fisiopatología Consejo General de Colegios Farmaceuticos Madrid* 2008.
88. Vanhoutte P M. «Endothelium-derived relaxing and contracting factors.» *Adv Nephrol*, 19:3,1990.
89. Van Remmen H, Richardson A: Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 957-968.
90. Villeda S A, Plambeck K E, Middeldorp J, Castellano J M, Mosher K I, Luo J, *et al*. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med*. 2014;20:659-63. doi: 10.1038/nm.3569.

91. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement therapy on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 1991;325:1196-1204.35.
92. Wang J J, Ge L, Liu JC, Klinger FG, Felici MD, Hen WS Complete in vitro oogenesis: Retrospects and prospects *Cell death and differentiation* 24: 1845-52 (2017).
93. When X, Li D, Tozer A J, Docherty S M, Iles R K. Estradiol, progesterone, testos-terone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:117.
94. Wei J H, Yuan X Y, Zhang J M, Wei J Q Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes *Eur :J Obst Gynecol Reproductive Biol* 198: 22-26 (2016).
95. Wiklund I, Karlberg J, Mattsson LA. «Quality of life of postmenopausal women on a regimen of transdermal estradiol therapy: a double-blind placebo-controlled study.» *Am J Obstet Gynecol*, 168: 824, 1993.
96. Xiao G Y, Liu I H, Cheng C C, Chang C C Lee Y H, Cheng W T, Wu S C ,Amniotic Fluid Stem Cells Prevent Follicle Atresia and Rescue Fertility of Mice with Premature Ovarian Failure Induced by Chemotherapy *Plos one* (2014) 9: e 106538. Doi 10.1371.