

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA
REACTIVACIÓN DE LA TELOMERASA
CON DANAZOL EN LA FUNCIÓN
OVÁRICA. ESTUDIO PILOTO.**

1707-FIVI-084-MV

EUDRACT NUMBER: 2018-004400-19

AUTORIDAD NACIONAL COMPETENTE: SPAIN - AEMPS

TIPO DE ENSAYO CLÍNICO: EEA CTA

ESTADO DEL PROYECTO: TERMINADO PREMATURAMENTE

DATOS DE LOS RESPONSABLES

Responsables de la gestión administrativa:

- Nombre y apellidos: María Elisa Varela Sanz. Juan Antonio García Velasco
- Filiación: Fundación IVI / IVIRMA Madrid
- e-mail: Mariaealisa.varela@ivirma.com; juan.garcia.velasco@ivirma.com
- Telephone/Fax: 917 27 75 76, ext. 42297

Patrocinador:

- Nombre: IVIRMA Madrid
- Filiación: IVIRMA Madrid
- e-mail: Invesmadrid@ivirma.com
- Teléfono/Fax: +34 911802900 ext. 24527/911802910

Investigador principal

- Nombre y apellidos: María Elisa Varela Sanz. Co-PI: Juan Antonio García Velasco
- Filiación: Fundación IVI / IVIRMA Madrid
- e-mail: Mariaealisa.varela@ivirma.com; juan.garcia.velasco@ivirma.com
- Teléfono/Fax: 917 900 84 70 300/ 911802900 Ext.24152

DATOS PEDRÍATICOS REGLAMENTARIOS

El estudio no forma parte de un plan de investigación pedriática.

ESTADO DEL PROYECTO

El estudio comenzó el 30 de junio de 2020 y se dio por finalizado (de manera prematura) el 31 de diciembre de 2022. Los estudios se publicaron en Julio de 2023 en la revista Women's Health Reports en formato open access. En el artículo se reporta más información sobre el contexto del estudio y sobre las implicaciones de los resultados obtenidos.

Título: "A Randomized Controlled Intervention Trial with Danazol to Improve Telomeric and Fertility Parameters in Women with Diminished Ovarian Reserve: A Pilot Study"

Autores: Isabel Córdova-Oriz, MS, Graciela Kohls, MD, Carlos Iglesias, MD, Alba M. Polonio, MS, Lucía Chico-Sordo, MS, Mónica Toribio, MS, Marcos Meseguer, PhD, Elisa Varela, Antonio Pellicer and Juan A. García-Velasco.

DOI: 10.1089/whr.2023.0013

ANTECEDENTES

Alrededor de un 17% de las parejas son infértiles en España y, por lo tanto, necesitarán recurrir a las TRA para tener hijos. A pesar de la intensa investigación en el campo de la infertilidad y su diagnóstico, las razones que subyacen a la incapacidad para concebir siguen sin conocerse en el 25% de los

casos (Gibbs, 2008; Evers, 2002). Centrándonos en el factor femenino, la infertilidad puede estar causada por una reserva ovárica reducida, insuficiencia ovárica primaria o disfunciones relacionadas con el envejecimiento (Yazdekhasti, et al., 2016). De hecho, una de las principales razones de la infertilidad es la tendencia a retrasar la maternidad debido a los cambios socioeconómicos de nuestra sociedad. En 1990, la edad límite para que las mujeres tuvieran hijos era de 27 años, mientras que en 2014 la edad media era de 30,4 años. En 2016, el 33% de los niños nacen de madres mayores de 35 años.

Los primeros signos de envejecimiento ovárico aparecen alrededor de la treintena, con una disminución de la función ovárica y culmina con la reducción de la reserva ovárica y un aumento dramático de la tasa de aneuploidías entre los 38 y los 50 años (Richardson, et al., 2014). El envejecimiento ovocitario hace que el uso de TRA sea menos eficiente y más difícil, recomendándose el análisis PGS para evitar complicaciones durante el desarrollo embrionario (Scott et al., 2013).

Con la idea de rejuvenecer los ovarios, las mujeres con reserva ovárica comprometida serán tratadas con Danazol, que ha sido ampliamente utilizado anteriormente en pacientes que sufren endometriosis. El Danazol tiene la propiedad de reactivar la telomerasa a través de la vía del receptor estrogénico (RE), que puede actuar por medio de los elementos estrógeno-respondedores localizados en el promotor del gen de la telomerasa (Calado, et al., 2016). Este medicamento tiene la ventaja de causar pocos efectos secundarios y, en caso de cese del tratamiento, se elimina del organismo en 24 h. Sin embargo, las pacientes deberán ser precavidas e interrumpir el tratamiento si se quedan embarazadas. Dado que las pacientes que solicitan FIV tienen dificultades para los embarazos naturales, la posibilidad de que se produzca un embarazo no deseado es baja.

Durante el desarrollo femenino se forman alrededor de seis millones de células germinales, pero el número de folículos disminuye con la edad (Vaskivuo et al., 2003). Las mujeres que no adquieren seis millones de folículos durante el desarrollo o presentan niveles más altos de atresia, podrían tener una reserva ovárica prematuramente disminuida. Esta afección se da en el 15% de las mujeres de todo el mundo (Hayes et al., 2014) y afecta al 4-6% de las mujeres europeas menores de 40 años. Impone una barrera a la maternidad y puede tener efectos adversos en la vida de la mujer. Estos efectos son notorios cuando los niveles de estrógenos son bajos en el organismo femenino, afectando a diferentes sistemas corporales como el cardiovascular, óseo o neuronal (Podfigurna-Stopa et al., 2016), dando lugar a enfermedades que se asocian al envejecimiento.

Una causa molecular primaria del envejecimiento es la longitud de los telómeros, que debe mantenerse adecuadamente para evitar la activación de otras vías que también contribuyen al envejecimiento celular y del organismo (López-Otin et al., 2013). Los telómeros son estructuras nucleoproteicas localizadas en los extremos de los cromosomas, que en los mamíferos, consisten en varias repeticiones de la secuencia "TTAGGG" que terminan en un saliente 3' de ADN monocatenario. Las repeticiones teloméricas están unidas por un complejo proteico llamado Shelterina que está compuesto por seis subunidades (TRF1,

TRF2, RAP1, TPP1, TIN2 y POT1), cuya función es proteger a los cromosomas de la degradación y las fusiones, así como la regulación de la longitud de los telómeros (Blasco 2005; de Lange, 2005). La longitud de los telómeros se acorta con cada división celular debido a la naturaleza unidireccional de la maquinaria de replicación (Olovnikov, 1973; Olovnikov, 1971). Cuando los telómeros son críticamente cortos, se activa la vía de respuesta al daño del ADN y, si la señal es persistente, las células se vuelven senescentes o, en última instancia, apoptóticas. La senescencia pone fin a la capacidad proliferativa de las células, y cuando esto ocurre a las células madre adultas, conduce a una homeostasis tisular deficiente y a una disminución de la función de los órganos que termina en el envejecimiento de los tejidos (Donate y Blasco, 2011). Los organismos nacen con una longitud de telómeros determinada y una tasa de acortamiento de telómeros definida. Los humanos nacen con 10-15 kb de repeticiones teloméricas y su tasa de desgaste telomérico es de 70 bases al año (Vera, et al., 2012). Sin embargo, la longitud telomérica varía entre individuos de la misma edad, y aquellos con una longitud telomérica en el cuartil inferior, son más susceptibles de sufrir enfermedades asociadas al envejecimiento (Canela et al., 2007). En este contexto, la longitud telomérica es un biomarcador de buena fe de la edad biológica. Además, la acumulación de telómeros cortos puede predecir la longevidad (Vera et al., 2012). De hecho, hay pruebas genéticas sólidas de la relación entre el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento y la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad, tanto en ratones como en humanos. En humanos, las mutaciones en el gen de la telomerasa o en aquellos genes implicados en el mantenimiento de los telómeros conducen a enfermedades como la disqueratosis congénita, la anemia aplásica, los síndromes mielodisplásicos y la leucemia (Martínez y Blasco, 2017; Kong et al., 2013; Armanios et al., 2007; Yamaguchi, et al., 2007; Hemann et al., 2001). En ratones, se observa una llamativa disminución de la esperanza de vida acompañada de degeneración tisular cuando se inactiva o elimina el gen de la telomerasa (Blasco et al., 1997; Liu et al., 2002). El desgaste de los telómeros puede ser contrarrestado por la enzima telomerasa, que tiene un componente proteico (TERT) y un componente de ARN (TERC; Greider y Blackburn, 1987; Greider y Blackburn, 1985). Se trata de una transcriptasa inversa, que puede copiar ARN en ADN, siendo capaz de añadir repeticiones de novo en los extremos de los cromosomas, alargando los telómeros en aquellas células en las que está activa. La telomerasa se activa durante el desarrollo, en el estadio de blastocisto, reajustando la longitud de los telómeros de la especie (Schaezlein et al., (2004). Las células con los telómeros más largos se encuentran en el mas celular interno del blastocisto (Varela et al., 2016; Varela et al., 2011). A medida que las células se diferencian, la telomerasa se inactiva, permaneciendo silenciada en el organismo adulto, excepto en la línea germinal, las células madre adultas y las células cancerosas, en las que se mantiene la longitud de los telómeros.

Varios estudios apoyan la relación entre el desgaste de los telómeros y el fracaso reproductivo (Xu et al., 2017; Keefe, 2016; Butts et al., 2009). Durante el crecimiento y la maduración de los ovocitos, las células de granulosa (CG) tienen que proliferar intensamente, pero en las pacientes con reserva ovárica comprometida, la longitud relativa de los telómeros en las CG es corta y la actividad de la telomerasa está ausente, lo que compromete la capacidad

proliferativa de estas células (Xu et al., 2017; Butts et al., 2009). Además, estos pacientes están expuestos a niveles más bajos de estrógenos (Xu et al., 2017), lo que podría conducir a la deficiencia de telomerasa en el GC, dado que en humanos, tanto los estrógenos como los andrógenos activan la transcripción del gen de la telomerasa a través de los elementos sensibles a estrógenos localizados en el promotor del gen de la telomerasa (Calado et al., 2009; Guo et al., 2003). De hecho, en pacientes con mutaciones en el gen de la telomerasa tratados con hormonas sexuales, el desgaste de los telómeros se reduce y los síntomas de los pacientes, mejoran durante varios meses después de finalizar el tratamiento (Townesley et al., 2016).

El estudio de la vía de los telómeros en las CG y la sangre en humanos arrojará luz sobre los mecanismos moleculares que subyacen al envejecimiento ovárico prematuro y regular. El análisis de la sangre y las CG puede servir para identificar biomarcadores moleculares del envejecimiento ovárico, que podrían utilizarse para la detección precoz de esta afección.

JUSTIFICACIÓN

El reto de la paternidad en parejas en las que las mujeres sufren un envejecimiento ovárico prematuro o regular (debido a la decisión de retrasar la paternidad) se ha resuelto con la donación de ovocitos. Los ovocitos de mujeres jóvenes pueden favorecer el desarrollo embrionario y la implantación con una mayor tasa de éxito, ya que la probabilidad de aneuploidías en el ovocito es menor. La falta de información relacionada con el envejecimiento ovárico, que se da en mujeres mayores que no congelaron sus óvulos a una edad temprana, y la ausencia de biomarcadores que permitan la detección precoz del envejecimiento ovárico prematuro, conducen a situaciones en las que las mujeres no pueden transferir su propio material genético a sus hijos.

Hasta ahora, no es posible ofrecer ninguna solución a estas parejas porque el "know how" para rejuvenecer el tejido ovárico es escaso. El campo científico aún no ha desvelado todos los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento ovárico ni la forma en que estos mecanismos operan en los ovarios, por lo que no existe ningún tratamiento para preservar los ovarios del decaimiento prematuro o del envejecimiento normal.

La detección del decaimiento ovárico se produce cuando la mujer no puede quedarse embarazada de forma natural, por lo que en ese momento la reserva ovárica suele ser baja. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de encontrar buenos biomarcadores para predecir esta condición lo antes posible con el fin de abrir una ventana de tiempo para que médicos y pacientes puedan tomar decisiones y emprender acciones con el fin de preservar la fertilidad.

OBJETIVOS

Objetivo primario

Definir un estudio piloto para determinar la distribución de la longitud telomérica en células de la granulosa para evaluar si es factible la reactivación de la telomerasa mediante esteroides sexuales (DANAZOL), en pacientes con baja reserva ovárica.

Objetivos secundarios

Para alcanzar el objetivo primario deben cumplirse los objetivos secundarios. Estos objetivos se estudiarán tanto en las mujeres tratadas (hormonas sexuales o sustancia inactiva) como en el grupo control (mujeres no tratadas con reserva ovárica normal).

- Describir la longitud de los telómeros y la acumulación de telómeros cortos en sangre.
- Determinar si existe una correlación entre los factores teloméricos en sangre y las células de la granulosa con el fin de encontrar nuevos biomarcadores para la detección precoz de la baja reserva ovárica prematura.
- Determinación del daño del ADN en el interior del núcleo celular y del porcentaje de activación de proteínas implicadas en la senescencia.
- Estudio del estado de protección de los telómeros por shelterinas en sangre y GC. Estudio de los efectos beneficiosos del tratamiento esteroideo sobre los parámetros de fecundación descritos a continuación (volumen y reserva ovárica, número total de ovocitos recuperados, calidad de los embriones, tasa de implantación y tasa de embarazo clínico).
- Examen del volumen y la reserva ováricos antes y después del tratamiento con esteroides sexuales y comparación con pacientes con reserva ovárica normal.
- Análisis del número total de ovocitos recuperados (especialmente ovocitos MII) tras la inducción de la ovulación en todos los grupos.
- Análisis de la calidad de los embriones (morfología de los embriones), la tasa de implantación y la tasa de embarazo clínico (presencia de saco gestacional con latido cardíaco 4 o 5 semanas después de la transferencia).
- Evaluación y registro de acontecimientos adversos.

DISEÑO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio clínico piloto, aleatorizado, controlado, -ciego, de brazos paralelos con sustancia inactiva y medicamento.

- **Tipo de estudio:** Intervencionista
- **Propósito principal:** Tratamiento
- **Modelo de estudio de intervención:** Asignación en paralelo. Grupo control compuesto por mujeres con reserva ovárica normal para comparar parámetros teloméricos y de fertilidad con el grupo con reserva ovárica comprometida.
- **Número de brazos:** 2
- **Enmascaramiento:** Cuádruple (participante, profesional sanitario, investigador, evaluador de resultados). Durante la primera visita al médico, las mujeres serán seleccionadas según los criterios de selección. Las que parezcan tener una baja reserva ovárica por ecografía serán informadas del ensayo y, si deciden participar, se les extraerá sangre para analizar los valores de AMH en sangre. En la segunda visita, las mujeres con baja reserva ovárica serán aleatorizadas 1:1 para recibir sustancia inactiva o Danazol de

acuerdo con una lista de aleatorización generada por ordenador y preparada por el estadístico asociado. De esta forma, el grupo asignado será ciego hasta el momento de ejecutar el procedimiento de aleatorización. Momento en el cual, se revelará el grupo asignado. Las mujeres con reserva ovárica normal no serán aleatorizadas y sólo se incluirán como controles. Para mantener el cegamiento del ensayo, el Danazol y el placebo se suministrarán en cajas con blísteres (de PVC opaco y aluminio de aluminio). Sólo el/los delegado/s de medicación del ensayo en el centro dispensará/n el medicamento y conocerá/n la asignación del tratamiento.

- **Asignación:** Aleatorizado.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Proporcionar formulario de consentimiento informado firmado y en fecha.
- Estar dispuesta a cumplir con todos los procedimientos del estudio y estar disponible durante la duración del estudio. Esto incluye la decisión de usar métodos anticonceptivos diferentes a las hormonas sexuales, como el uso de condones, durante el tratamiento con Danazol.
- Edad comprendida entre 30 a 45 años.
- En buen estado de salud general, demostrado mediante la historia clínica
- Índice de masa corporal entre 18 y 30 kg/m².
- Mujeres con reserva ovárica normal (el valor de AMH debe ser igual o superior a 2ng/ml) o comprometida (definida como AMH <2ng/ml).
- No haber tomado ninguna hormona sexual durante un mes.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Embarazo o lactancia.
- Tomar otras hormonas sexuales.
- Mujeres con enfermedades en el corazón, hígado o riñón o tumores que dependen de hormonas sexuales masculinas o tumores dependientes de hormonas.
- Mujeres que toman anticonvulsivos, medicamentos para la diabetes, anticoagulantes y antihipertensores: ciclosporina y tacrolimus y otros esteroides y estatinas.
- Mujeres con sangrado genital irregular o con un trombo o enfermedades tromboembólicas.
- Reacciones alérgicas conocidas a los componentes del producto del estudio (almidón de maíz y lactosa).

- Haber recibido medicamentos de inducción de la ovulación hasta un mes antes de la inclusión en el estudio.
- Cualquier cosa que ponga a la persona en mayor riesgo o impida su total cumplimiento o finalización del estudio.

Los criterios para la interrupción/retirada de los participantes del ensayo fueron los siguientes:

- Embarazo
- Inelegibilidad (ya sea que surja durante el ensayo o retrospectivamente se haya pasado por alto en la selección).
- Desviación significativa del protocolo.
- Incumplimiento significativo del régimen de tratamiento o de los requisitos del ensayo.
- Un evento adverso que requiera la interrupción de la medicación del ensayo o la incapacidad de continuar cumpliendo con los procedimientos del ensayo.
- Progresión de la enfermedad que requiere la interrupción de la medicación del ensayo o la incapacidad para continuar cumpliendo con los procedimientos del ensayo.
- Retirada del consentimiento.
- No realización de un seguimiento adecuado a la paciente
- Si de repente necesitan tomar medicamentos contraindicados con Danazol por razones de salud.

Si el medicamento es usado durante un mínimo de un mes, los datos obtenidos de estas pacientes son incluidos en el estudio.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio está formada por un total de 45 pacientes con edades comprendidas entre los 35 y 40 años que se someten a un tratamiento de reproducción asistida. Los grupos de estudio son los siguientes:

- Grupo control: Mujeres con reserva ovárica normal ($AMH \geq 2 \text{ ng/mL}$) que no se les trata con ningún tratamiento (n= 15).
- Grupo de estudio: Mujeres con reserva ovárica comprometida ($AMH < 2 \text{ ng/mL}$) que se someten a los siguientes tratamientos:
 - o Tratamiento con Danazol (n=15)
 - o Tratamiento placebo (n=15)

El grupo control se emplea para comparar los parámetros teloméricos y de fertilidad con el grupo de mujeres con reserva ovárica comprometida. Como se ha comentado con anterioridad, con "reserva ovárica normal" hace referencia a mujeres mayores que aún tienen folículos en los ovarios, aunque obviamente la cantidad y la calidad es menor que en los ovocitos de una mujer joven. En otras palabras, las mujeres del grupo de control, independientemente de su edad, tienen un mayor número de folículos en comparación con las mujeres que pertenecen al grupo con reserva ovárica comprometida.

El grupo de estudio está formado por mujeres con reserva ovárica comprometida. Este grupo está a su vez dividido en dos subgrupos, uno en el que a las pacientes se las trata con Danazol y otro en el que a las mujeres se les receta un placebo. De esta forma se logra evitar sesgos y establecer la línea base de fertilidad para mujeres con reservas ováricas comprometidas, permitiendo obtener resultados de mejor calidad. El placebo está formado por todos los componentes del Danazol salvo por el principio activo, de forma que, en caso de que el Danazol efectivamente mejore el resultado de la fertilidad, se pueda descartar la posibilidad de que la mejoría no venga dada por el principio activo, ya que el placebo contiene todos los componentes de la píldora, excepto el principio activo.

DISEÑO DE LAS VISITAS

- En la primera visita (Figura 1), se informará sobre el proyecto a los posibles participantes (los que cumplan los criterios de inclusión). Entrega del documento informativo y firma del consentimiento. El CI, firmado por el paciente, se recogerá antes de realizar cualquier prueba relacionada con el estudio. A las que decidan participar, se les solicitará la extracción inicial de sangre para analizar los niveles de AMH (para incluirlas en el grupo adecuado) y comprobar parámetros de salud. Se realizará un examen físico, que incluirá la exploración de las mamas para asegurarse de que ninguna de las participantes tiene nódulos mamarios. Se realizará una ecografía para tener un primer registro de los parámetros ováricos, como el volumen y el recuento de folículos antrales.

- En la segunda visita, a las participantes se les realizará un examen físico, una prueba de embarazo y se les darán instrucciones si van a ser incluidas en el estudio (ya sea Danazol o sustancia inactiva). Se revisará la medicación concomitante. Se extraerá una muestra de sangre para medir la longitud de los telómeros.

- En las dos visitas siguientes, los participantes se someterán a un examen físico y se les extraerá sangre para su análisis (tanto con fines de investigación como para comprobar su estado de salud). La medicación de estudio se repartirá según el grupo. Se revisará la medicación concomitante y se recogerán los efectos adversos.

- En la quinta visita finalizará el tratamiento. Se realizará un examen físico. Se realizará una ecografía para valorar posibles cambios y se volverá a extraer sangre con los mismos fines descritos anteriormente. Se revisará la medicación concomitante. Se recogerán los efectos adversos y se comprobará el correcto cumplimiento de la pauta del tratamiento.

- En las dos visitas (seis y siete) siguientes se realizará la estimulación ovárica según los protocolos, se revisará la medicación concomitante y se recogerán los efectos adversos.

- En la octava visita se realizará una ecografía, extracción de sangre y recogida de ovocitos. Se separarán las células de la granulosa de todos los ovocitos extraídos de cada mujer, a fin de recogerlas para el análisis de los telómeros. Se generarán y cultivarán embriones en el laboratorio de FIV, para que en la siguiente visita se transfiera al útero el/los embrión/es de mejor calidad. Se revisará la medicación concomitante y se registrarán los efectos adversos.

- En la visita número 10, se realizará una prueba de embarazo. Se revisará la medicación concomitante y se recogerán los efectos adversos.

- Durante la última visita (visita 11) (6 semanas después de la visita 10) se realizará una ecografía para confirmar la viabilidad del embarazo. Durante este primer trimestre, podremos evaluar los abortos y los embarazos ectópicos. Se revisará la medicación concomitante y se recogerán los efectos adversos. Los abortos espontáneos y los embarazos ectópicos se registrarán como acontecimientos en el CRF. Se revisará la medicación concomitante y se recogerán los efectos adversos.

- Las evaluaciones al final del ensayo se realizarán en la última visita programada del sujeto (visita 11 para mujeres con prueba de embarazo positiva o visita 10 para mujeres con prueba de embarazo negativa).

- Si alguna visita coincidiera con días festivos o fines de semana, se reprogramará para el primer día disponible en el horario del médico.

- El grupo de control tendrá las visitas programadas similares a las comentadas anteriormente, con la excepción del tratamiento. Las mujeres del grupo de control tienen una reserva ovárica normal y se someterán directamente a la FIV, sin ningún retraso debido a un tratamiento.

VARIABLES DE ESTUDIO

- Variable principal:

o Longitud telomérica y acumulación de telómeros cortos en células de la granulosa: Medido en unidades arbitrarias de fluorescencia (a.U.) De 0 a 255 de intensidad de gris (8 bits) o kb (variable continua).

- Variables secundarias:

o Actividad de la telomerasa: Producto de la amplificación por PCR, corrido en geles de acrilamida y cuantificado como intensidad de banda (variable continua) o analizado por PCR cuantitativa

o Medición del daño del ADN: Si el daño es positivo, entonces deben aparecer diferentes focos en el núcleo de la célula. Se cuenta el número de focos presentes en los núcleos de al menos 100 células. Si hay daño en el ADN en los telómeros, entonces los focos γ H2AX o 53BPI se colocalizan con los telómeros

(marcados con el anticuerpo anti TRF1). Los puntos se cuentan y se expresan como porcentaje de células con ≥ 2 focos. (variable continua).

o Otros factores teloméricos: La qPCR mide los niveles de expresión de ARNm del gen de la telomerasa y las shelterinas, que están involucrados en el alargamiento y la protección de los telómeros. Los niveles de proteína de las shelterinas también se miden tanto por inmunofluorescencia como por transferencia de Western. (variable continua).

- Variables dependientes:

o Activación de p53 y p21: Es analizado por inmunohistoquímica. Si hay activación de estas proteínas, entonces se tiñe el núcleo o el citoplasma, o ambos compartimentos. Se puntúa el número de células positivas y el resultado se expresa como un porcentaje de células teñidas con respecto al total de células (variable continua).

o Reserva ovárica: Los niveles de AMH en suero se determinan y expresan como ng/ml. El volumen ovárico se mide en mm. Se cuentan los folículos antrales, (16-20 mm). (variable continua).

o Ovocitos recogidos después de la estimulación: La cantidad de ovocitos recuperados después de la estimulación se anota en el grupo de control y en los pacientes que toman placebo u hormonas sexuales. (variable continua).

o Calidad de los embriones obtenidos: El investigador estudia los datos con respecto a la calidad de los embriones utilizando datos anónimos.

o Resultados de embarazo: Se realiza una ecografía en la cuarta o quinta semana posterior a la prueba de embarazo, para evaluar si hay un embarazo clínico. Se debe encontrar un embrión vivo en este momento utilizando ultrasonidos.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA EMPLEADA

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism (versión 8). La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando se compararon dos grupos de estudio diferentes, los valores p de las distribuciones normales de los datos se calcularon mediante la prueba t de Student. Para las distribuciones de datos no normales, los valores p se calcularon mediante la prueba U de Mann-Whitney; los valores p en el mismo grupo de estudio (por ejemplo, diferentes visitas) se calcularon mediante una prueba t pareada. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En este punto, es importante destacar los acontecimientos que han dificultado el reclutamiento, prolongándolo excesivamente en el tiempo, incluso impidiendo que se reclute el número de individuos previsto inicialmente. Estos acontecimientos se describen a continuación:

- El protocolo del estudio se redactó utilizando un diseño muy “puro” desde el punto de vista científico, con unos criterios de inclusión y exclusión que redujeron considerablemente el número de candidatas aptas para el estudio de entre las mujeres que acudían a la clínica. Este ha sido el principal motivo: el hecho de poder ser aleatorizadas a un grupo placebo y de forma ciega ha hecho que muchísimas mujeres a las que se les ofreció participar no se animaran por la sensación de “perder” tres meses, sin saber si quiera si serían asignadas a tomar medicamento. Hay que considerar que cuando una paciente va la clínica a intentar embarazarse, especialmente si la edad materna es avanzada, no quiere esperar.
- Hubo bastante retraso en la recepción del medicamento en la clínica, debido a la falta de suministro del medicamento en investigación “Danazol” por parte de fabricante, lo que derivó en un retraso en el inicio del estudio.
- Una vez comenzado el reclutamiento, que iba bastante despacio debido a los estrictos criterios de inclusión/exclusión, comenzó la pandemia del COVID-19 y el consiguiente confinamiento, lo cual impidió el reclutamiento de pacientes, y aunque no se interrumpió la administración de medicamento, sí que dificultó el seguimiento de las pacientes en la clínica.
- Una vez el confinamiento hubo terminado y la clínica volvió a la actividad normal, se inició el reclutamiento, pero la caducidad del medicamento estaba a punto de expirar, porque dependía del placebo, por lo que hubo que solicitar la ampliación de las fechas de caducidad para poder seguir con el estudio y ampliar un año más la póliza y la farmacovigilancia, lo que ha supuesto incurrir en gastos que no estaban previstos a priori.
- Otra consecuencia del confinamiento fue que las mujeres que iban a la clínica no querían esperar otros tres meses (de tratamiento) para intentar tener el deseado embarazo.
- Para incrementar el número de mujeres en cada brazo, se analizó la posibilidad de extender el estudio a 6 meses más, hasta el fin de fecha de caducidad del medicamento en investigación. Sin embargo, la idea fue desestimada debido a que supondría un incremento considerable de la partida de gastos sin ninguna garantía de conseguir el objetivo de reclutamiento.

No obstante, las consecuencias de la finalización del estudio sin alcanzar el tamaño de muestras deseado no afectan a la potencia estadística ya que se trata de un estudio piloto.

RESULTADOS

RECLUTAMIENTO DE CASOS

Todos los sujetos reclutados para este estudio son mujeres, caucásicas y de nacionalidad española.

El reclutamiento se inició en Febrero 2020 y ha finalizado en Febrero de 2022 en la clínica IVIRMA en Madrid (España). Durante esta fase se procedió a reclutar a las pacientes que cumplan con los criterios de inclusión establecidos hasta alcanzar la n necesaria en cada uno de los grupos de estudio. Asimismo, es en esta misma fase en la que se administró el tratamiento establecido a cada paciente en función del grupo de estudio al que se asignó. Por último, se procedió a la recogida de muestras biológicas (sangre y células de la granulosa) con el objetivo de evaluar en la siguiente fase las variables teloméricas.

Esta fase fue realizada en su totalidad en IVI Madrid; no obstante, es importante destacar que para el correcto desarrollo de esta fase del estudio fue necesario subcontratar los servicios de Distefar quienes se encargaron del suministro de la medicación, que consiste en la fabricación, análisis y liberación de la misma para el ensayo clínico con cápsulas de Danazol y de placebo en entorno GMP. Así pues, sus funciones fueron las de aportar todo el conocimiento legislativo para que el lote clínico cumpliera con la normativa a nivel de especificaciones, recepción y almacenamiento del producto, así como liberación tanto del Danazol como del placebo. Por otro lado, fue necesario subcontratar a la empresa Reference para realizar los análisis del estado de salud de las pacientes que se sometieron a tratamiento (Danazol o placebo).

PACIENTES RECLUTADAS

En total se han reclutado 19 mujeres para el estudio (7 correspondientes al grupo control, 7 correspondientes al grupo tratamiento con Danazol y correspondientes al grupo tratamiento con Placebo). Las características de estas mujeres se encuentran resumidas en la Tabla 1. No hay diferencias estadísticamente significativas en el valor de la hormona AMH y en el recuento de folículos antrales (AFC, por sus siglas en inglés) antes del tratamiento entre los grupos tratamiento (Placebo y Danazol). Si que encontramos diferencias estadísticamente significativas en el valor de IMC, siendo más alto en el grupo Danazol. Esto se debe al bajo número de pacientes reclutadas, por lo que no pudimos descartar a las pacientes con IMC más altos en este grupo. Como era esperado, encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de AMH y el AFC entre las pacientes controles (reserva ovárica normal) y ambos grupos tratamiento (reserva ovárica reducida).

	GRUPO CONTROL – RESERVA NORMAL	GRUPOS TTO. – BAJA RESERVA	GRUPO TTO. PLACEBO	GRUPO TTO. DANAZOL
Nº de sujetos	7	12	5	7
Edad (años)				
Media ± SD	39.5±3.1	40.6±2.8	39.8±2.7	41.2±2.8
Mediana (Q1-Q3)	39.0 (36.0-43.0)	41.5 (38.2-43.0)	39.0 (37.5-42.5)	42.0 (38.0-43.0)
IMC (kg/m²)				
Media ± SD	22.1±1.6	23.4±3.1	21.3±1.1	24.9±3.2
Mediana (Q1-Q3)	22.48 (20.7-23.8)	22.6 (20.8-26.0)	20.6 (20.5-22.6)	23.7 (22.0-28.8) p=[0.02]
Infertilidad primaria, n (%)	4 (57.1)	9 (75.0)	4 (80)	5 (71.4)
Infertilidad secundaria, n (%)	3 (42.9)	3 (25.0)	1 (20)	2 (28.6)
Duración infertilidad (años)				
Media± SD	1.0±0.7	1.2±0.9	1.8±1.0	0.9±0.6
Mediana (Q1-Q3)	1.0 (0.5-2.0)	1.2 (0.5-2.0)	2.0 (1.0-2.5)	1.0 (0.5-1.5)
Nivel AMH (ng/ml)				
Media ± SD	3.1±0.8	0.4±0.5	0.5±0.6	0.3±0.4
Mediana (Q1-Q3)	2.8 (2.5-3.5)	0.1 (0.05-0.7) [p=<0.0001]	0.3 (0.1-1.1)	0.09 (0.05-0.8)
AFC pre-treatment				
Media ± SD	12.7±3.1	3.3±2.5	3.5±1.3	3.2±3.0
Mediana (Q1-Q3)	13.0 (11.0-16.0)	3.0 (1.0-5.0) [p=<0.0001]	3.5 (2.2-4.7)	3.0 (1.0-5.0)

Tabla 1: Características de las pacientes reclutadas

A continuación, en la figura 1, se muestra un diagrama resumen del proceso de reclutamiento y de las visitas de las pacientes finalmente reclutadas.

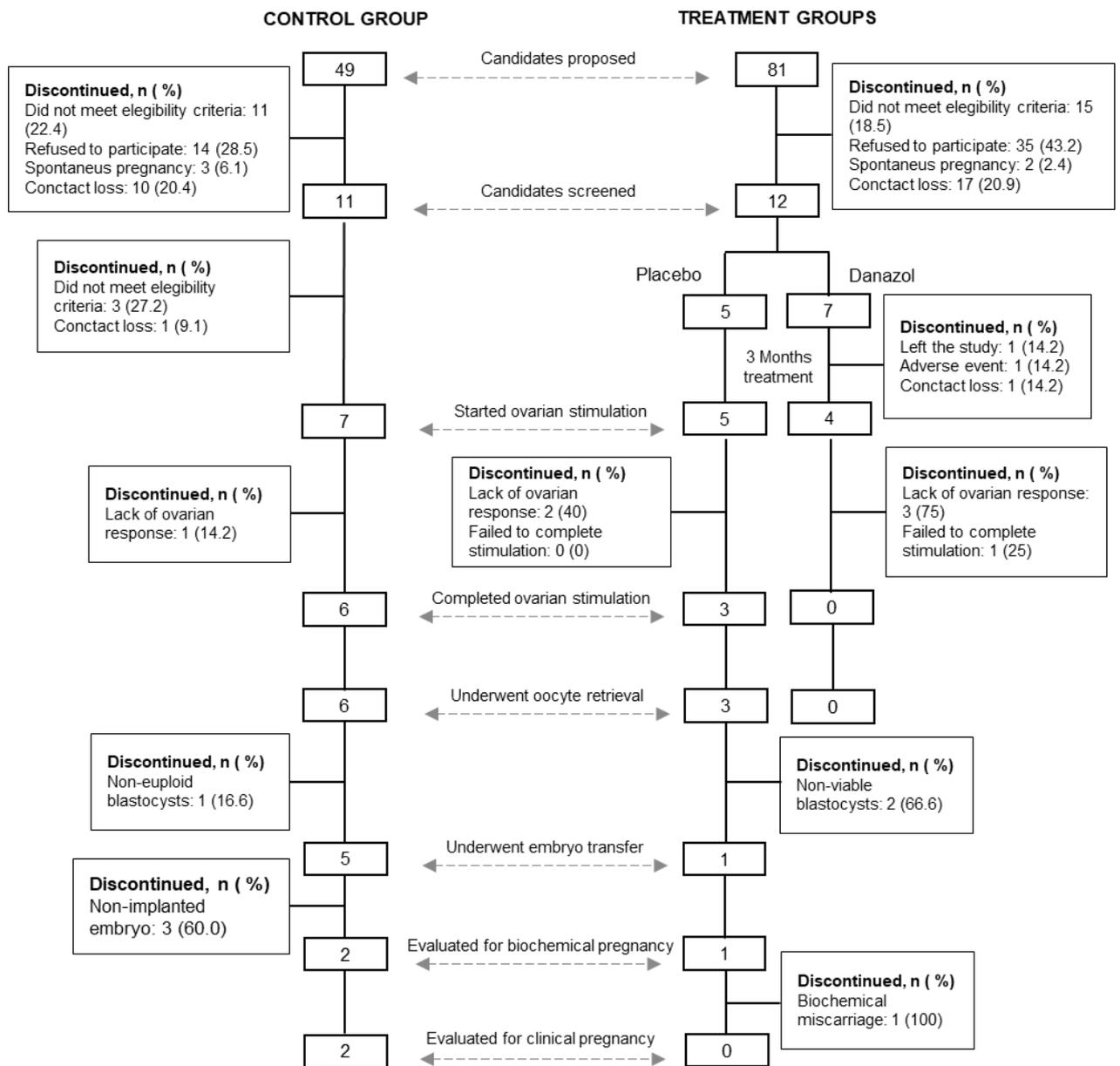


Figura 1: Diagrama de flujo del proyecto.

Como se indica en la figura 1, se realizó un gran esfuerzo por intentar reclutar pacientes. A través de la base de datos del SIVIS de IVIRMA Madrid se seleccionaron 49 mujeres candidatas a entrar en el grupo control y 81 mujeres candidatas a entrar en los grupos tratamientos (Placebo y Danazol). Sin embargo, finalmente solo realizaron las visitas de screening 11 mujeres del grupo control y 12 mujeres de los grupos tratamiento. Tras las visitas de screening 3 mujeres del grupo control tuvieron que ser excluidas del estudio por no cumplir uno de los criterios de inclusión ($AMH < 2$ ng/ml) y se perdió el contacto con otra mujer del grupo control. De los grupos tratamientos, tras la primera visita, una mujer abandonó voluntariamente el estudio, otra tuvo que ser retirada por un evento adverso y se perdió el contacto con una tercera mujer.

RESULTADOS FERTILIDAD Y RESULTADOS PROYECTO RETROSPECTIVO.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los resultados de fertilidad obtenidos tras el primer ciclo de estimulación correspondiente tras finalizar los tres meses de tratamiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el AFC tras el tratamiento entre los grupos Placebo y Danazol. De las 7 pacientes inicialmente reclutadas en el grupo Danazol, 3 de ellas abandonaron el estudio antes de iniciar la estimulación, como se ha mencionado anteriormente. Por ese motivo, solo 4 pacientes de dicho grupo la inician. Sin embargo, los médicos de las 4 pacientes decidieron cancelar las estimulaciones por ausencia de folículos maduros en ecográfica o debido a una baja respuesta a la estimulación. Al cancelar la estimulación antes del día del trigger (inducción de la ovulación) no disponemos de los valores de los niveles de estrógenos y de progesterona medidos en ese día. En el grupo Placebo cancelaron 2 pacientes la estimulación por decisión médica. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Placebo y Danazol durante la evaluación folicular. Sin embargo, como era de esperar, en ambos grupos sí que se observa un menor número de folículos totales y de folículos maduros (>12mm de diámetro) respecto al grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

	GRUPO CONTROL - RESERVA NORMAL	GRUPOS TTO. - BAJA RESERVA	GRUPO TTO. PLACEBO	GRUPO TTO. DANAZOL
Nº de sujetos	7	12	5	7
Fol. Antrales post-tto. Media ± SD Mediana (Q1-Q3)	Not treated	3.6±1.9 4.0 (2.5-4.5)	4.0±0.7 4.0 (3.5-4.5)	3.2±2.9 3.0 (0.5-6.2)
Ciclos Estimulación iniciados, n	7	9	5	4
Ciclos cancelados, n (%)	1 (14.3)	6 (66.6)	2 (40)	4 (100)
Estrógenos el día del trigger Media ± SD Mediana (Q1-Q3)	3005.0±3398.3 2388.0 (1112.0- 2588)	994.3±432.0 1058 (534-1391)	994.3±432.0 1058 (534-1391)	x
Progesterona el día del trigger Media ± SD Mediana (Q1-Q3)	1.3±1.6 0.7 (0.2-1.5)	0.8±0.8 0.4 (0.1-1.8)	0.8±0.8 0.4 (0.1-1.8)	x
Detección folicular por ecografía durante la estimulación				
Folículos totales Media± SD Mediana (Q1-Q3)	14.1±4.1 15.0 (13.0-17.0)	4.0±3.5 3.0 (1.0-6.0) [p=0.0003]	5.0±3.8 4.0 (2.0-8.5)	1.5±0.7 1.5 (1.0-2.0)
Folículos >12mm Media ± SD Mediana (Q1-Q3)	12.7±5.3 15.0 (6.0-17.0)	2.5±3.3 1.0 (0.0-5.0) [p=0.002]	3.4±3.6 2.0 (0.5-7.0)	0.5±0.7 0.5 (0.0-1.0)

Tabla 2: Resultados de fertilidad tras el primer ciclo de estimulación

A continuación, en las siguientes tablas, se muestran los resultados de fertilidad del primer ciclo de estimulación tras la punción ovárica (Tabla 3) y tras la transferencia embrionaria (Tabla 4).

	GRUPO CONTROL - RESERVA NORMAL	GRUPO TTO. PLACEBO	GRUPO TTO. DANAZOL
Ovocitos extraídos			
Ovocitos totales	12.3±5.6	2.5±3.1	
Media ± SD	13.0 (7.7-15.7)	1.5 (0.2-5.7)	X
Mediana (Q1-Q3)		p=0.02	
Tasa de ovocitos MII	0.9±0.1	0.9±0.1	
Media ± SD	1.0 (0.7-)	1.0 (0.7-)	X
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de Ovocitos Mi	0.0	0.0	X
Media ± SD			
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de Vesículas germinales	0.09±0.1	0.09±0.1	
Media ± SD	0 (0.0-0.1)	0.0 (0.0-)	X
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de Ovocitos atróficos	0.0	0.0	X
Media ± SD			
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de fecundación	0.7±0.2	0.7±0.2	
Media ± SD	0.8 (0.7-1.0)	0.8 (0.5-)	X
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de desarrollo a morula	0.9±0.1	0.9±0.1	
Media ± SD	1.0 (0.8-1.0)	1.0 (0.7-)	X
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de desarrollo a blastocito	0.4±0.3	0.2±0.4	
Media ± SD	0.3 (0.1-0.6)	0.0 (0.0-)	X
Mediana (Q1-Q3)			
Calidad masa celular interna, n (%)			X
A	5 (20.8)	0 (0.0)	
B	18 (75.0)	3 (100)	
C	1 (4.2)	0 (0.0)	
D	0 (0.0)	0 (0.0)	
Calidad trofoectodermo, n (%)			X
A	3 (12.5)	0 (0)	
B	13 (54.1)	2 (66.7)	
C	8 (33.4)	1 (33.3)	
D	0 (0.0)	0 (.00)	
Tasa de desarrollo a blastocito euploide	0.6±0.3	0.3±0.5	
Media ± SD	0.5 (0.3-1.0)	0.0 (0.0-)	X
Mediana (Q1-Q3)			

Tabla 3: Resultados de fertilidad tras la punción ovárica (primer ciclo de estimulación)

Al haberse cancelado todas las estimulaciones en el grupo Danazol ninguna paciente llegó a la punción ovárica, por lo tanto, no disponemos de estos datos y no podemos realizar la comparación con el grupo Placebo. Lo mismo ocurre con los resultados tras la transferencia embrionaria (Tabla 4).

	GRUPO CONTROL – RESERVA NORMAL	GRUPO TTO. PLACEBO	GRUPO TTO. DANAZOL
Blastocitos transferidos, n	5	2	X
Tasa de implantación			
Media ± SD	0.5±0.4		
Mediana (Q1-Q3)	0.5 (0.0-1.0)	0.5±0.0	X
Tasa de embarazo bioquímico			
Media ± SD	0.5±0.5		
Mediana (Q1-Q3)	0.5 (0.0-1.0)	0.5±0.0	X
Tasa de embarazo químico			
Media ± SD	0.8±0.2		
Mediana (Q1-Q3)	1.0 (0.5-)	0.0	X
Tasa de embarazo en curso			
Media ± SD	0.5±0.0		
Mediana (Q1-Q3)	0.5 (0.5-0.5)	0.0	X
Tasa de aborto bioquímico			
Media ± SD	0.0	0.5±0.0	X
Mediana (Q1-Q3)			
Tasa de aborto clínico			
Media ± SD	0.0	0.0	X
Mediana (Q1-Q3)			

Tabla 4: Resultados de fertilidad tras la transferencia embrionaria (primer ciclo de estimulación)

Nuestros resultados sugieren que el danazol no confiere ninguna ventaja para los resultados de la FIV justo después de la primera estimulación ovárica tras el tratamiento. De hecho, podría tener un efecto androgénico causando una supresión del ovario, lo que llevaría a la amenorrea. Seguidamente, hipotetizamos que el efecto del Danazol podría estar teniendo lugar en los folículos primordiales y, dado que estos tardan hasta cinco meses en madurar durante la foliculogénesis, este efecto podría observarse meses después del tratamiento. Para poder estudiar este hecho, redactamos y enviamos al CEIm un nuevo proyecto retrospectivo para así, poder estudiar los ciclos de estimulación posteriores al tratamiento que realizaron meses después algunas pacientes por su cuenta.

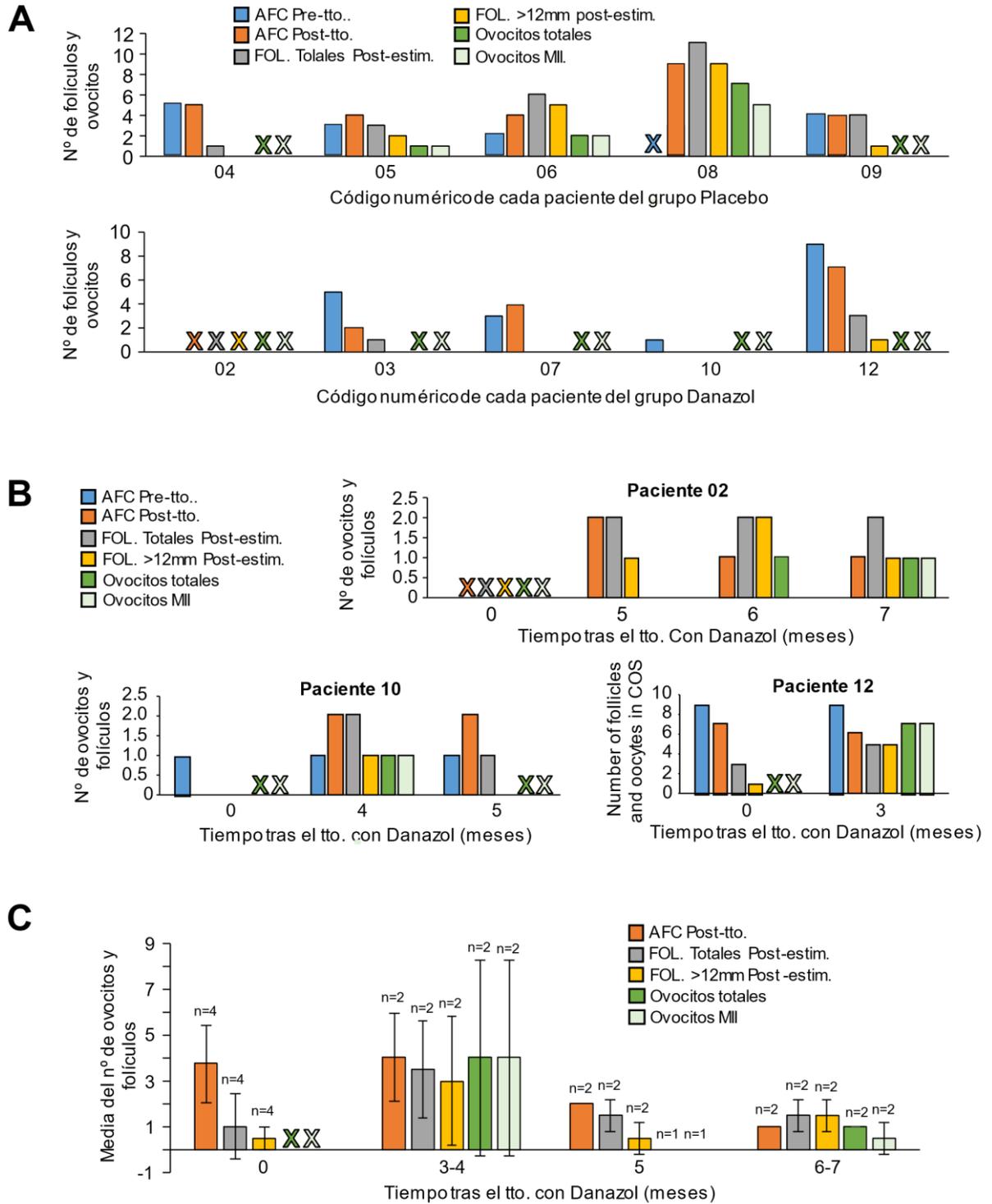


Figura 2: Números de folículos y ovocitos tras el tratamiento en el primer ciclo (A) y en ciclos posteriores (B y C)

En la figura 2A podemos visualizar gráficamente cómo en el grupo Danazol se cancelaron todos los ciclos de estimulación y punciones ováricas tras el tratamiento. Curiosamente, tres pacientes tratadas con danazol que se sometieron a una segunda estimulación una vez finalizado el estudio, obtuvieron folículos y ovocitos (Figura 2B). Agrupando los datos de todas las pacientes tratadas con danazol, tanto el recuento de folículos (AFC) como el de ovocitos

pareció aumentar a los 3 meses del tratamiento con danazol, aunque no se obtuvo significancia estadística (Figura 2C). Incluso en los últimos ciclos analizados (7 meses después del tratamiento) una paciente obtuvo ovocitos (Figura 2C). En cuanto a los niveles séricos de estrógenos en las pacientes tratadas con danazol, estos fueron mayores a los 3-4 meses, en comparación con el quinto mes y a los 6-7 meses ($665,0 \pm 431,0$ pg/ml a los 3 meses, $355,0 \pm 0,0$ pg/ml a los 5 meses, y $181,5 \pm 4,9$ pg/ml a los 6-7 meses). Este descenso de estrógenos puede ser debido a la pérdida de efecto del fármaco Danazol, obteniendo su pico de máximo efectos 3-4 meses de tratamiento que corresponderían al final de la foliculogénesis. Sin embargo, sus efectos podrían perdurar unos meses más en el tiempo. De hecho, el efecto retardado del danazol ha sido descrito previamente. Este efecto retardado y positivo en la fertilidad del Danazol se puede observar más claramente en la paciente 02 (Figura 2B), la cual se unió al estudio con un recuento de folículos antrales (AFC) de cero y meses después del tratamiento consiguió tener ovocitos.

RESULTADOS LONGITUD TELOMÉRICA Y TELÓMEROS CORTOS Y LARGOS EN SANGRE Y GRANULOSAS

Se analizó la intensidad telomérica mediante una hibridación in situ fluorescente (FISH) con una sonda telomérica marcada con el fluoróforo Cy3. En primer lugar, se realizó el análisis en muestras de sangre (PBMCs) obtenidas en la visita pre-tratamiento y a un mes, a dos y tres meses tras el tratamiento con Placebo o Danazol. En el caso del grupo control, se obtuvo la sangre en su segunda visita a la clínica y en la visita correspondiente a la punción ovárica. En los resultados se observa que no hay diferencias en la media de intensidad en los grupos control y Placebo durante las visitas (Figura 3A). Sin embargo, en el grupo Danazol, se observa un incremento estadísticamente significativo tras un mes del tratamiento ($p=0.02$). Tras este mes, la intensidad media vuelve a disminuir siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 3A).

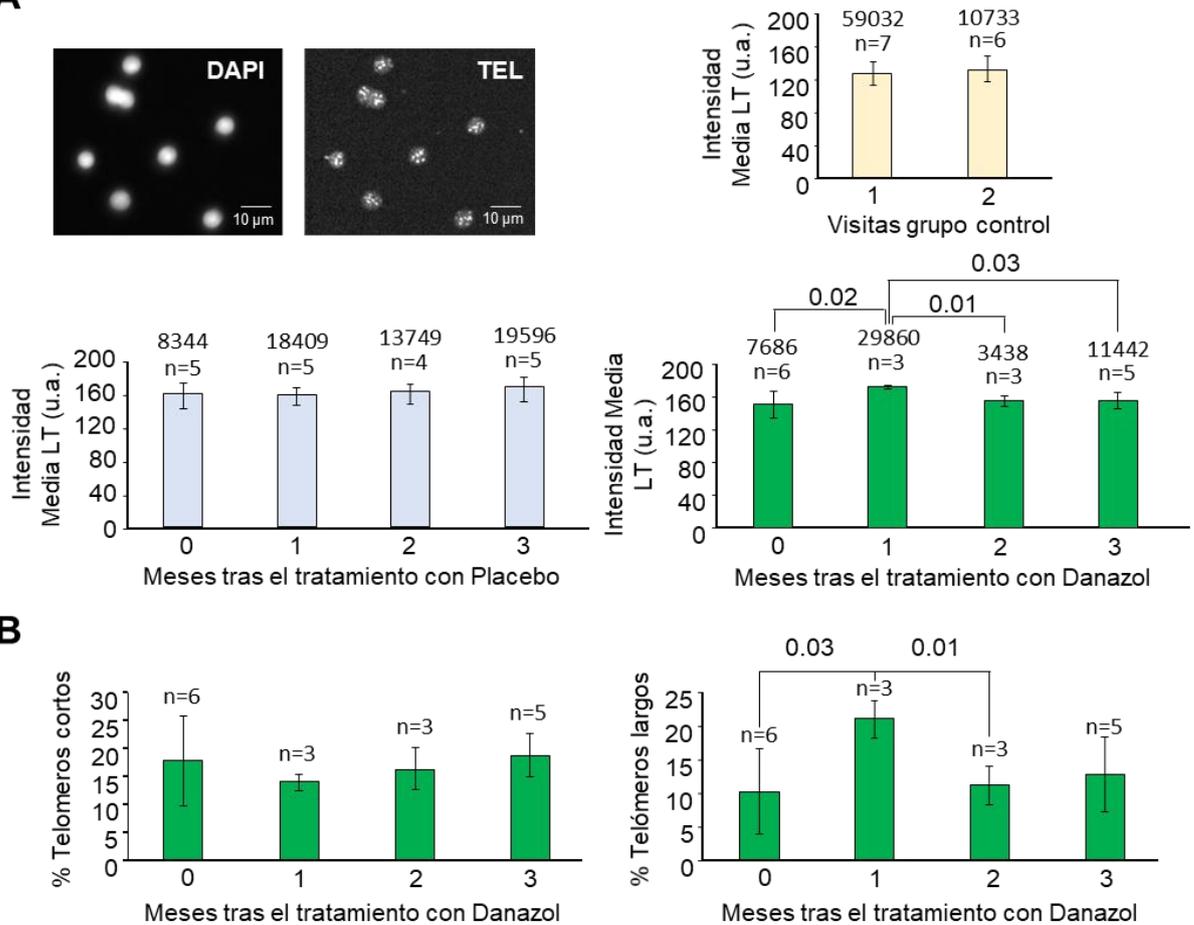
A

Figura 3: Longitud media de los telómeros (A) y porcentaje de telómeros cortos y largos acumulados en sangre (PBMCs) del grupo Danazol.

Seguidamente, a partir de las medias de los percentiles 15 y 85 de los valores de intensidades teloméricas, se analizó el porcentaje de telómeros cortos y largos (Figuras 3B, 4A y 4B). De nuevo, en el grupo Danazol, observamos un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de telómeros largos acumulados tras el primer mes de tratamiento. Respecto al porcentaje de telómeros cortos acumulados, observamos una tendencia a una disminución de estos también tras el primer mes de tratamiento (Figura 3B). En los grupos control y Placebo, no observamos ninguna variación significativa durante los meses de tratamiento en el porcentaje de telómeros largos (Figura 4A) ni en el porcentaje de telómeros cortos (Figura 4B).

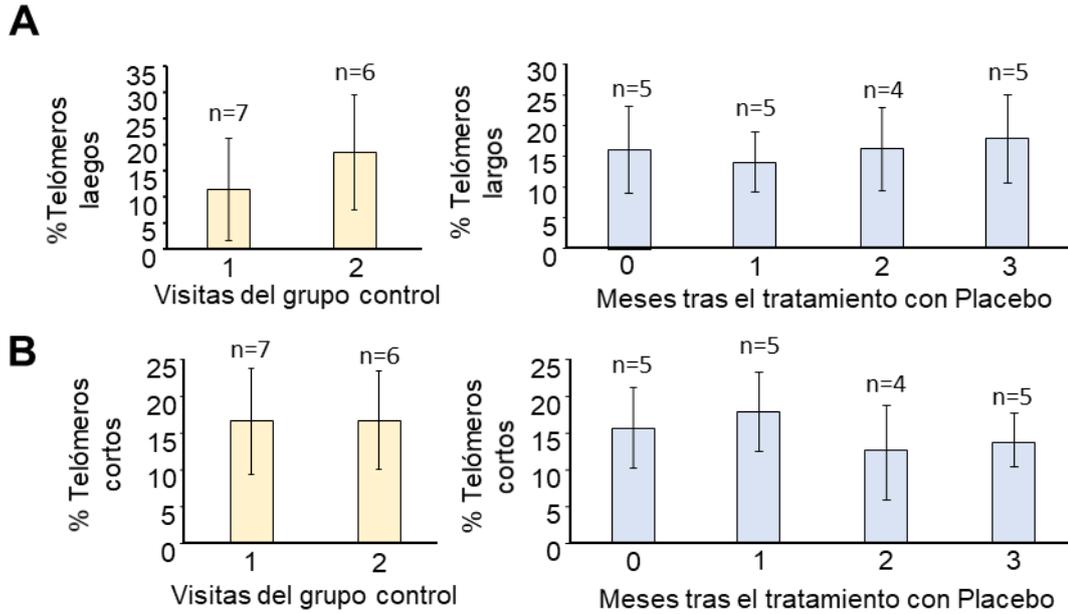


Figura 4: Porcentaje de telómeros largos (A) y cortos (B) en muestras de sangre (PBMCs) en los grupos control y placebo.

A su vez se realizó la evaluación de la dinámica telomérica en muestras de granulosa. No obstante, al no disponer de muestras de granulosa de las pacientes del grupo Danazol, no pudimos realizar la comparación estadística. Como se comentó previamente, todas las mujeres del grupo Danazol tuvieron que cancelar sus estimulaciones ováricas por decisión médica. En la figura 5A se muestran las medias de intensidades teloméricas del grupo control y del grupo Placebo. En la figura 5B y 5C se muestran las medias de porcentajes de telómeros cortos y largos de dichos grupos.

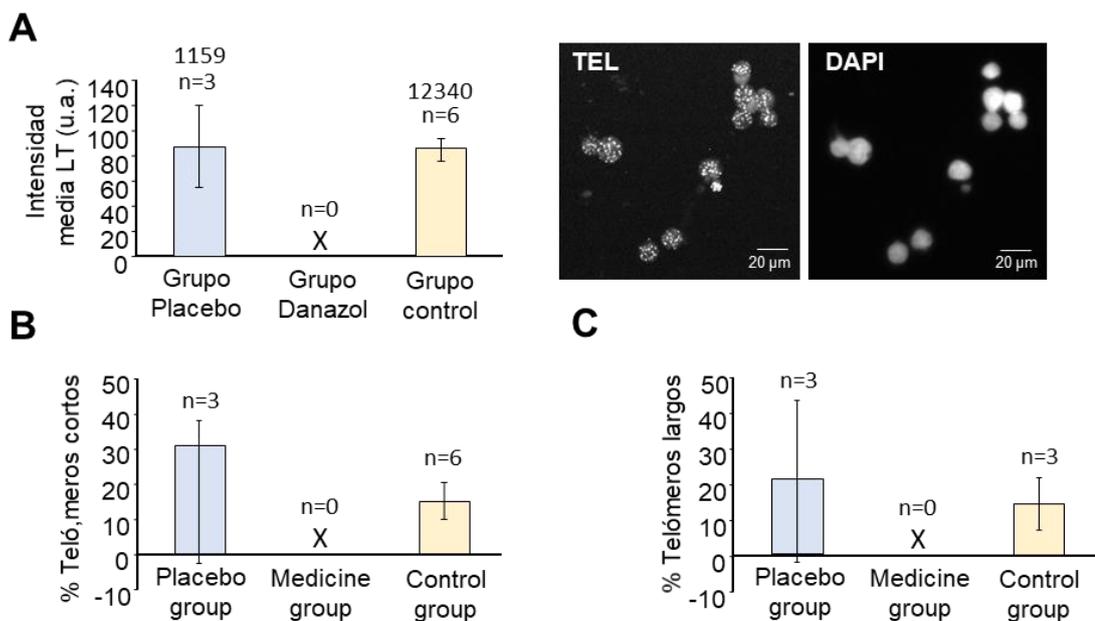


Figura 5: Longitud media de los telómeros (A) y porcentaje de telómeros cortos (B) y largos (C) acumulados en células de granulosa.

RESULTADOS RT-Q-PCR DE LOS GENES TERC Y TERT EN MUESTRAS DE SANGRE

Uno de los objetivos del estudio era la evaluación de la actividad telomerasa para ver si el tratamiento con Danazol la estaba aumentando. La principal forma de medir la actividad telomerasa directamente es mediante técnica TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, por sus siglas en inglés) a través de extractos celulares utilizando primers de regiones teloméricas. Sin embargo, esta técnica no pudo ser realizada debido a que se necesitan millones de células de granulosa para poder realizarla y la actividad no es detectable en muestras de PBMCs. Nosotros sólo obteníamos de media medio millón de células de granulosa y decidimos preservarlas para realizar los experimentos de evaluación de la longitud telomérica y de protección telomérica. Por lo tanto, se decidió medir únicamente de manera indirecta la actividad telomerasa a partir del análisis de la expresión de dos componentes del complejo de la telomerasa; TERC (componente de RNA) y TERT (componente proteico). Para ello, se realizó una retro-transcripción de muestras de RNA extraídas de PBMCs y seguidamente, un análisis de expresión mediante una PCR cuantitativa (Q-PCR). Todos resultados de expresión después se normalizarían por la expresión de un gen endógeno en muestras de sangre, GAPDH.

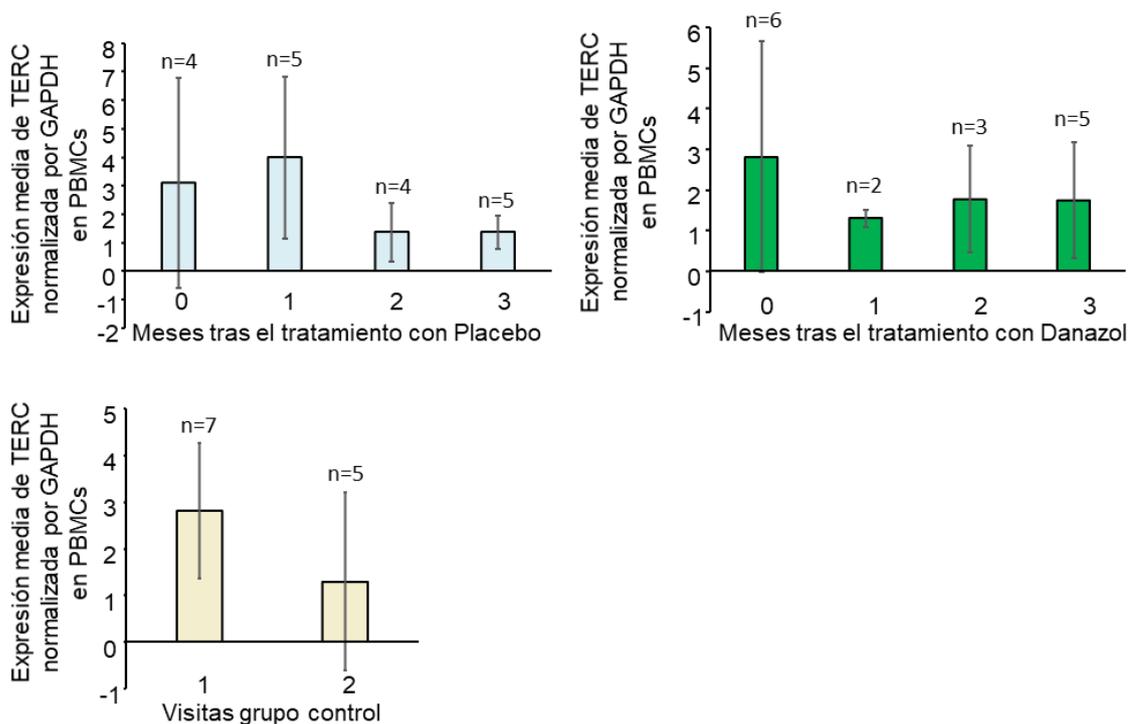


Figura 6: Análisis de los niveles de expresión de TERC normalizados por la expresión de GAPDH en células de sangre (PBMCs).

En la figura 6 se muestran las medias de expresión de TERC en los tres grupos. No se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos durante el tratamiento, probablemente debido al bajo número de muestras disponibles. En lo que respecta a los resultados de TERT, no pudimos obtenerlos. Realizamos varias pruebas de Q-PCR con primers de distintas

regiones de TERT pero el termociclador no fue capaz de detectar su expresión en ningún caso. Junto a este informe adjuntamos los excels de los resultados negativos de Q-PCR con dos primers diferentes.

RESULTADO DE LOS NIVELES DE SHELTERINAS (TRF1) EN SANGRE Y GRANULOSAS

Se evaluó la protección telomérica mediante el análisis de los niveles de intensidades de la shelterina TRF1 obtenidos por inmunofluorescencia con el fluoróforo Alexa fluor 488 verde. Primero, se realizó el análisis en muestras de sangre (PBMCs) obtenidas en la visita pre-tratamiento y a un mes, a dos y tres meses tras el tratamiento con Placebo o Danazol. En el grupo control se obtuvo la sangre en su segunda visita a la clínica y en la visita correspondiente a la punción ovárica.

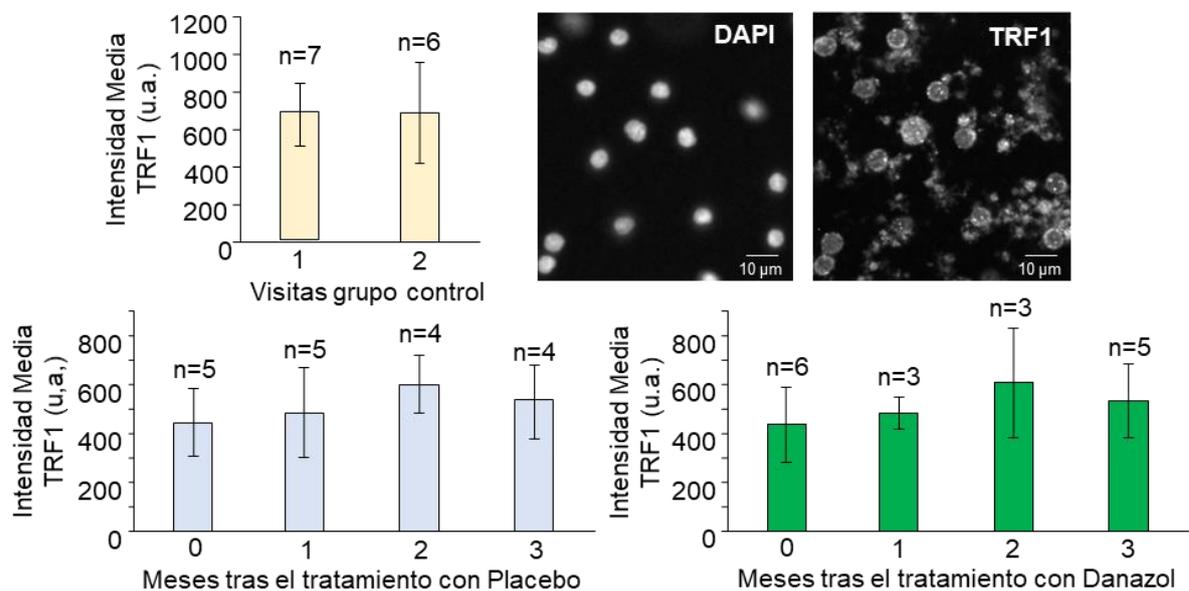


Figura 7: Protección telomérica en sangre (PBMCs). Análisis de los niveles de TRF1.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres grupos durante el tratamiento (Figura 7). Después, se realizó el mismo análisis en muestras de granulosa (Figura 8). Al no disponer de valores en el grupo Danazol tampoco se pudo realizar la comparación estadística.

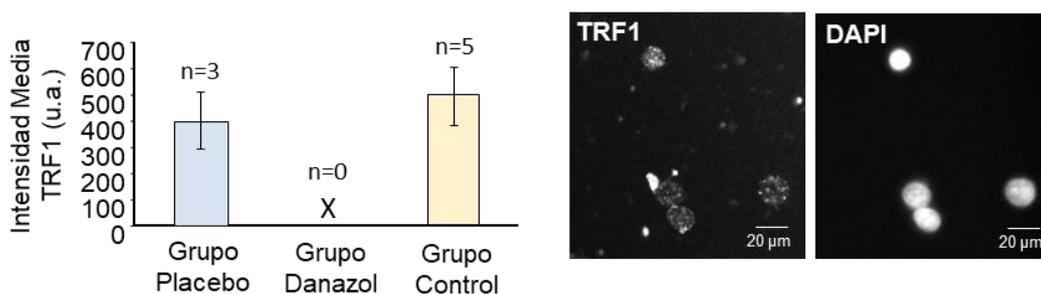


Figura 8: Protección telomérica en muestras de granulosas. Análisis de los niveles de TRF1.

RESULTADOS DE SENESCENCIA CELULAR EN SANGRE (p53) y DEL DAÑO EN EL ADN (H2AX)

Para evaluar si hay daño celular (senescencia celular) se analizaron durante las distintas visitas los niveles medios de las intensidades de p53 por inmunofluorescencia en muestras de sangre. Se utilizó el fluoróforo alexa fluor 488 verde

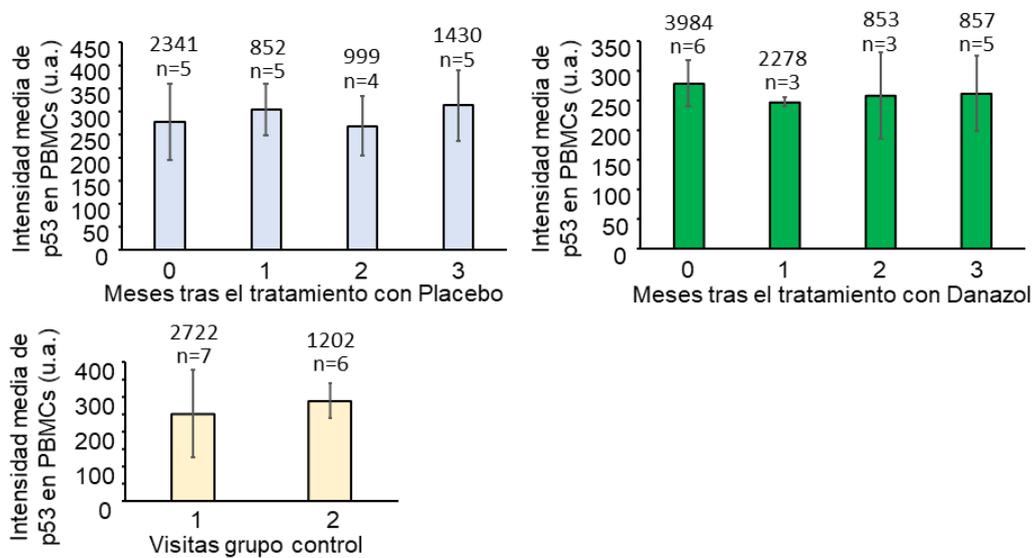


Figura 9: Análisis de senescencia celular en sangre (PBMCs). Evaluación de las medias de intensidad de p53.

No se observaron diferencias en las intensidades de p53 en ninguno de los tres grupos durante los meses de tratamiento en sangre (Figura 9). Aunque el número de muestras por visita es reducido, podemos decir que en principio el tratamiento con Danazol no ha causado un daño celular durante los tres meses de tratamiento.

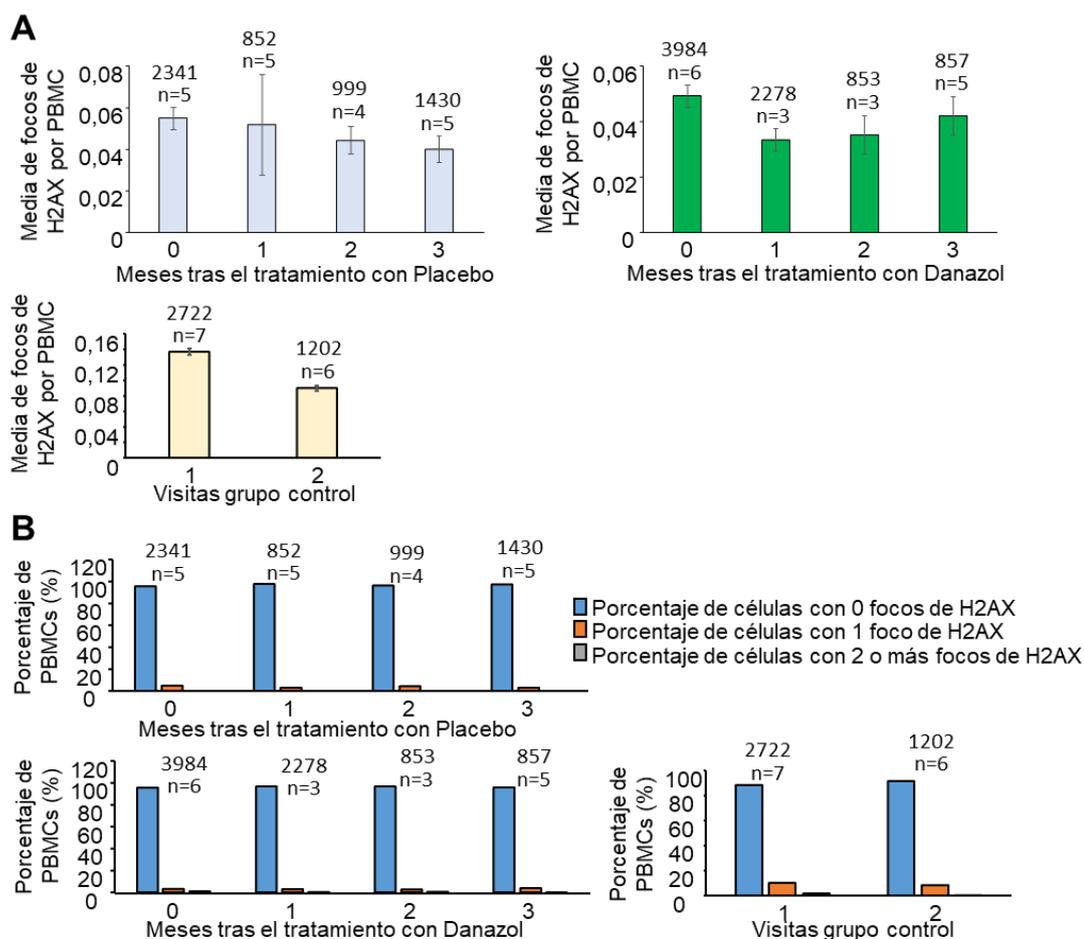


Figura 10: Análisis del daño al ADN en PBMCs. Media de focos de H2AX por célula (A) y porcentaje de células con 0, 1 o 2 o más focos de H2AX (B).

A continuación, se evaluó si el tratamiento con Danazol podría estar causando daño al ADN en PBMCs. Con este fin, se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la histona Gamma-H2AX fosforilada, un marcador de daño al ADN, y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa fluor 488 verde. La fosforilación de la histona H2AX se produce como respuesta temprana a las roturas de la doble cadena de ADN. Por lo tanto, en una célula dañada se observarán uno o más focos de H2AX en la inmunofluorescencia. En la figura 10A se muestran las medias de focos de H2AX en cada visita. En los tres grupos la media de focos es prácticamente 0 en todas las visitas durante el tratamiento. En la figura 10B se muestran en cada grupo las medias de los porcentajes de células con 0 focos (células no dañadas), de células con 1 foco de H2AX y de células con 2 o más focos de H2AX (muy dañadas) durante el tratamiento. En el grupo danazol se observa que casi el 100% de las células no tienen focos de H2AX en todas las visitas. Además, las medias de porcentajes de células con focos se mantienen constantes durante el tratamiento. Lo mismo se puede observar con los grupos Placebo y control. Estos resultados en conjunto muestran que el tratamiento con Danazol tampoco ha causado daño en el ADN en sangre de las pacientes.

RESULTADOS DE LOS NIVELES DE TERRAs EN SANGRE

Por último, se evaluaron los niveles de TERRAs (Telomere repeat containing RNAs, por sus siglas en inglés) en sangre. Se tratan de RNA teloméricos, transcritos a partir de las regiones subteloméricas de los telómeros. Entre sus funciones descritas se encuentran la protección telomérica y la regulación negativa de la actividad telomerasa a través de la interacción con TERT. Para su análisis se realizó un RNA FISH con la misma sonda telomérica marcada con el fluoróforo Cy3.

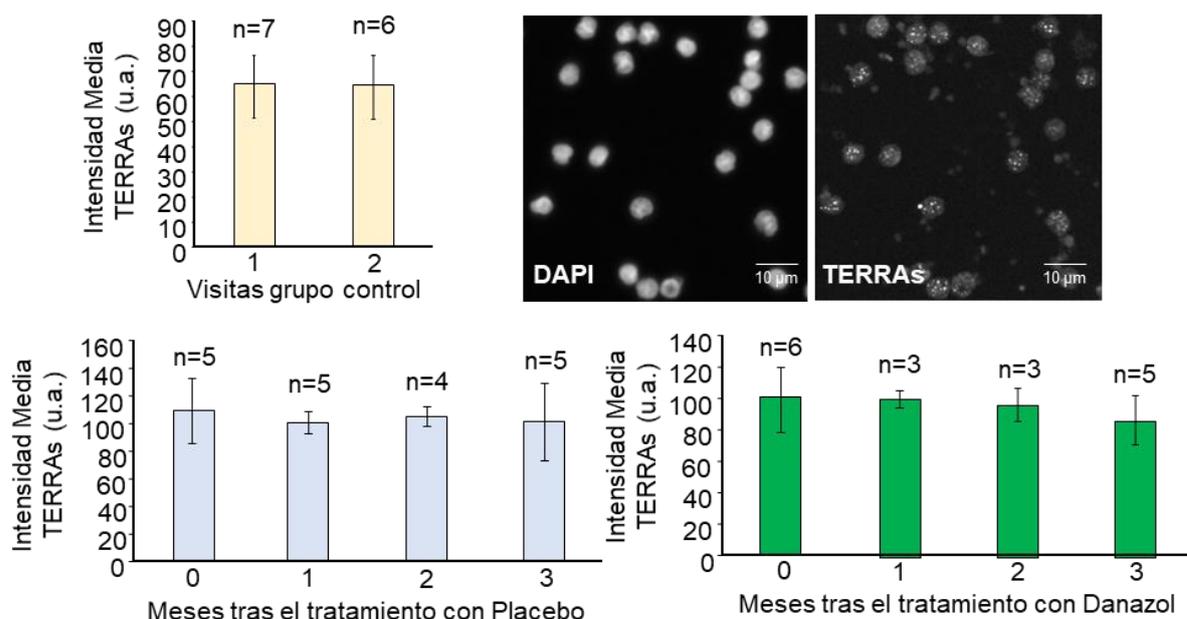


Figura 11: Análisis de los niveles de expresión de TERRAs en muestras de sangre (PBMCs)

En la figura 11 se muestran los resultados de las medias de intensidad de TERRAs obtenidas en los tres grupos. En ninguno de los tres grupos se observan diferencias estadísticamente significativas durante las distintas visitas. Sin embargo, en el grupo Danazol se puede observar una ligera disminución de sus niveles durante los tres meses de tratamiento. Debido al limitado número de muestras no podemos confirmar esta teoría ya que los resultados podrían deberse al azar. En los grupos placebo y control los niveles de INTENSIDAD TERRAs se mantienen constantes.

Sin embargo, cuando se evaluó el número de focos de TERRA por célula, se observaron diferencias interesantes. En el grupo tratado con Danazol, se registró una disminución en el porcentaje de células con un único foco de TERRA tras el primer mes de tratamiento ($p=0.04$, Tabla 5), estabilizándose luego hasta el segundo mes de tratamiento ($p=0.019$). Paralelamente, las células con 2 a 4 focos de TERRA experimentaron un aumento después del primer mes de tratamiento ($p=0.02$; Tabla 5), manteniéndose así hasta el segundo mes ($p=0.03$; Tabla 5).

Por el contrario, no se identificaron cambios estadísticamente relevantes en los porcentajes de células con focos TERRA en las visitas del grupo control o del

grupo con placebo (Tabla 9). Además, el porcentaje de células con más de cinco focos TERRA no mostró variaciones significativas en ninguna de las visitas en los tres grupos analizados (Tabla 5).

En resumen, estos hallazgos sugieren un posible efecto del Danazol en el mantenimiento de los telómeros mediante la modulación de los focos de TERRA. Sin embargo, es crucial destacar que, dadas las limitaciones inherentes al tamaño muestral de este estudio piloto, las conclusiones deben interpretarse con cautela y validar en estudios futuros con una muestra más amplia.

	GRUPO CONTROL, RON	GRUPO PLACEBO, ROD	GRUPO DANAZOL, ROD
Pre-tratamiento, n	7	4	6
Células con 1 foco (%)			
Media ± DE	35.5±8.9	35.8±8.5	49.6±18.1
Mediana (Q1-Q3)	36.8 (31.3-40.7)	36.5 (27.2-43.6)	53.5 (31.4-65.6)
Células con 2-4 focos (%)			
Media ± DE	44.3±3.4	49.0±8.7	39.7±9.1
Mediana (Q1-Q3)	45.3 (42.4-47.4)	49.5 (40.4-57.2)	42.1 (28.9-47.8)
Células con ≥5 focos (%)			
Media ± DE	20.0±10.9	15.1±4.0	10.8±10.5
Mediana (Q1-Q3)	20.0 (13.1-23.0)	16.3 (10.9-18.0)	7.2 (2.8-20.6)
1 mes post-tratamiento, n	6 ^{*1}	4	3
Células con 1 foco(%)			
Media ± DE	34.8±9.8	41.5±10.1	33.5±4.2
Mediana (Q1-Q3)	34.8 (24.3-45.1)	41.8 (31.6-51.0)	33.3 (29.3-33.8)
			* ² p = 0.04
Células con 2-4 focos (%)			
Media ± DE	45.4±1.3	46.7±2.2	54.2±3.1
Mediana (Q1-Q3)	45.3 (44.2-46.0)	46.4 (44.8-49.0)	54.8 (50.8-57.1)
			* ³ p = 0.02
Células con ≥5 focos (%)			
Media ± DE	18.2±8.7	11.7±10.7	12.2±3.2
Mediana (Q1-Q3)	18.4 (9.4-25.4)	10.7 (1.8-22.5)	11.2 (9.5-15.8)
2 meses post-tratamiento, n	No tratadas	4	3
Células con 1 foco (%)			
Media ± DE	x	28.2±8.5	36.6±5.4
Mediana (Q1-Q3)	x	27.1 (20.6-36.8)	38.9 (30.4-40.5)
			* ⁴ p = 0.01
Celúlas con 2-4 focos (%)			
Media ± DE	x	46.7±3.6	50.7±4.8
Mediana (Q1-Q3)	x	47.0 (43.2-49.9)	53.1 (45.1-53.9)
			* ⁵ p = 0.03
Células con ≥5 focos (%)			
Media ± DE	x	25.0±10.0	12.6±5.4
Mediana (Q1-Q3)	x	28.4 (14.4-32.2)	15.6 (6.3-15.9)
3 meses post-tratamiento, n	No tratadas	4	5
Celúlas con 1 foco (%)			
Media ± DE	x	39.0±13.5	38.5±11.6
Mediana (Q1-Q3)	x	39.0 (25.9-52.1)	31.7 (29.4-51.0)
Células con 2-4 focos (%)			
Media ± DE	x	44.9±4.2	44.5±4.0
Mediana (Q1-Q3)	x	46.2 (40.6-48.0)	46.2 (40.4-47.7)
Células con ≥5 focos (%)			
Media ± DE	x	16.0±9.8	16.9±8.3
Mediana (Q1-Q3)	x	14.7 (7.1-26.0)	21.2 (8.6-23.1)

Figura 5: Análisis del número de focos de TERRAs en muestrars de sangre

ABANDONOS Y ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Dos pacientes asignadas al grupo que recibió Danazol abandonaron el estudio; una se retiró debido a acontecimientos adversos leves y la otra por razones ajenas al estudio. En contraste, todas las participantes en los grupos de placebo y control completaron el estudio. Cabe destacar que todos los efectos secundarios observados durante el período de ensayo estaban ya descritos en el prospecto del medicamento utilizado.

A lo largo del ensayo clínico, se registraron dos eventos adversos no graves. El primero fue una infección del tracto urinario de intensidad moderada en una paciente, que fue tratada con éxito mediante una terapia de fosfomicina granulada, administrada en dos dosis de 3 gramos cada una. Tras el tratamiento, la infección remitió y la paciente pudo continuar participando en el estudio. Es importante señalar que esta infección del tracto urinario no fue atribuida al tratamiento con Danazol.

El segundo evento adverso ocurrió en otra paciente del grupo tratado con Danazol, quien reportó sensaciones de cosquilleo en las piernas, acompañadas de un dolor leve de cabeza y mareo ligero. Se suspendió la medicación y se realizó una exploración física y una analítica sanguínea a la paciente. Aunque la exploración física no reveló indicios de trombosis, los análisis de sangre mostraron un incremento clínicamente significativo en el conteo de plaquetas (462,000/ μ l). La paciente fue enviada a urgencias para una evaluación más detallada y se le administró analgesia concomitante con paracetamol (650 mg vía oral). Los análisis de sangre realizados al día siguiente mostraron una disminución en los niveles de plaquetas (368,000/ μ l), y la sintomatología se resolvió en los días subsiguientes. En la visita final del estudio, los niveles de plaquetas habían vuelto a los rangos normales (294,000/ μ l), al igual que el resto de los parámetros evaluados.

PRECAUCIONES A TENER EN CUENTA

El estudio presentó varias limitaciones significativas que se deben tenerse en cuenta. Una de ellas fue la falta de datos sobre los parámetros teloméricos en las células de granulosa, debido a la cancelación de las punciones ovocitarias en el grupo tratado con Danazol. El efecto androgénico observado tras el primer ciclo de estimulación sugiere que futuros estudios con este fármaco en el ámbito de la fertilidad deberían emplear un diseño experimental diferente. Tras la última administración de Danazol, sería recomendable esperar al menos 4 o 5 meses, que es el tiempo que dura la foliculogénesis, antes de iniciar un nuevo ciclo de estimulación ovárica. De este modo, se podría minimizar el efecto androgénico a corto plazo. Unos meses después del tratamiento, los niveles hormonales alterados por el Danazol deberían haberse estabilizado, y los folículos primordiales dianas del medicamento empezarían a reclutarse. Sin embargo, es importante tener en cuenta que hacer esperar a las pacientes en clínicas de reproducción asistida, especialmente en las privadas, resulta contraproducente. La duración del tratamiento también fue un factor limitante, ya que el tiempo es

un factor crítico para estas pacientes debido a la disminución exponencial de su reserva ovárica.

Otra limitación significativa fue el tamaño insuficiente de la muestra del estudio, lo cual impide extraer conclusiones robustas. Las observaciones presentadas en este trabajo requieren validación en ensayos más grandes que ofrezcan el poder estadístico necesario para detectar los efectos más sutiles del tratamiento. Inicialmente, el estudio tenía como objetivo reclutar un total de 15 mujeres por grupo; sin embargo, una serie de complicaciones impidieron alcanzar este objetivo. En concreto, los problemas incluyeron la coincidencia del inicio del reclutamiento con la aparición de la pandemia de la COVID-19, lo que detuvo el estudio y ralentizó el reclutamiento. Por otro lado, el diseño estricto del estudio también jugó un papel. Este diseño, demasiado riguroso, requería que las pacientes detuvieran el inicio de sus tratamientos por tres meses para la administración del tratamiento, lo que desanimó a muchas a participar.

CONCLUSION

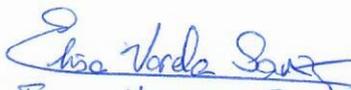
Aunque nuestros resultados deben interpretarse con cautela debido a las limitaciones descritas, estos hallazgos preliminares sugieren que el Danazol podría tener un efecto modulador en la dinámica telomérica y posiblemente en la fertilidad a largo plazo. Las complejidades y ambigüedades observadas en este estudio piloto subrayan la necesidad de más investigaciones para obtener una comprensión completa de los efectos de este medicamento.

**RESULTADOS FINALES
DANTEL PILOT
(1707-FIVI-084-MV)**

Investigadores:

María Elisa Varela Sanz

Isabel Córdova Oriz


ELISA VARELA SANZ
20-IX-2022
07



ISABEL CORDOVA

20/07/22

LONGITUD TELOMÉRICA**MEDIAS LT SANGRE****UNIDADES ARBITRARIAS (U.A.)**

GRUPO 1		Media V2	Media V3	Media V4	Media V5	Media V8
N 004	4	155,1	165,4	No muestra	160,9	No muestra
N 005	5	155,1	152,7	162,5	175,5	194,6
N 006	6	138,5	143,4	145,6	145,4	186,8
N 008	8	179,3	169,7	159,9	182,6	149,8
N 009	9	166,1	161,1	175,6	171,3	No muestra
MEDIAS		158,82	158,46	166	163,275	177,066667
SD		15,1080111	10,5053796	12,2982384	14,4721457	23,933519

MEDIAS PORCENTAJE TELÓMEROS CORTOS SANGRE**MEDIAS LT SANGRE**

GRUPO 1		Media V2	Media V3	Media V4	Media V5
N 004	4	11,5384615	17,2619048		12,8742515
N 005	5	14,2156863	25,1497006	16,8168168	14,7557049
N 006	6	25,3031974	21,4285714	2,7027027	20,1041986
N 008	8	13,4023669	13,0067776	15,2475658	10,5357143
N 009	9	13,9944713	12,8323699	14,3355705	11,9926199
MEDIAS		15,6908367	17,9358649	13,1142987	14,0524978
SD		5,47563958	5,3627001	6,46372111	3,71203146

MEDIAS PORCENTAJE TELÓMEROS LARGOS SANGRE**MEDIAS LT SANGRE**

GRUPO 1		Media V2	Media V3	Media V4	Media V5
N 004	4	13,4615385	18,8492063		15,2694611
N 005	5	13,2352941	12,8742515	18,9189189	23,5965281
N 006	6	7,60749724	7,14285714	8,10810811	6,94401958
N 008	8	25,7692308	18,5582255	13,7663145	24,8214286
N 009	9	20,5943331	12,8323699	23,9731544	18,7269373
MEDIAS		16,1335787	14,0513821	16,191624	17,8716749
SD		7,08833616	4,84587709	6,81213887	7,21092333

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

ISABEL GORDON
 Isabel
 20/07/22

GRUPO 2	Nº CRD	Media V2	Media V3	Media V4	Media V5	Media V8
N 002	2	123,1	No muestra	No muestra	138,3	No muestra
N 003	3	144,5	No muestra	No muestra	160,8	No muestra
N 007	7	163,9	173,3	162,3	156,5	No muestra
N012	12	163,3	170,5	152,4	154,7	No muestra
N010	10	144,7	171,4	150,7	165,5	No muestra
N 011	11	No muestra				
N 013	13	161,6	No muestra	No muestra	No muestra	No muestra
MEDIAS		158,375	171,733333	152,4	158,9	
SD		16,0400021	1,42945211	6,26444996	10,307667	

GRUPO 2	Nº CRD	Media V2	Media V3	Media V4	Media V5
N 002	2	32,3943662	No muestra	No muestra	25,3333333
N 003	3	22,5409836	No muestra	No muestra	19,1135734
N 007	7	12,962963	15,1673492	11,9911991	16,4167324
N012	12	12,3069498	12,292563	18,7088274	17,9490462
N010	10	13,7931034	14,4031142	18,699187	15,3526971
N 011	11	No muestra	No muestra	No muestra	No muestra
N 013	13	13,1024706	No muestra	No muestra	No muestra
MEDIAS		17,8501394	13,9543421	16,4664045	18,8330765
SD		8,08887998	1,48900848	3,87564455	3,90721405

GRUPO 2	Nº CRD	Media V2	Media V3	Media V4	Media V5
N 002	2	10,2972098	No muestra	No muestra	4
N 003	3	10,6557377	No muestra	No muestra	16,066482
N 007	7	18,05555556	20,94776868	14,1914191	12,9439621
N012	12	13,75482625	17,8139725	10,9354414	18,6721992
N010	10	4,137931034	22,0876586	8,47851336	12,0343106
N 011	11	No muestra	No muestra	No muestra	No muestra
N 013	13	13,77075739	No muestra	No muestra	No muestra
MEDIAS		10,5232924	20,2831333	11,2017913	12,7433908
SD		4,67139147	2,21300774	2,86575118	5,5494056

GRUPO 3	Nº CRD	Media V2	Media V5
N 001	14	153,2	147,3
N 014	15	111,8	124
N 015	16	125,6	No muestra
N 016	17	122,7	118,3
N 017	18	138,3	136,9
N 018	19	114,4	152,8
N 020	20	125,1	116,7
MEDIAS		125,22	131,175
SD		14,3024473	15,3222279

GRUPO 3	Nº CRD	Media V2	Media V5
N 001	14	18,7725632	18,5867896
N 014	15	31,2177798	20,3125
N 015	16	10,7959851	No muestra
N 016	17	17,1034252	24,0829346
N 017	18	13,6203377	9,52380952
N 018	19	10,0034584	7,49646393
N 020	20	14,6152631	20,5272013
MEDIAS		16,5898303	16,7549498
SD		7,17252569	6,66258199

GRUPO 3	Nº CRD	Media V2	Media V5
N 001	14	32,1299639	33,9477727
N 014	15	14,5262917	10,4166667
N 015	16	6,12745098	No muestra
N 016	17	9,39822317	10,8630161
N 017	18	8,53590648	17,4603175
N 018	19	4,98011413	30,4101839
N 020	20	3,90267025	7,92671527
MEDIAS		11,3715172	18,504112
SD		9,80590152	11,1087816

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

ISABEL CORADOVA
Isabel
 20/07/22

LONGITUD TELOMÉRICA CÉLULAS GRANULOSA

MEDIAS LT CG

UNIDADES ARBITRARIAS (U.A.)

GRUPO 1	Media V8	GRUPO 2	Nº CRD	Media V8	GRUPO 3	Nº CRD	Media V8
N 004	4 No muestra	N 002	2 No muestra	N 001	14	82,05	
N 005	5 70,85	N 003	3 No muestra	N 014	15	91,27	
N 006	6 66,63	N 007	7 No muestra	N 015	16	No muestra	
N 008	8 126,3	N 012	12 No muestra	N 016	17	80,67	
N 009	9 No muestra	N 010	10 No muestra	N 017	18	80,73	
MEDIAS	87,9266667	N 011	11 No muestra	N 018	19	101,2	
SD	33,2991987	N 013	13 No muestra	N 020	20	76,6	
MEDIAS				X	MEDIAS		84,8
					SD		9,131689876

Isabel
20/07/22

MEDIAS PORCENTAJE TELÓMEROS CORTOS SANGRE

MEDIAS LT CG

GRUPO 1	Media V8	GRUPO 2	Nº CRD	Media V8	GRUPO 3	Nº CRD	Media V8
N 004	4 No muestra	N 002	2 No muestra	N 001	14	22,6277372	
N 005	5 9,0909091	N 003	3 No muestra	N 014	15	10	
N 006	6 40,909091	N 007	7 No muestra	N 015	16	No muestra	
N 008	8 3,652968	N 012	12 No muestra	N 016	17	12,1398258	
N 009	9 No muestra	N 010	10 No muestra	N 017	18	13,7413395	
MEDIAS	17,8843227	N 011	11 No muestra	N 018	19	11,9170984	
SD	20,1245563	N 013	13 No muestra	N 020	20	20,7589286	
MEDIAS				X	MEDIAS		14,63929808
					SD		5,203512828

Isabel
20/07/22

MEDIAS PORCENTAJE TELÓMEROS LARGOS SANGRE

MEDIAS LT CG

GRUPO 1	Media V8	GRUPO 2	Nº CRD	Media V8	GRUPO 3	Nº CRD	Media V8
N 004	4 No muestra	N 002	2 No muestra	N 001	14	16,0583942	
N 005	5 9,0909091	N 003	3 No muestra	N 014	15	10	
N 006	6 6,3636364	N 007	7 No muestra	N 015	16	No muestra	
N 008	8 47,031964	N 012	12 No muestra	N 016	17	22,7496091	
N 009	9 No muestra	N 010	10 No muestra	N 017	18	7,00538876	
MEDIAS	20,8288363	N 011	11 No muestra	N 018	19	23,8341969	
SD	22,7335085	N 013	13 No muestra	N 020	20	8,48214286	
MEDIAS				X	MEDIAS		15,51783441
					SD		7,348917758

Isabel
20/07/22

Elisa Varela Sanz
ELISA VARELA SANZ
20-7-2022

ISABEL CORDOVA
Isabel
20/07/22

SHELTERINA TRF1 EN SANGRE

MEDIAS TRF1 SANGRE		UNIDADES ARBITRARIAS (U.A.)				
GRUPO 1		Media V2	Media V3	Media V4	Media V5	Media V8
N 004	4	399,7	445	No muestra	894,4	No muestra
N 005	5	512,2	307,1	424	314,8	367,8
N 006	6	267,8	415	669,5	467,7	536,5
N 008	8	405,2	466,1	638	459,9	522,9
N 009	9	637,3	791,6	668,6	577,1	No muestra
MEDIAS		444,44	484,96	600,025	542,78	475,733333
SD		138,319858	182,009046	118,259894	217,540495	93,7200263

GRUPO 2	Nº CRD	Media V2	Media V3	Media V4	Media V5	Media V8
N 002	2	277,6	No muestra	No muestra	301,2	No muestra
N 003	3	297,6	No muestra	No muestra	547,1	No muestra
N 007	7	638,6	408	536,9	683,2	No muestra
N012	12	485	534,6	857,8	483,1	No muestra
N010	10	334,7	502,7	425,8	647,1	No muestra
N 011	11	No muestra				
N 013	13	574	No muestra	No muestra	No muestra	No muestra
MEDIAS		434,583333	481,766667	606,833333	532,34	
SD		152,961778	65,8448429	224,330121	151,654815	

GRUPO 3	Nº CRD	Media V2	Media V5
N 001	14	361,7	363,1
N 014	15	762,9	463
N 015	16	698,7	No muestra
N 016	17	702,3	823,9
N 017	18	678	790,9
N 018	19	753,4	654,1
N 020	20	852,8	1096
MEDIAS		687,114286	698,5
SD		154,882422	265,403067

Elisa Varela Sanz

ELISA VARELA SANZ

20-7-2022

ISABEL CÁRDUA

Isabel

20/07/22

SHELTERINA TRF1 EN CÉLULAS DE GRANULOSA

MEDIAS TRF1 CG UNIDADES ARBITRARIAS (U.A.)

GRUPO 1		Media V8
N 004	4	No muestra
N 005	5	243,4
N 006	6	351,5
N 008	8	613
N 009	9	No muestra
SD		190,031585

GRUPO 2	Nº CRD	Media V8
N 002	2	No muestra
N 003	3	No muestra
N 007	7	No muestra
N012	12	No muestra
N010	10	No muestra
N 011	11	No muestra
N 013	13	No muestra

GRUPO 3	Nº CRD	Media V8
N 001	14	231,1
N 014	15	No muestra
N 015	16	No muestra
N 016	17	257,1
N 017	18	775,4
N 018	19	678,3
N 020	20	528,3
SD		244,727886

Isabel 20/07/22

Elisa Varela Sanz
ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

ISABEL GÓMEZ
~~*Isabel*~~
 20/07/22

MEDIAS TERRAS SANGRE UNIDADES ARBITRARIAS (U.A.)

GRUPO 1		Media V2	Media V3	Media V4	Media V5	Media V8
N 004	4	145	103,6		145,8	No muestra
N 005	5	105,3	98,67	103,2	108,3	32,06
N 006	6	78,65	89,05	116,1	69,96	27,72
N 008	8	114,5	109,1	106,4	95,14	91,99
N 009	9	107,6	107,9	99,18	91,49	No muestra
MEDIA		110,21	101,664	106,22	102,138	50,59
SD		23,7471156	8,15485929	7,21869794	28,0272906	35,9190604

20/07/22

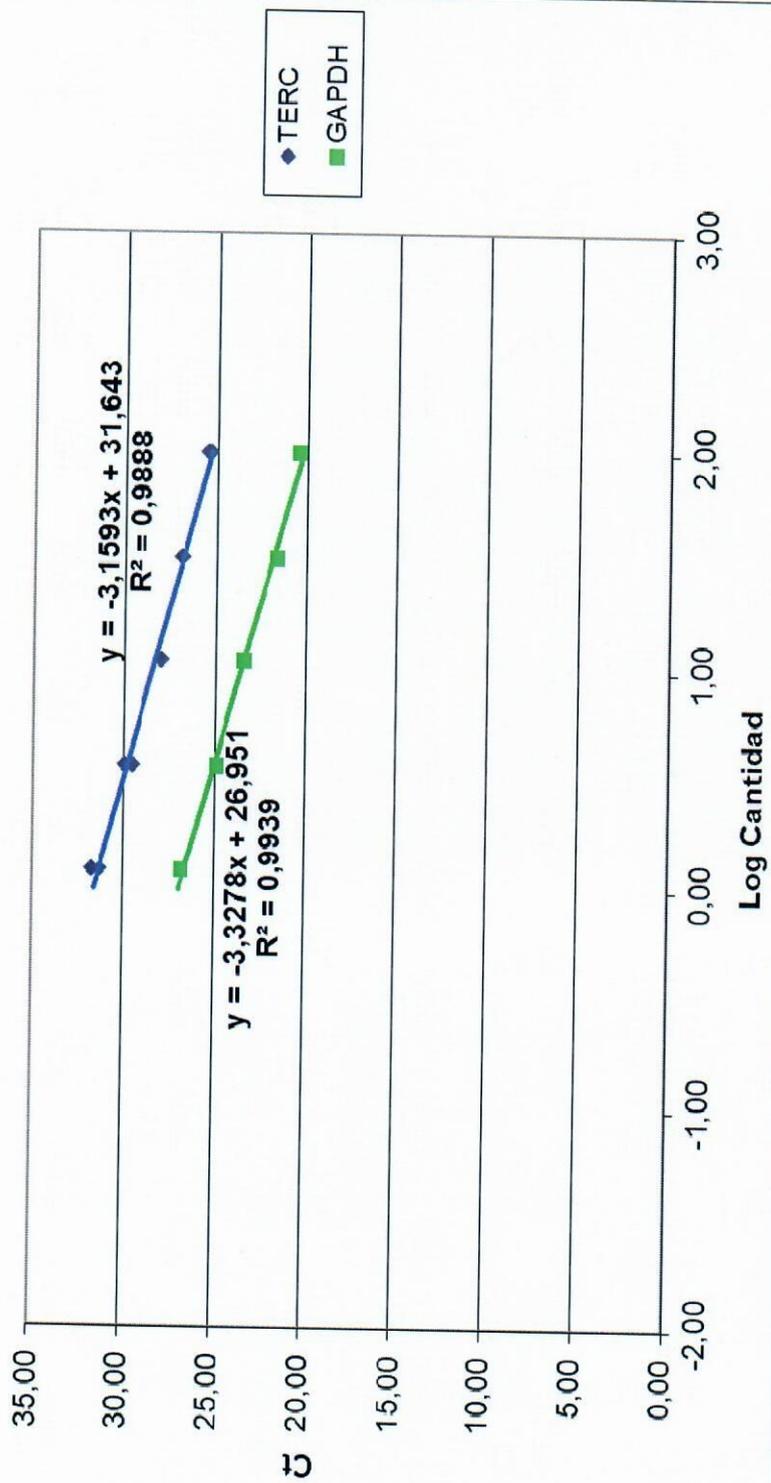
GRUPO 2	Nº CRD	Media V2	Media V3	Media V4	Media V5	Media V8
N 002	2	94,37	No muestra	No muestra	73,24	No muestra
N 003	3	64,78	No muestra	No muestra	89,67	No muestra
N 007	7	118,2	102,5	95,74	99,81	No muestra
N012	12	109,4	104,4	86,81	90,69	No muestra
N010	10	118,7	93,92	107,3	69,66	No muestra
N 011	11	No muestra				
N 013	13	92,24	No muestra	No muestra	No muestra	No muestra
MEDIA		99,615	100,273333	96,6166667	84,614	
SD		20,4976269	5,5835592	10,2730927	12,7120938	

GRUPO 3	Nº CRD	Media V2	Media V5
N 001	14	92,58	87,6
N 014	15	59,79	67,08
N 015	16	65,35	No muestra
N 016	17	60,99	55,6
N 017	18	60,64	56,35
N 018	19	56	65,72
N 020	20	56,86	52,87
MEDIA		64,6014286	64,2033333
SD		12,709316	12,8227621

Elisa Varela Sanz
ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

ISABEL CORDA
Isabel
 20/07/22

Rectas patrón



Elisa Varela Sanz
ELISA VARELA SANZ
20-7-2022
ISABEL GARCIA
Isabel
20/07/22

Block Type 96fast
 Chemistry SYBR_GREEN
 Experiment 2022-05-24 12:57:11 PM CEST
 Instrument sds7500fast
 Passive R_e ROX

Well	Sample Na	Target	Na	Reporter	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Ct SD	ΔCt	ΔCt Mean	ΔCt SE	HK Control
A1	B1D3A	GAPDH		SYBR				23,76572	23,72723	0,054442				
A2	B1D3A	GAPDH		SYBR				23,68873	23,72723	0,054442				
A3	B4D1D	GAPDH		SYBR				23,68344	24,21358	0,749734				
A4	B4D1D	GAPDH		SYBR				24,74373	24,21358	0,749734				
A5	B19D3A	GAPDH		SYBR				20,30936	20,31931	0,014074				
A6	B19D3A	GAPDH		SYBR				20,32926	20,31931	0,014074				
A7	B7D1C	GAPDH		SYBR				21,18354	21,53183	0,49256				
A8	B7D1C	GAPDH		SYBR				21,88013	21,53183	0,49256				
A9	B12D2C	GAPDH		SYBR				23,30501	23,41376	0,153802				
A10	B12D2C	GAPDH		SYBR				23,52252	23,41376	0,153802				
A11	B17D3A	GAPDH		SYBR				20,53603	20,34853	0,265166				
A12	B17D3A	GAPDH		SYBR				20,16103	20,34853	0,265166				
B1	B1D3E	GAPDH		SYBR				21,00381	21,20424	0,283441				
B2	B1D3E	GAPDH		SYBR				21,40466	21,20424	0,283441				
B3	B5D1A	GAPDH		SYBR				23,79863	24,65523	1,21141				
B4	B5D1A	GAPDH		SYBR				25,51182	24,65523	1,21141				
B5	B5D1D	GAPDH		SYBR				26,38379	26,35112	0,046196				
B6	B5D1D	GAPDH		SYBR				26,31846	26,35112	0,046196				
B7	B8D1C	GAPDH		SYBR				25,46931	24,23352	1,747671				
B8	B8D1C	GAPDH		SYBR				22,99773	24,23352	1,747671				
B9	B8D1D	GAPDH		SYBR				24,31657	23,42049	1,267249				
B10	B8D1D	GAPDH		SYBR				22,52441	23,42049	1,267249				
B11	B17D3D	GAPDH		SYBR				24,22685	24,11977	0,151435				
B12	B17D3D	GAPDH		SYBR				24,01269	24,11977	0,151435				
C1	B2D2A	GAPDH		SYBR				24,16845	24,35157	0,25897				
C2	B2D2A	GAPDH		SYBR				24,53469	24,35157	0,25897				
C3	B5D1C	GAPDH		SYBR				22,45948	22,56267	0,145931				
C4	B5D1C	GAPDH		SYBR				22,66586	22,56267	0,145931				
C5	B7D2D	GAPDH		SYBR				25,31428	25,28839	0,036613				
C6	B7D2D	GAPDH		SYBR				25,2625	25,28839	0,036613				
C7	B9D1C	GAPDH		SYBR				22,74636	23,79885	1,488446				
C8	B9D1C	GAPDH		SYBR				24,85134	23,79885	1,488446				
C9	B9D1D	GAPDH		SYBR				25,15985	25,33505	0,247767				

ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022
 ISABEL CORDOVA
 20/07/22

C10	B9D1D	GAPDH	SYBR	25,51025	25,33505	0,247767
C11	B16D3D	GAPDH	SYBR	28,2699	28,1264	0,202939
C12	B16D3D	GAPDH	SYBR	27,9829	28,1264	0,202939
D1	B3D2A	GAPDH	SYBR	20,40168	20,38489	0,023743
D2	B3D2A	GAPDH	SYBR	20,3681	20,38489	0,023743
D3	B6D1B	GAPDH	SYBR	23,81574	23,16073	0,926327
D4	B6D1B	GAPDH	SYBR	22,50572	23,16073	0,926327
D5	B12D2A	GAPDH	SYBR	28,9749	29,13633	0,228293
D6	B12D2A	GAPDH	SYBR	29,29775	29,13633	0,228293
D7	B10D2B	GAPDH	SYBR	25,3595	24,12727	1,742637
D8	B10D2B	GAPDH	SYBR	22,89504	24,12727	1,742637
D9	B10D2C	GAPDH	SYBR	37,24194	37,08451	0,222643
D10	B10D2C	GAPDH	SYBR	36,92708	37,08451	0,222643
D11	B20D3A	GAPDH	SYBR	22,94319	28,45812	7,799286
D12	B20D3A	GAPDH	SYBR	33,97305	28,45812	7,799286
E1	B3D2D	GAPDH	SYBR	23,33201	23,03527	0,419648
E2	B3D2D	GAPDH	SYBR	22,73854	23,03527	0,419648
E3	B7D2A	GAPDH	SYBR	23,60434	23,66848	0,090707
E4	B7D2A	GAPDH	SYBR	23,73262	23,66848	0,090707
E5	B8D1B	GAPDH	SYBR	27,63923	27,76888	0,18335
E6	B8D1B	GAPDH	SYBR	27,89852	27,76888	0,18335
E7	B13D2A	GAPDH	SYBR	24,45311	23,58717	1,22462
E8	B13D2A	GAPDH	SYBR	22,72124	23,58717	1,22462
E9	B10D2D	GAPDH	SYBR	23,66565	23,48697	0,25269
E10	B10D2D	GAPDH	SYBR	23,30829	23,48697	0,25269
E11	B20D3D	GAPDH	SYBR	27,27371	27,42125	0,20865
E12	B20D3D	GAPDH	SYBR	27,56878	27,42125	0,20865
F1	B2D2D	GAPDH	SYBR	Undeterminiert		
F2	B2D2D	GAPDH	SYBR	Undeterminiert		
F3	B8D1A	GAPDH	SYBR	26,12607	26,29953	0,245309
F4	B8D1A	GAPDH	SYBR	26,47299	26,29953	0,245309
F5	B9D1B	GAPDH	SYBR	24,25976	24,34446	0,119781
F6	B9D1B	GAPDH	SYBR	24,42916	24,34446	0,119781
F7	B6D1D	GAPDH	SYBR	28,52007	28,39581	0,17574
F8	B6D1D	GAPDH	SYBR	28,27154	28,39581	0,17574
F9	B12D2D	GAPDH	SYBR	25,1738	25,16261	0,015818
F10	B12D2D	GAPDH	SYBR	25,15143	25,16261	0,015818
F11	B18D3A	GAPDH	SYBR	23,79929	23,75973	0,055936
F12	B18D3A	GAPDH	SYBR	23,72018	23,75973	0,055936
G1	B4D1A	GAPDH	SYBR	25,99669	25,86931	0,180135

G2	B4D1A	GAPDH	SYBR	25,74194	25,86931	0,180135
G3	B9D1A	GAPDH	SYBR	25,77885	25,87894	0,141541
G4	B9D1A	GAPDH	SYBR	25,97902	25,87894	0,141541
G5	B10D2A	GAPDH	SYBR	24,07688	24,24418	0,23661
G6	B10D2A	GAPDH	SYBR	24,41149	24,24418	0,23661
G7	B5D1B	GAPDH	SYBR	27,96689	27,98565	0,026529
G8	B5D1B	GAPDH	SYBR	28,00441	27,98565	0,026529
G9	B14D3A	GAPDH	SYBR	27,79084	27,0049	1,111486
G10	B14D3A	GAPDH	SYBR	26,21896	27,0049	1,111486
G11	B18D3D	GAPDH	SYBR	27,72838	27,96658	0,336863
G12	B18D3D	GAPDH	SYBR	28,20478	27,96658	0,336863
H1	B4D1B	GAPDH	SYBR	31,57296	31,84754	0,388315
H2	B4D1B	GAPDH	SYBR	32,12212	31,84754	0,388315
H3	B6D1C	GAPDH	SYBR	33,21111	32,54116	0,947449
H4	B6D1C	GAPDH	SYBR	31,87121	32,54116	0,947449
H5	B12D1B	GAPDH	SYBR	29,72799	29,57458	0,216941
H6	B12D1B	GAPDH	SYBR	29,42118	29,57458	0,216941
H7	B7D2D	GAPDH	SYBR	31,05781	28,60551	3,468073
H8	B7D2D	GAPDH	SYBR	26,15322	28,60551	3,468073
H9	B16D3A	GAPDH	SYBR	34,68071	34,17227	0,719035
H10	B16D3A	GAPDH	SYBR	33,66384	34,17227	0,719035
H11	B21D3A	GAPDH	SYBR	28,23627	28,32075	0,119473
H12	B21D3A	GAPDH	SYBR	28,40523	28,32075	0,119473

Analysis T₁ Singleplex
 Endogenol GAPDH
 RQ Min/Me 95.0
 Reference Sample 1

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022
 ISABEL CORDOVA


20/07/22

HK Control $\Delta\Delta Ct$	Automatic (Ct Thresho Automatic Baseline S	Baseline S	Efficiency	Tm1	Tm2	Tm3	Comments	HIGHSD	NOAMP
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,9822		N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994		Y	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,9822		N	N

FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,80994	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,6377	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319	Y	Y
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,12094	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,46545	N	N
FALSO	0,208471	FALSO	3	15	1	86,29319	N	N

Block Type 96fast
 Chemistry SYBR_GREEN
 Experiment 2022-05-26 11:45:27 AM CEST
 Instrument sds7500fast
 Passive R_e ROX

Well	Sample Na	Target	Reporter	RQ	RQ Min	RQ Max	CT	CT Mean	CT SD	ΔCT	ΔCT Mean	ΔCT SE	HK Control
A1	B1D3A	H-TERC	SYBR				29,81505	29,51305	0,427098				
A2	B1D3A	H-TERC	SYBR				29,21104	29,51305	0,427098				
A3	B4D1D	H-TERC	SYBR				30,64469	30,64346	0,001741				
A4	B4D1D	H-TERC	SYBR				30,64223	30,64346	0,001741				
A5	B19D3A	H-TERC	SYBR				25,63685	25,66788	0,043881				
A6	B19D3A	H-TERC	SYBR				25,6989	25,66788	0,043881				
A7	B7D1C	H-TERC	SYBR				26,96682	27,07875	0,158291				
A8	B7D1C	H-TERC	SYBR				27,19068	27,07875	0,158291				
A9	B12D2C	H-TERC	SYBR				26,85476	26,92912	0,105158				
A10	B12D2C	H-TERC	SYBR				27,00347	26,92912	0,105158				
A11	B17D3A	H-TERC	SYBR				26,32152	26,58778	0,376542				
A12	B17D3A	H-TERC	SYBR				26,85403	26,58778	0,376542				
B1	B1D3E	H-TERC	SYBR				27,44399	27,36319	0,114262				
B2	B1D3E	H-TERC	SYBR				27,2824	27,36319	0,114262				
B3	B5D1A	H-TERC	SYBR				29,59909	29,59909					
B4	B5D1A	H-TERC	SYBR				Undetermin	29,59909					
B5	B5D1D	H-TERC	SYBR				30,57118	30,35142	0,310792				
B6	B5D1D	H-TERC	SYBR				30,13165	30,35142	0,310792				
B7	B8D1C	H-TERC	SYBR				29,03397	28,93791	0,135845				
B8	B8D1C	H-TERC	SYBR				28,84185	28,93791	0,135845				
B9	B8D1D	H-TERC	SYBR				27,25786	27,45238	0,275096				
B10	B8D1D	H-TERC	SYBR				27,6469	27,45238	0,275096				
B11	B17D3D	H-TERC	SYBR				28,96198	30,29583	1,886339				
B12	B17D3D	H-TERC	SYBR				31,62967	30,29583	1,886339				
C1	B2D2A	H-TERC	SYBR				33,05685	29,75177	4,674102				
C2	B2D2A	H-TERC	SYBR				26,44668	29,75177	4,674102				
C3	B5D1C	H-TERC	SYBR				27,68501	27,62673	0,08241				
C4	B5D1C	H-TERC	SYBR				27,56846	27,62673	0,08241				
C5	B7D2D	H-TERC	SYBR				29,57751	29,42581	0,214542				
C6	B7D2D	H-TERC	SYBR				29,2741	29,42581	0,214542				
C7	B9D1C	H-TERC	SYBR				28,69363	28,58687	0,150975				
C8	B9D1C	H-TERC	SYBR				28,48012	28,58687	0,150975				
C9	B9D1D	H-TERC	SYBR				30,1168	30,01446	0,144725				

ELISA VARELA SANZ
 ELISA VARELA SANZ
 90-7-2022
 20/07/22

C10	B9D1D	H-TERC	SYBR	29,91213	30,01446	0,144725
C11	B16D3D	H-TERC	SYBR	31,79995	31,91464	0,162196
C12	B16D3D	H-TERC	SYBR	32,02933	31,91464	0,162196
D1	B3D2A	H-TERC	SYBR	26,48559	26,68405	0,280659
D2	B3D2A	H-TERC	SYBR	26,8825	26,68405	0,280659
D3	B6D1B	H-TERC	SYBR	28,28559	28,51329	0,322011
D4	B6D1B	H-TERC	SYBR	28,74099	28,51329	0,322011
D5	B12D2A	H-TERC	SYBR	31,3019	31,37395	0,101896
D6	B12D2A	H-TERC	SYBR	31,44601	31,37395	0,101896
D7	B10D2B	H-TERC	SYBR	29,67832	29,96521	0,405725
D8	B10D2B	H-TERC	SYBR	30,2521	29,96521	0,405725
D9	B10D2C	H-TERC	SYBR	36,20509	36,03609	0,239003
D10	B10D2C	H-TERC	SYBR	35,86709	36,03609	0,239003
D11	B20D3A	H-TERC	SYBR	27,71855	28,56479	1,196767
D12	B20D3A	H-TERC	SYBR	29,41104	28,56479	1,196767
E1	B3D2D	H-TERC	SYBR	29,06705	29,02838	0,054696
E2	B3D2D	H-TERC	SYBR	28,9897	29,02838	0,054696
E3	B7D2A	H-TERC	SYBR	28,8794	28,77694	0,1449
E4	B7D2A	H-TERC	SYBR	28,67448	28,77694	0,1449
E5	B8D1B	H-TERC	SYBR	30,81805	30,85226	0,04839
E6	B8D1B	H-TERC	SYBR	30,88648	30,85226	0,04839
E7	B13D2A	H-TERC	SYBR	27,35054	27,42685	0,107928
E8	B13D2A	H-TERC	SYBR	27,50317	27,42685	0,107928
E9	B10D2D	H-TERC	SYBR	29,17676	29,06918	0,152144
E10	B10D2D	H-TERC	SYBR	28,9616	29,06918	0,152144
E11	B20D3D	H-TERC	SYBR	31,01706	31,00663	0,014744
E12	B20D3D	H-TERC	SYBR	30,99621	31,00663	0,014744
	B2D2D					
	B2D2D					
F3	B8D1A	H-TERC	SYBR	29,90253	29,88288	0,027785
F4	B8D1A	H-TERC	SYBR	29,86324	29,88288	0,027785
F5	B9D1B	H-TERC	SYBR	27,3471	28,89801	2,193317
F6	B9D1B	H-TERC	SYBR	30,44892	28,89801	2,193317
F7	B6D1D	H-TERC	SYBR	31,86049	32,07994	0,310352
F8	B6D1D	H-TERC	SYBR	32,29939	32,07994	0,310352
F9	B12D2D	H-TERC	SYBR	28,87585	28,87876	0,004109
F10	B12D2D	H-TERC	SYBR	28,88167	28,87876	0,004109
F11	B18D3A	H-TERC	SYBR	27,53561	27,50517	0,04306
F12	B18D3A	H-TERC	SYBR	27,47472	27,50517	0,04306
G1	B4D1A	H-TERC	SYBR	28,3385	27,78277	0,785909

G2	B4D1A	H-TERC	SYBR
G3	B9D1A	H-TERC	SYBR
G4	B9D1A	H-TERC	SYBR
G5	B10D2A	H-TERC	SYBR
G6	B10D2A	H-TERC	SYBR
G7	B5D1B	H-TERC	SYBR
G8	B5D1B	H-TERC	SYBR
G9	B14D3A	H-TERC	SYBR
G10	B14D3A	H-TERC	SYBR
G11	B18D3D	H-TERC	SYBR
G12	B18D3D	H-TERC	SYBR
H1	B4D1B	H-TERC	SYBR
H2	B4D1B	H-TERC	SYBR
H3	B6D1C	H-TERC	SYBR
H4	B6D1C	H-TERC	SYBR
H5	B12D1B	H-TERC	SYBR
H6	B12D1B	H-TERC	SYBR
H7	B7D2D	H-TERC	SYBR
H8	B7D2D	H-TERC	SYBR
H9	B16D3A	H-TERC	SYBR
H10	B16D3A	H-TERC	SYBR
H11	B21D3A	H-TERC	SYBR
H12	B21D3A	H-TERC	SYBR

27,22705	27,78277	0,785909
31,38664	31,12808	0,365667
30,86951	31,12808	0,365667
28,88308	28,90256	0,027551
28,92204	28,90256	0,027551
30,70907	30,76609	0,080633
30,8231	30,76609	0,080633
28,75123	28,86848	0,165813
28,98572	28,86848	0,165813
29,55298	29,8194	0,376777
30,08582	29,8194	0,376777
33,73149	33,37582	0,503005
33,02014	33,37582	0,503005
35,41504	35,34605	0,097573
35,27705	35,34605	0,097573
35,48429	34,55468	1,314666
33,62507	34,55468	1,314666
28,79921	29,01908	0,310941
29,23895	29,01908	0,310941
Undeterminir		
Undeterminir		
32,12484	32,70823	0,82504
33,29162	32,70823	0,82504

Analysis T₁ Singleplex
 Endogenol H-TERC
 RQ Min/Me 95.0
 Reference Sample 1

Elisa Varela Sante
 ELISA VARELA SANTE
 20-7-2022
 LABEL CORRECT
 20/07/22

FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,74145	Y	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,57047	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,74145	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	89,08342	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	89,08342	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	89,08342	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,2285	Y	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,2285	Y	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,05751	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,05751	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,2285	Y	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,39948	Y	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,74145	N	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	61,89689	N	Y
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	63,60674	N	Y
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,91243	Y	N
FALSO	0,400618	FALSO	3	20	1	88,74145	Y	N

MEDIAS EXPRESIÓN TERC/GAPDH EN SANGRE

GRUPO 1 VA (PRE-TTO)

B4D1A	8,5
B5D1A	0,8
B8D1A	2,3
B9D1A	0,7

GRUPO 1 VB (1M)

B4D1B	8,5
B5D1B	3,9
B6D1B	0,7
B8D1B	3,1
B9D1B	3,8

GRUPO 1 VC (2M)

B5D1C	0,9
B6D1C	2,9
B8D1C	0,8
B9D1C	0,8

GRUPO 1 VD (3M)

B4D1D	0,4
B5D1D	1,7
B6D1D	2,0
B8D1D	1,6
B9D1D	1,1

GRUPO 2 VA (PRE-TTO)

B2D2A	7,2
B3D2A	0,4
B7D2A	0,8
B12D2A	5,5
B10D2A	1,1
B13D2A	1,8

GRUPO 2 VB (1M)

B12D1B	1,4
B10D2B	1,2

GRUPO 2 VC (2M)

B7D1C	0,8
B12D2C	2,7
B10D2C	45,2

GRUPO 2 VD (3M)

B2D2D	3,9
B3D2D	0,4
B7D2D	1,6
B10D2D	0,6
B12D2D	2,2

G3 V0

B1D3A	0,5
B19D3A	0,8
B16D3A	0,4
B17D3A	1,4
B20D3A	2,2
B18D3A	1,3
B21D3A	4,6

G3 VF

B1D3E	0,4
B16D3D	1,8
B17D3D	1,0
B20D3D	2,2
B18D3D	5,3

GRUPO 3

N	7	5
Mean	1,6	2,2
Std. Deviation	1,4	1,9
Initial visit		
Final visit		

GRUPO 1

N	4	5	4	5
Pre-tto. C	3,1	4,0	1,4	1,4
Mean	3,7	2,8	1,0	0,6
Std. Deviation				
GRUPO 2				
N	6,0	2,0	2,0	5,0
Pre-tto. C	2,8	1,3	1,8	1,8
Mean	2,8	0,2	1,3	1,4
Std. Deviation				

ISABEL CERDOSA

Eric Varela Rey
 FELISA VARELA SAUZ
 20-7-2022
 20/07/22

Invalid results

Q-PCR TERT

Block Type 96fast
 Chemistry SYBR_GREEN
 Experiment 2022-05-25 17:15:59 PM CEST
 Instrument sds7500fast
 Passive Rε ROX

Well	Sample Na	Target	Nan Reporter	Quencher	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	Ct Mean	Ct SD	ΔCt	ΔCt Mean
A1	Sample 1	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir	39,4458			
A2	Sample 1	H-TERT	SYBR	None				39,4458	39,4458			
A3	Sample 2	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A4	Sample 2	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A5	Sample 3	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A6	Sample 3	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A7	Sample 4	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A8	Sample 4	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A9	Sample 5	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A10	Sample 5	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A11	Sample 6	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
A12	Sample 6	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B1	Sample 7	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B2	Sample 7	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B3	Sample 8	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B4	Sample 8	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B5	Sample 9	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B6	Sample 9	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B7	Sample 10	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B8	Sample 10	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B9	Sample 11	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B10	Sample 11	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B11	Sample 12	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
B12	Sample 12	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
C1	Sample 13	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
C2	Sample 13	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
C3	Sample 14	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
C4	Sample 14	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir				
C5	Sample 15	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir	36,72409			36,72409
C6	Sample 15	H-TERT	SYBR	None				Undeterminir	36,72409			36,72409

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

LJABEL CORACUA

 20/07/22

C7	Sample 16 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
C8	Sample 16 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
C9	Sample 17 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
C10	Sample 17 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
C11	Sample 18 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
C12	Sample 18 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D1	Sample 19 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D2	Sample 19 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D3	Sample 20 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D4	Sample 20 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D5	Sample 21 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D6	Sample 21 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D7	Sample 22 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D8	Sample 22 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D9	Sample 23 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D10	Sample 23 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D11	Sample 24 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
D12	Sample 24 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E1	Sample 25 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E2	Sample 25 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E3	Sample 26 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E4	Sample 26 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E5	Sample 27 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E6	Sample 27 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E7	Sample 28 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E8	Sample 28 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E9	Sample 29 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E10	Sample 29 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E11	Sample 30 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
E12	Sample 30 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F1	Sample 31 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F2	Sample 31 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F3	Sample 32 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F4	Sample 32 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F5	Sample 33 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F6	Sample 33 H-TERT	SYBR	None	Undetermin
F7	Sample 34 H-TERT	SYBR	None	Undetermin

F8	Sample 34 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
F9	Sample 35 H-TERT	SYBR	None	34,73396	34,73396
F10	Sample 35 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	34,73396
F11	Sample 36 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	38,85907
F12	Sample 36 H-TERT	SYBR	None	38,85907	38,85907
G1	Sample 37 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G2	Sample 37 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G3	Sample 38 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G4	Sample 38 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G5	Sample 39 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G6	Sample 39 H-TERT	SYBR	None	39,46968	39,46968
G7	Sample 40 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	39,46968
G8	Sample 40 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G9	Sample 41 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
G10	Sample 41 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	34,63863
G11	Sample 42 H-TERT	SYBR	None	34,63863	34,63863
G12	Sample 42 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H1	Sample 43 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H2	Sample 43 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H3	Sample 44 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H4	Sample 44 H-TERT	SYBR	None	35,65117	35,65117
H5	Sample 45 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	35,65117
H6	Sample 45 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H7	Sample 46 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H8	Sample 46 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H9	Sample 47 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H10	Sample 47 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H11	Sample 48 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	
H12	Sample 48 H-TERT	SYBR	None	Undetermin	

Analysis Tj Singleplex
 Endogenol H-TERT
 RQ Min/Me 95.0
 Reference Sample 1

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

ISABEL
CORDOBA
Isabel
 20/07/22

ΔCt SE	HK Control	HK Control $\Delta \Delta Ct$	Automatic (Ct Thresho	Automatic	Baseline S	Baseline E	Efficiency	Tm1	Tm2	Tm3
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	77,41006		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	61,84906		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	75,83648		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	78,28428		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,37358		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	61,84906		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	61,84906		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,19874		
			FALSO	FALSO	3	28	1	78,45912		
			FALSO	FALSO	3	28	1	62,0239		

FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	77,41006
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,0239
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	78,28428
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,0239
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,0239
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	76,36101
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	77,23522
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,37358
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	61,84906
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	81,95598
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,0239
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,19874
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,0239
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	62,37358
FALSO	0,105781	FALSO	3	28	1	61,67421

Comments NOAMP

Y N Y Y Y Y Y Y Y Y Y N Y N Y Y N Y N Y Y Y Y Y Y Y N Y

Elisa Varela Saiz
ELISA VARELA SAIZ
20-7-2022

ISABEL CORDOVA
~~ISABEL~~
20/07/22

N N Y Y N Y Y Y Y N Y Y Y Y N Y Y Y Y N Y Y Y Y Y Y Y N Z

Elisa Varela Sanz
ELISA VARELA SANZ
20-7-2022

LISABEL CORDOVA

~~*Lisabel Cordova*~~
20/07/22

Block Type 96fast

Chemistry SYBR_GREEN

Experiment 2022-07-04 11:28:56 AM CEST

Instrument sds7500fast

Passive Rε ROX

Q-PCR TERT

Invalid results

Well	Sample Na	Target	Nan Reporter	Quencher	Ct	CT Mean	CT SD	Quantity	M	Quantity	S	Automatic	Ct Thresho
A1													
A2													
A3													
A4													
A5													
A6													
A7													
A8													
A9													
A10													
A11													
A12													
B1													
B2													
B3													
B4													
B5													
B6													
B7													
B8													
B9													
B10													
B11													
B12													
C1													
C2													
C3													
C4													
C5													

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

LABEL COPDOUT
[Signature]
 20/07/22

C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
D10
D11
D12
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9
E10
E11
E12
F1
F2
F3
F4
F5
F6

Block Type 96fast

Chemistry SYBR_GREEN

Experiment 2022-07-04 17:48:02 PM CEST

Instrument sds7500fast

Passive Re ROX

Q-PCR TERT

Invalid results

Well	Sample Na	Target	Na	Reporter	Quencher	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity M	Quantity S	Automatic	Ct Thresho
A1	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	34,82672	34,67987	0,207675	100			FALSO	0,304814
A2	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None							FALSO	0,304814
A3	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	34,53302	34,67987	0,207675	100			FALSO	0,304814
A4	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None							FALSO	0,304814
A5	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	34,95758	34,61493	0,484585	33,33333			FALSO	0,304814
A6	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	34,27227	34,61493	0,484585	33,33333			FALSO	0,304814
A7	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None							FALSO	0,304814
A8	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	Undetermin	35,05759		11,11111			FALSO	0,304814
A9	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	35,05759	35,05759		11,11111			FALSO	0,304814
A10	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	35,40583	34,9662	0,621734	3,703704			FALSO	0,304814
A11	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	34,52657	34,9662	0,621734	3,703704			FALSO	0,304814
A12	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	Undetermin	34,9662	0,621734	3,703704			FALSO	0,304814
B1	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	Undetermin						FALSO	0,304814
B2	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None	Undetermin						FALSO	0,304814
B3	Sample 1	HTERT3	SYBR	None	None							FALSO	0,304814
B4													
B5													
B6													
B7													
B8													
B9													
B10													
B11													
B12													
C1													
C2													
C3													
C4													
C5													

Elixa Varela Sanz
 ELIXA VARELA SANZ
 20-7-2022

Isabel Corrao
 Isabel Corrao
 20/07/22

C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
D10
D11
D12
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9
E10
E11
E12
F1
F2
F3
F4
F5
F6

F7 F8 F9 F10 F11 F12 G1 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11 G12 H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12


ELISA VARELA SANZ
20-7-2022

LABEL CORDON


20/07/22

Table 1.

	CONTROL NOR GROUP	OVERALL DOR GROUP	PLACEBO-TREATED GROUP	DANAZOL-TREATED GROUP
Number of subjects, n	7	12	5	7
Age (years)				
Mean ± SD	39.5±3.1	40.6±2.8	39.8±2.7	41.2±2.8
Median (Q1-Q3)	39.0 (36.0-43.0)	41.5 (38.2-43.0)	39.0 (37.5-42.5)	42.0 (38.0-43.0)
BMI (kg/m²)				
Mean ± SD	22.1±1.6	23.4±3.1	21.3±1.1	24.9±3.2
Median (Q1-Q3)	22.48 (20.7-23.8)	22.6 (20.8-26.0)	20.6 (20.5-22.6)	23.7 (22.0-28.8) p=[0.02]
Primary infertility, n (%)	4 (57.1)	9 (75.0)	4 (80)	5 (71.4)
Secondary infertility, n (%)	3 (42.9)	3 (25.0)	1 (20)	2 (28.6)
Duration of infertility (years)				
Mean ± SD	1.0±0.7	1.2±0.9	1.8±1.0	0.9±0.6
Median (Q1-Q3)	1.0 (0.5-2.0)	1.2 (0.5-2.0)	2.0 (1.0-2.5)	1.0 (0.5-1.5)
AMH level (ng/ml)				
Mean ± SD	3.1±0.8	0.4±0.5	0.5±0.6	0.3±0.4
Median (Q1-Q3)	2.8 (2.5-3.5)	0.1 (0.05-0.7) [p=3x10 ⁻⁴]	0.3 (0.1-1.1)	0.09 (0.05-0.8)
AFC pre-treatment				
Mean ± SD	12.7±3.1	3.3±2.5	3.5±1.3	3.2±3.0
Median (Q1-Q3)	13.0 (11.0-16.0)	3.0 (1.0-5.0) [p<0.0001]	3.5 (2.2-4.7)	3.0 (1.0-5.0)
AFC post-treatment				
Mean ± SD	Not treated	3.6±1.9	4.0±0.7	3.2±2.9
Median (Q1-Q3)		4.0 (2.5-4.5)	4.0 (3.5-4.5)	3.0 (0.5-6.2)
Initiated COS cycles, n	7	9	5	4
Cancelled cycles, n (%)	1 (14.3)	6 (66.6)	2 (40)	4 (100)
Estrogen levels at trigger day				
Mean ± SD	3005.0±3398.3	994.3±432.0	994.3±432.0	x
Median (Q1-Q3)	2388.0 (1112.0-2588.)	1058 (534-)	1058 (534-)	
Progesterone levels at trigger day				
Mean ± SD	1.3±1.6	0.8±0.8	0.8±0.8	x
Median (Q1-Q3)	0.7 (0.2-1.5)	0.4 (0.1-)	0.4 (0.1-)	
Follicular detection by ultrasound during COS				
Total follicles				
Mean ± SD	14.1±4.1	3.6±3.5	5±3.8	1.0±1.4
Median (Q1-Q3)	15.0 (6.0-17.0)	3.0 (1.0-5.5) [p=0.0001]	4.0 (2.0-8.5)	0.5 (0.0-2.5)
Follicles >12mm				
Mean ± SD	12.7±5.3	2.7±3.2	3.4±3.6	0.5±1.0
Median (Q1-Q3)	15.0 (6.0-17.0)	2.0 (0.0-5.0) [p=0.001]	2.0 (0.5-7.0)	0.0 (0.0-1.5)

n indicates the number of individuals. Normality was calculated using Shapiro-Wilk test for each group (overall DOR group, placebo-treated group and Danazol-treated group). p-values, calculated using t-tests between each treatment group separately, are indicated below.

Elisa Varela Sanz
ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

ISABEL CORDOJA
Isabel
 20/07/22

Figure 1. Number of follicles and oocytes retrieved after treatment.

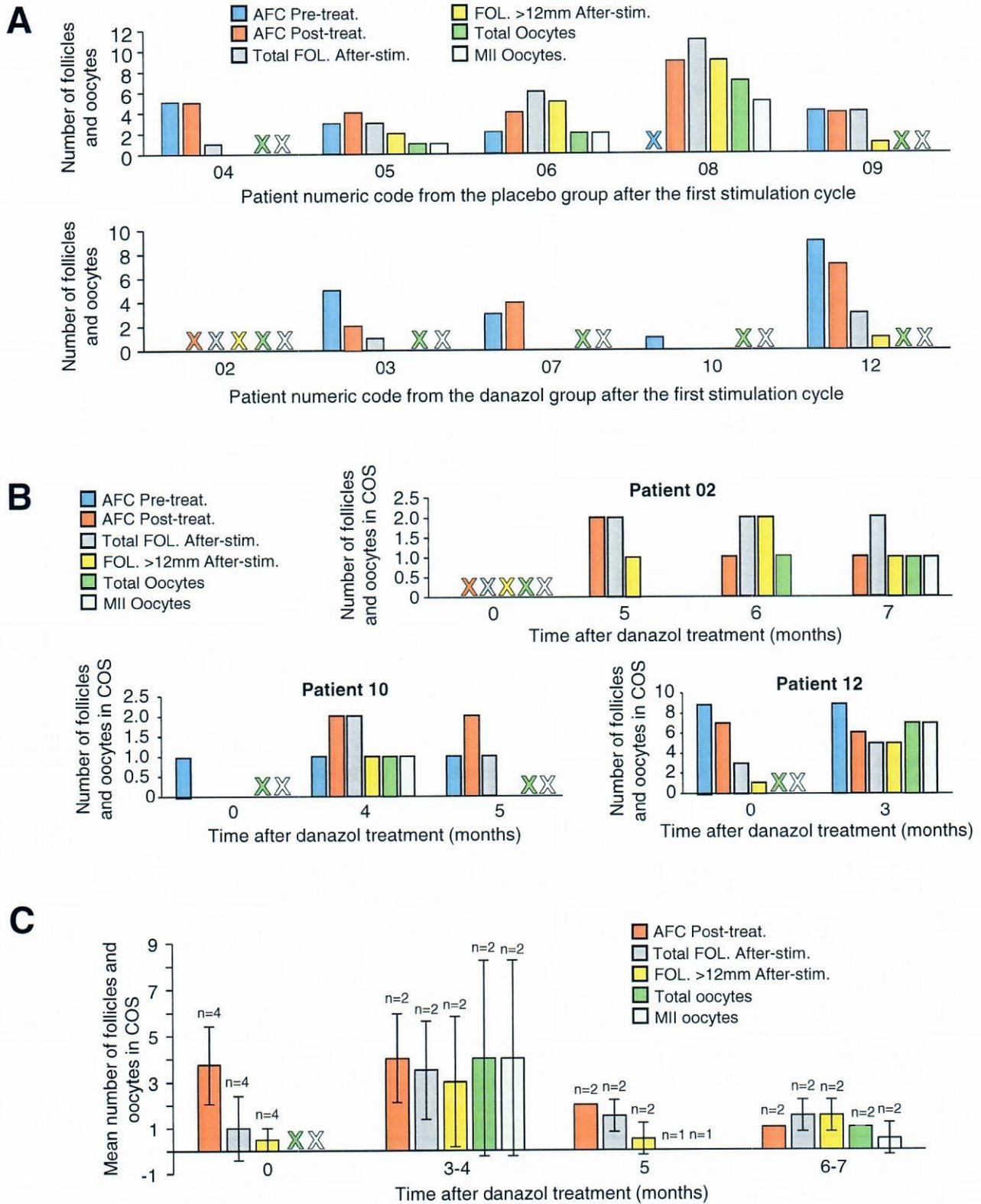


Figure 1. Analysis of follicles and oocytes after placebo or Danazol treatment

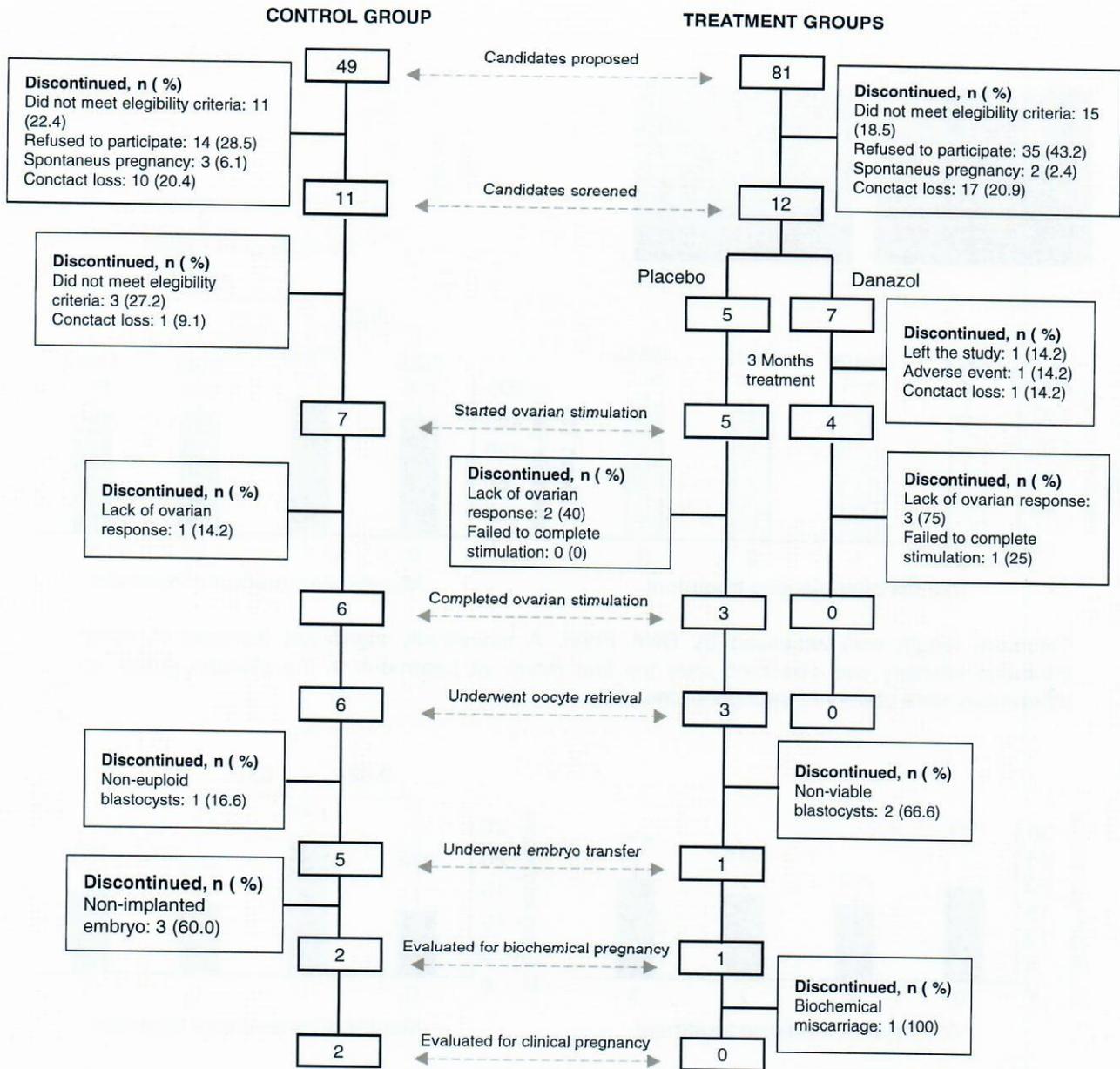
A) Number of follicles observed by ultrasound and oocytes retrieved after the first stimulation cycle, from five patients (indicated with a number) belonging to the placebo group. The bottom graph the results obtained from the Danazol group. Blue bars represent pre-treatment AFC; orange bars, post-treatment AFC; grey bars, total follicles after COS; yellow bars, follicles greater than 12mm; dark green bars, total oocytes retrieved in puncture after COS, and light green bars show MII oocytes. The crosses indicate the absence of data, due to cancellation of the COS or of oocyte retrieval. B) The graphs show the number of follicles detected by ultrasound and oocytes retrieved in three Danazol-treated patients (02, 10 and 12) in several COS cycles at the indicated time points. The colors of the bars are as described in A. C) Mean number of follicles detected by ultrasound and oocytes retrieved after COS in all cycles from Danazol-treated patients. The colors of the bars are as described in A. The error bars show the standard error. No statistically significant differences were found using t-test. p-values < 0.05 were considered statistically significant.

Elise Varela
ELISE VARELA SAIZ
20-7-2022

LABEL CORDOVA
[Signature]
20/07/22

DIAGRAMA DE FLUJO PACIENTES

Figure 2.

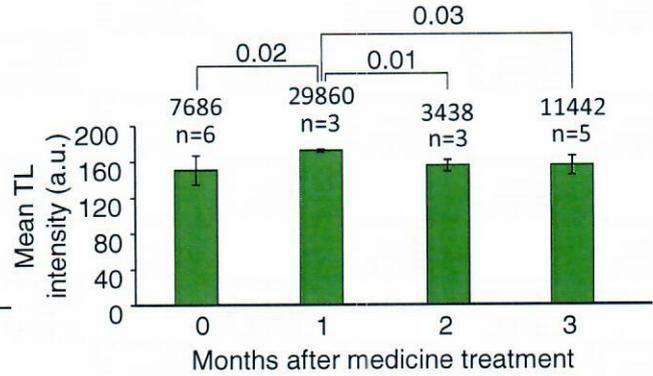
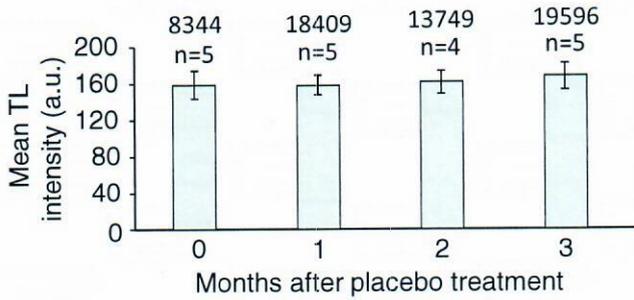
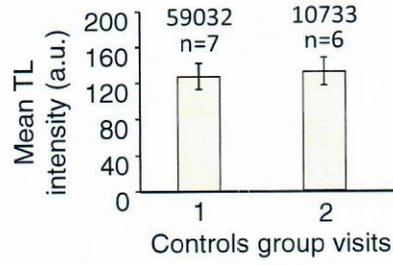
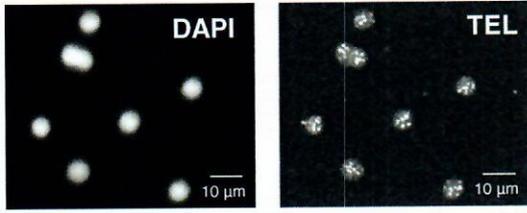


ISABEL GONZALEZ

 20/07/22

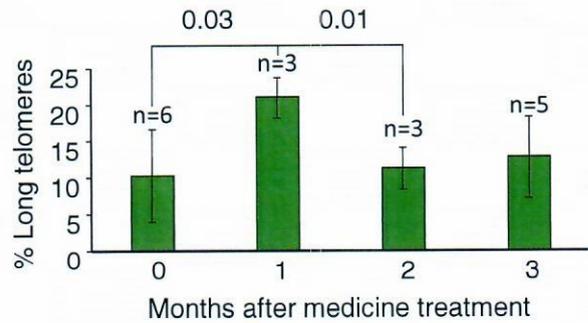
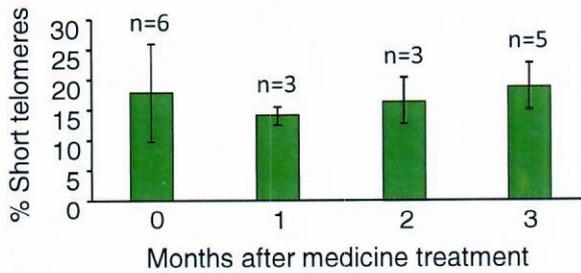
Figure 3. Mean telomere length and the percentage of accumulated short and long telomeres in PBMCs.

A



Telomere length was assessed by DNA FISH. A statistically significant increase in mean telomeric intensity was observed after the first month of treatment. In the placebo group, no differences were observed throughout the visits.

B

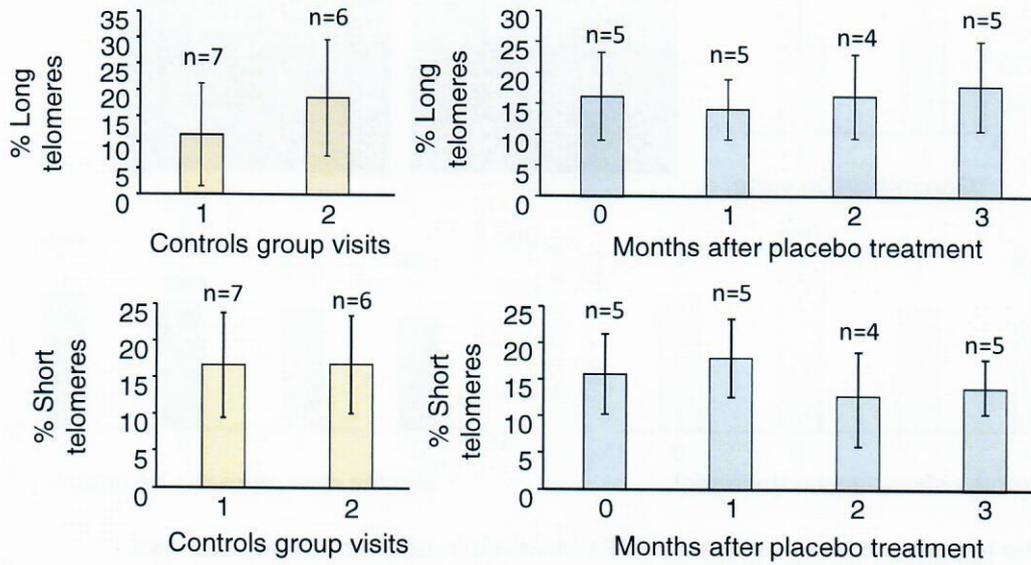


There is also a trend towards a decrease in the percentage of short telomeres and a statistically significant increase in the percentage of long telomeres in blood after treatment with Danazol.

Elena Varela Sanz
 EUSA VARELA SANZ
 20-7-2022

Figure 4. Accumulated percentage of short and long telomeres in PBMCs of control and placebo groups.

A

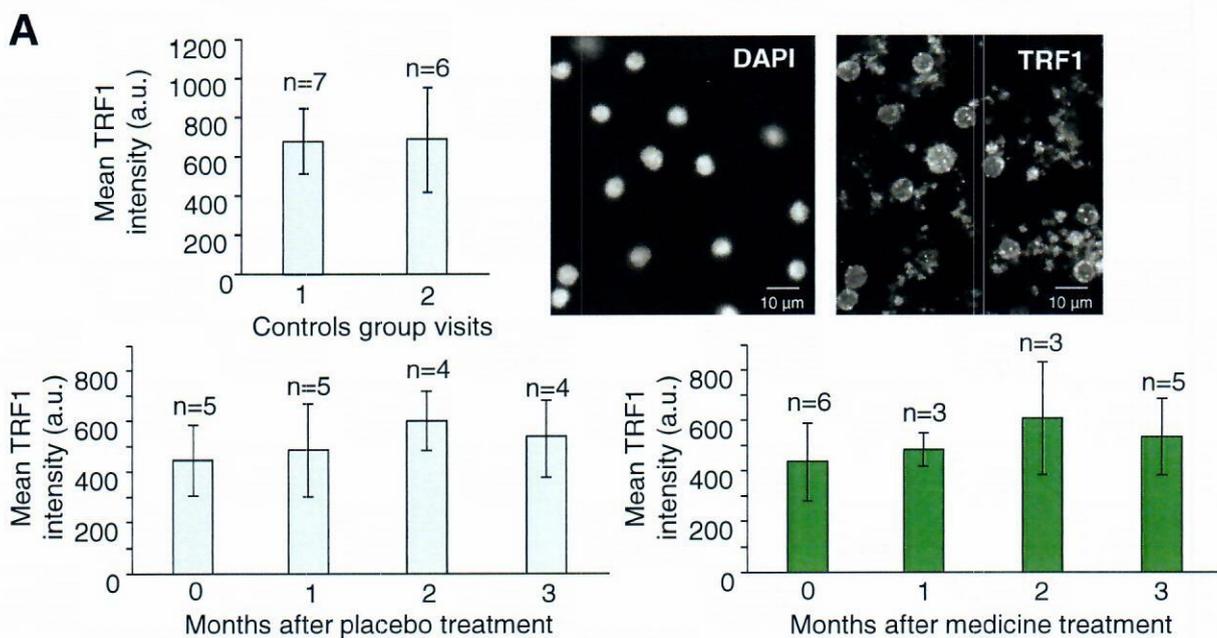


No differences were found in the percentage of short and long telomeres across visits in the control and placebo groups.

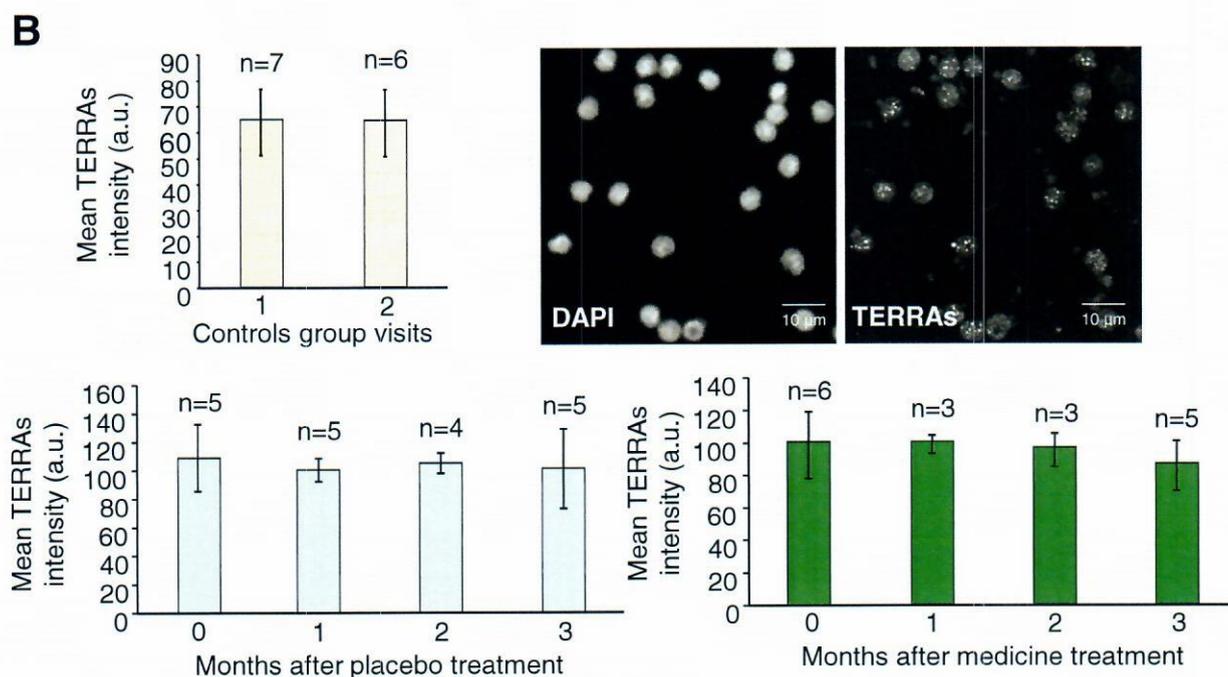
Euse Verde Sosa
ELISA VARELA SANCHEZ
20-7-2022

ISABEL CORREA
[Signature]
20/07/22

Figure 5. Telomere protection and TERRAs (telomeric repeat-containing RNAs) expression in PBMCs.

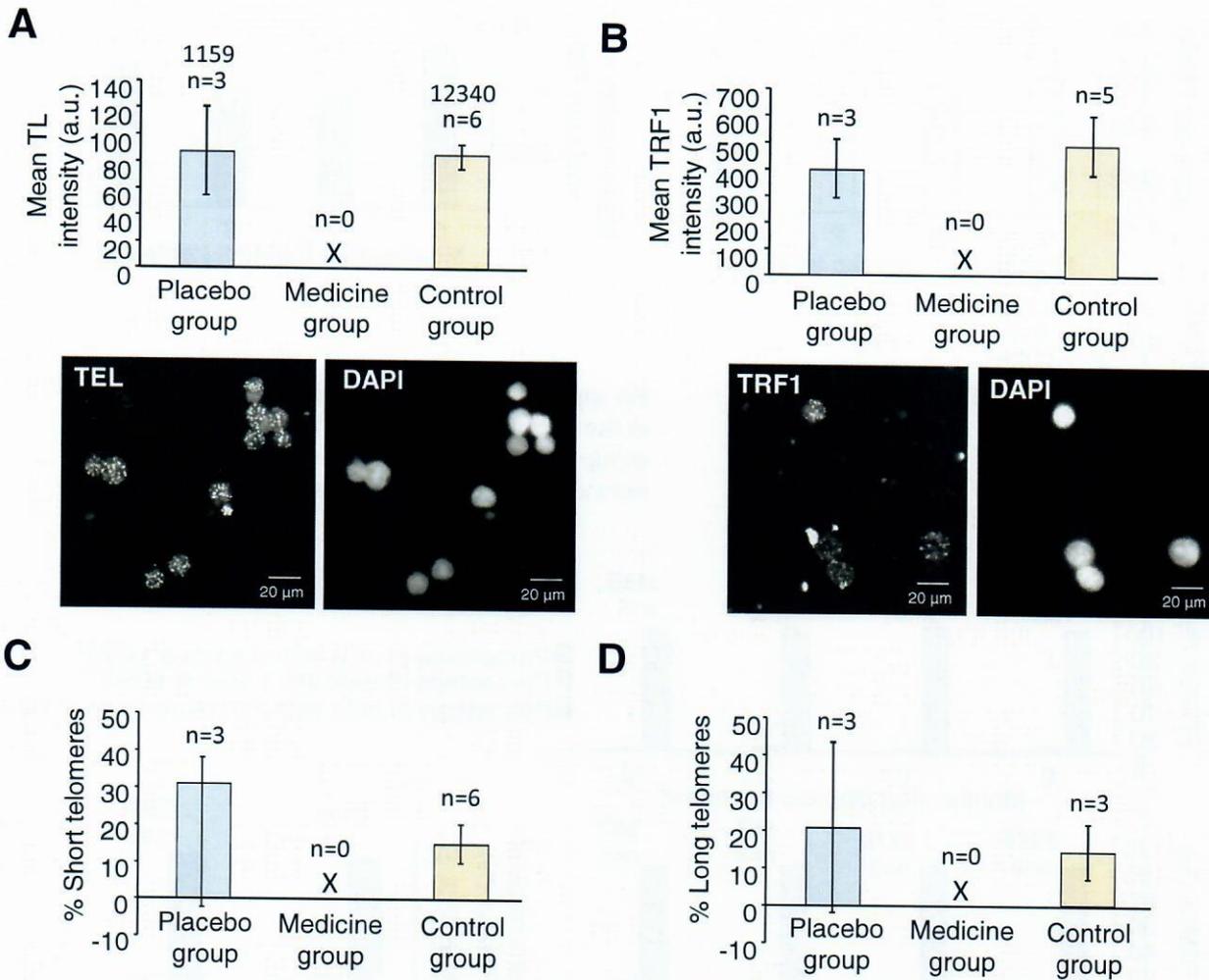


Levels of the telomeric complex shelterin, TRF1, involved in telomeric protection, were assessed by immunofluorescence. No statistically significant differences were found in the levels of TRF1 during visits in either group.



TERRAs levels, involved in the protection and regulation of telomere length, were assessed by RNA FISH. No statistically significant differences were found in the levels of TERRAs expression during visits in either group.

Figure 6. Telomere length, telomere protection and the accumulated percentage of short and long telomeres in GCs



Granulosa cell samples obtained in the study were too limited for conclusions to be drawn.

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

Isabel Corroja
 ISABEL CORROJA
 20/07/22

Figure 7. DNA damage and cell damage analysis in blood. Double immunofluorescence against H2AX and P53.

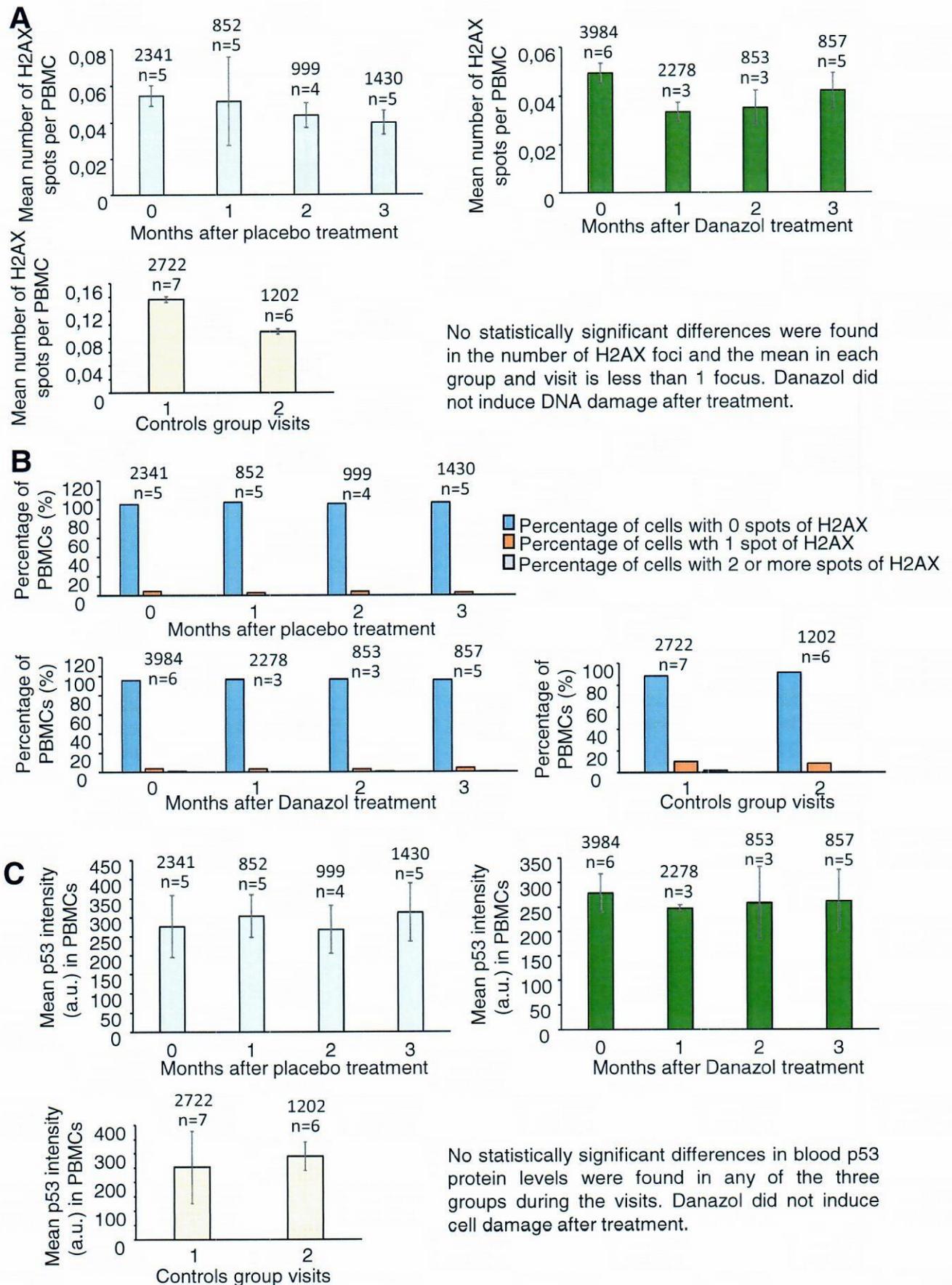
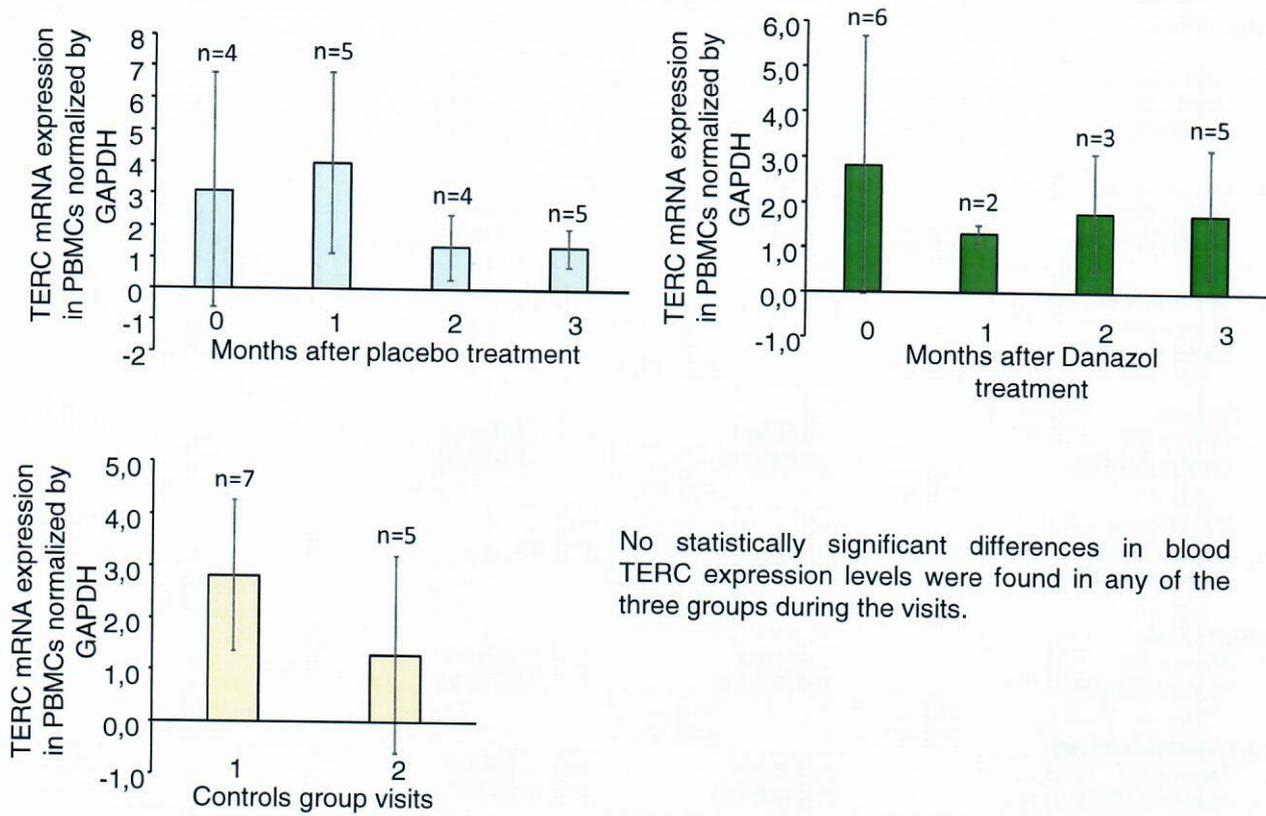


Figure 8. Analysis of TERC (Telomerase RNA component) mRNA expression in blood by RT-qPCR.



No statistically significant differences in blood TERC expression levels were found in any of the three groups during the visits.

Elise Varela Sanz ISABEL CARRERA
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2012
 [Signature] 20/07/12

RESULTADOS FERTILIDAD PRIMER CICLO (FIV)

	CONTROL GROUP	PLACEBO GROUP	MEDICINE GROUP
Oocytes retrieved			
Total Oocytes	12.3±5.6	2.5±3.1	
Mean ± SD			
Median (Q1-Q3)	13.0 (7.7-15.7)	1.5 (0.2-5.7)	X
		<i>p</i> =0.02	
MII oocyte rate			
Mean ± SD	0.9±0.1	0.9±0.1	
Median (Q1-Q3)	1.0 (0.7-)	1.0 (0.7-)	X
MI oocyte rate			
Mean ± SD	0.0	0.0	
Median (Q1-Q3)			X
VG rate			
Mean ± SD	0.09±0.1	0.09±0.1	
Median (Q1-Q3)	0 (0.0-0.1)	0.0 (0.0-)	X
RZ-ATR rate			
Mean ± SD	0.0	0.0	
Median (Q1-Q3)			X
Fertilization rate			
Mean ± SD	0.7±0.2	0.7±0.2	
Median (Q1-Q3)	0.8 (0.7-1.0)	0.8 (0.5-)	X
Morula development rate			
Mean ± SD	0.9±0.1	0.9±0.1	
Median (Q1-Q3)	1.0 (0.8-1.0)	1.0 (0.7-)	X
Blastocyst development rate			
Mean ± SD	0.4±0.3	0.2±0.4	
Median (Q1-Q3)	0.3 (0.1-0.6)	0.0 (0.0-)	X
Inner cell mass quality, n (%)			
			X
A	5 (20.8)	0 (0.0)	
B	18 (75.0)	3 (100)	
C	1 (4.2)	0 (0.0)	
D	0 (0.0)	0 (0.0)	
Trophoectoderm quality, n (%)			
			X
A	3 (12.5)	0 (0)	
B	13 (54.1)	2 (66.7)	
C	8 (33.4)	1 (33.3)	
D	0 (0.0)	0 (.00)	
Euploid blastocyst rate			
Mean ± SD	0.6±0.3	0.3±0.5	
Median (Q1-Q3)	0.5 (0.3-1.0)	0.0 (0.0-)	X

RESULTADOS FERTILIDAD PRIMER CICLO (Tras transfer)

	CONTROL GROUP	PLACEBO GROUP	MEDICINE GROUP
Blastocysts transfered, n	5	2	X
Implantation rate			
Mean ± SD	0.5±0.4	0.5±0.0	X
Median (Q1-Q3)	0.5 (0.0-1.0)	0.5±0.0	X
Biochemical pregnancy rate			
Mean ± SD	0.5±0.5	0.5±0.0	X
Median (Q1-Q3)	0.5 (0.0-1.0)		X
Clinical pregnancy rate			
Mean ± SD	0.8±0.2	0.0	X
Median (Q1-Q3)	1.0 (0.5-)		X
Ongoing pregnancy rate			
Mean ± SD	0.5±0.0	0.0	X
Median (Q1-Q3)	0.5 (0.5-0.5)		X
Biochemical miscarriage rate			
Mean ± SD	0.0	0.5±0.0	X
Median (Q1-Q3)			X
Clinical miscarriage rate			
Mean ± SD	0.0	0.0	X
Median (Q1-Q3)			X

Elisa Varela Sanz
 ELISA VARELA SANZ
 20-7-2022

UABEL CORDOVA

 20/07/22

Grupo 3 (control)

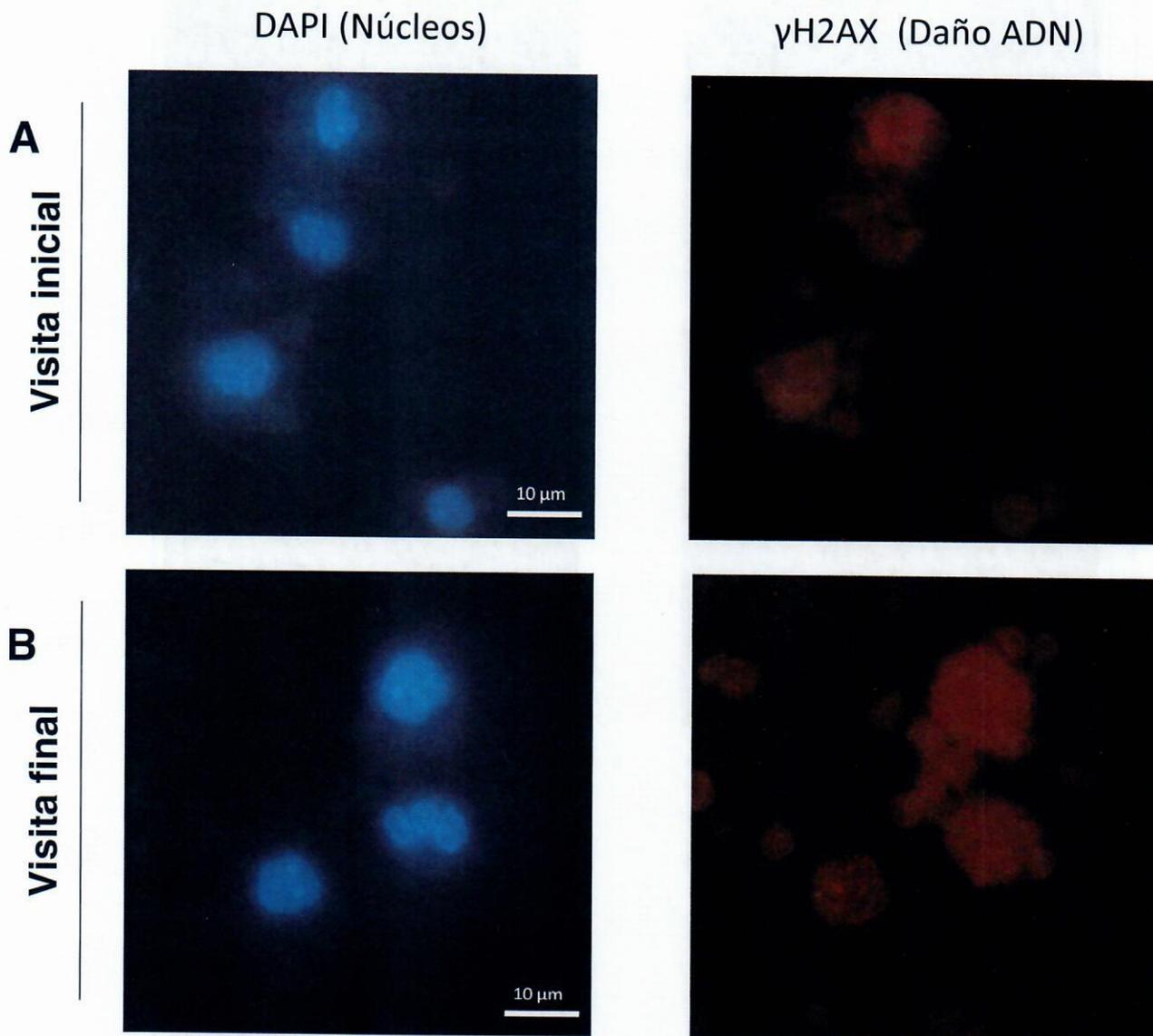


Figura 1: Análisis del daño en el ADN en células de la sangre (PBMCs) antes y después del estudio en el grupo 3, correspondiente a las controles. Para observar el daño se realizó una inmunofluorescencia contra la histona Gamma-H2AX. Las imágenes de la izquierda muestran la tinción nuclear con DAPI mientras que las imágenes de la derecha muestran la tinción de Gamma-H2AX mediante el fluoróforo Alexa Fluor 594. **A)** Se muestran las imágenes de la tinción con DAPI y γ H2AX correspondientes a la visita inicial (Visita 2). **B)** Se muestran las imágenes de la tinción con DAPI y γ H2AX correspondientes a la visita final (Visita 8). No se observa daño significativo en ninguna de las visitas. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia a 60x.

Figura 1.

Elice Varela Sanz
ELISE VARELA SANZ
20-7-2022

VARELA CORONA
[Signature]
20/07/22

Grupo 1

Figura 2.

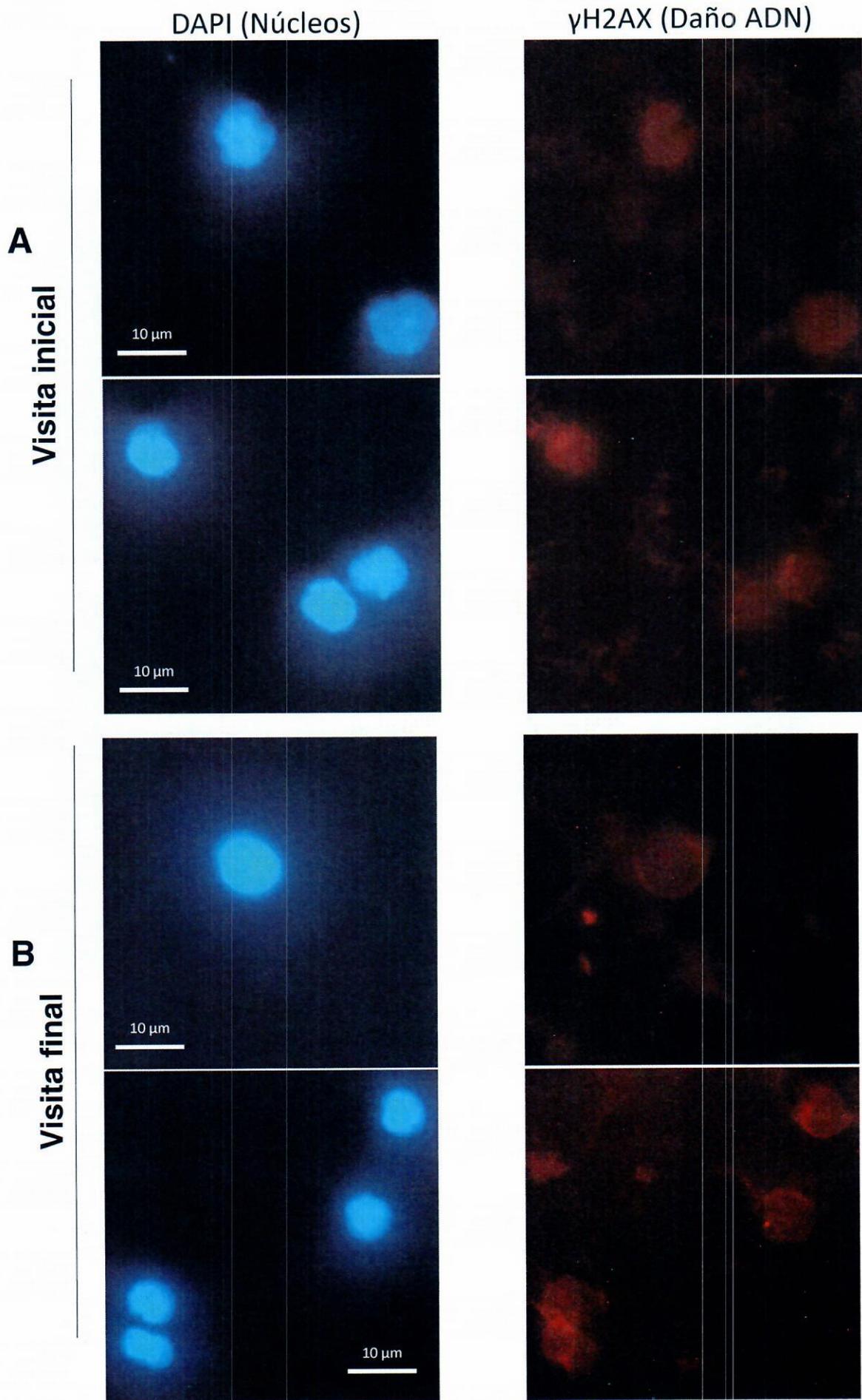
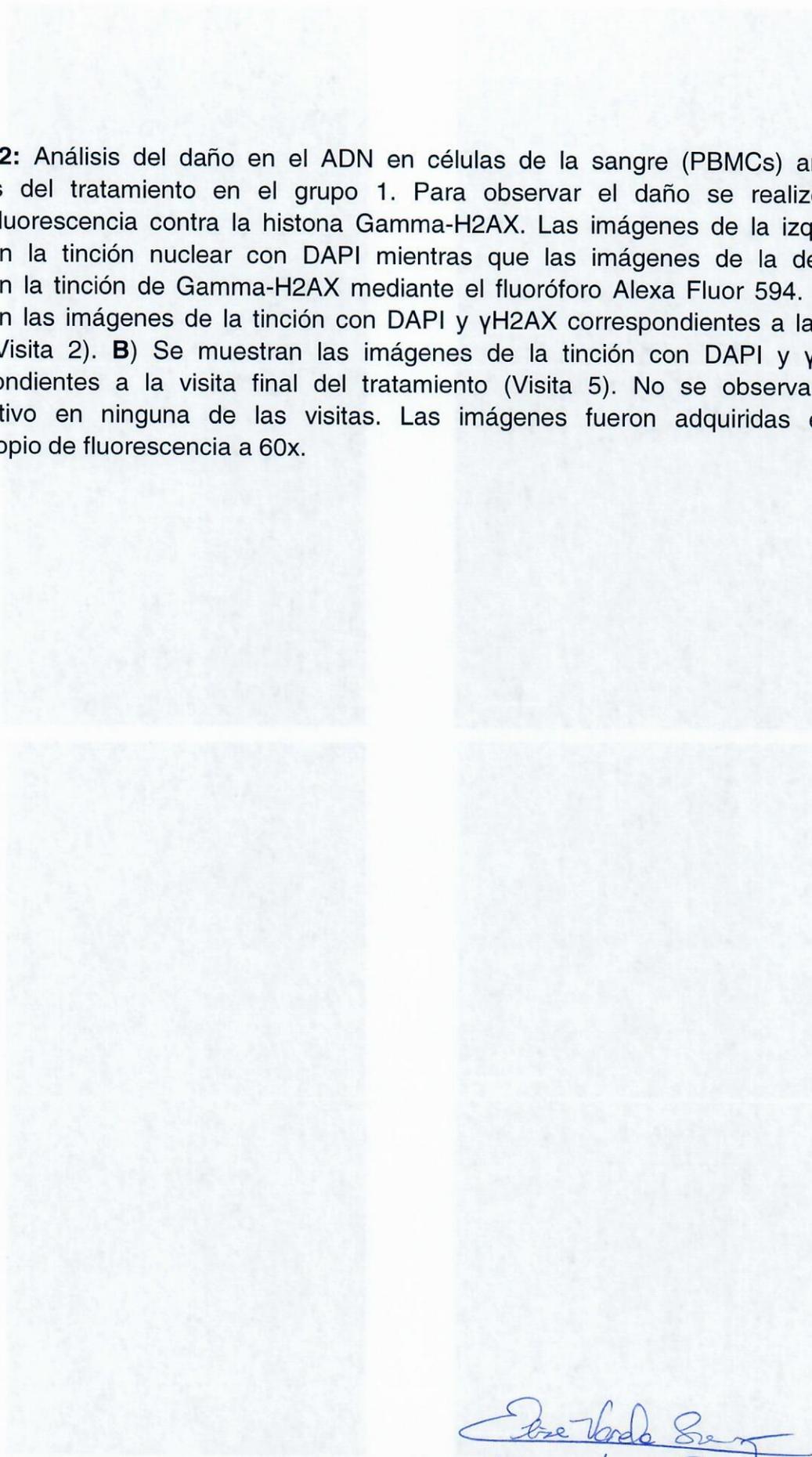


Figura 2: Análisis del daño en el ADN en células de la sangre (PBMCs) antes y después del tratamiento en el grupo 1. Para observar el daño se realizó una inmunofluorescencia contra la histona Gamma-H2AX. Las imágenes de la izquierda muestran la tinción nuclear con DAPI mientras que las imágenes de la derecha muestran la tinción de Gamma-H2AX mediante el fluoróforo Alexa Fluor 594. **A)** Se muestran las imágenes de la tinción con DAPI y γ H2AX correspondientes a la visita inicial (Visita 2). **B)** Se muestran las imágenes de la tinción con DAPI y γ H2AX correspondientes a la visita final del tratamiento (Visita 5). No se observa daño significativo en ninguna de las visitas. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia a 60x.


Elise Varela Sanz
ELISE VARELA SANZ
20-7-2022

LABEL CORADUA
~~tsb~~
20/07/22

Grupo 2

Figura 3.

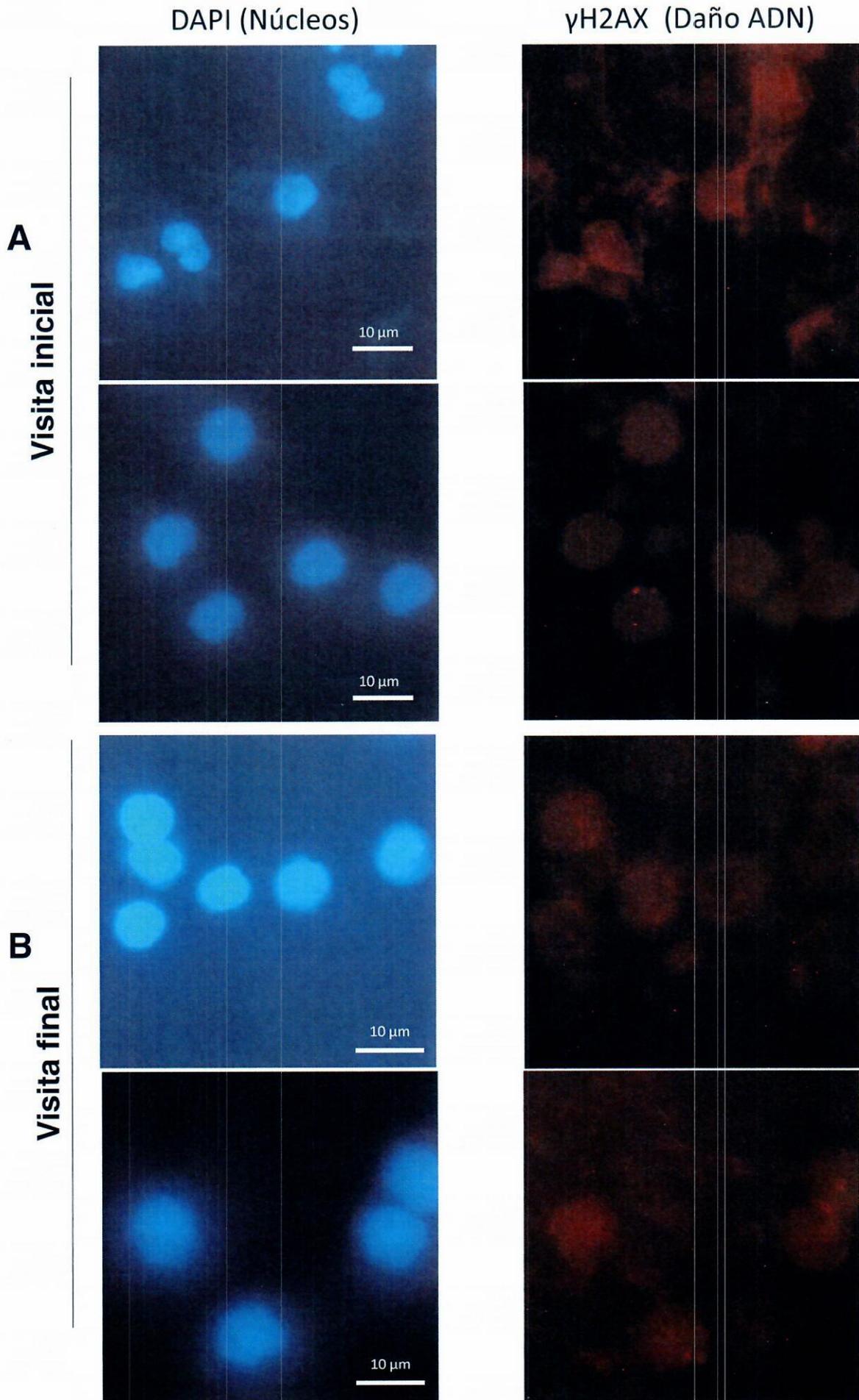


Figura 3: Análisis del daño en el ADN en células de la sangre (PBMCs) antes y después del tratamiento en el grupo 2. Para observar el daño se realizó una inmunofluorescencia contra la histona Gamma-H2AX. Las imágenes de la izquierda muestran la tinción nuclear con DAPI mientras que las imágenes de la derecha muestran la tinción de Gamma-H2AX mediante el fluoróforo Alexa Fluor 594. **A)** Se muestran las imágenes de la tinción con DAPI y γ H2AX correspondientes a la visita inicial (Visita 2). **B)** Se muestran las imágenes de la tinción con DAPI y γ H2AX correspondientes a la visita final del tratamiento (Visita 5). No se observa daño significativo en ninguna de las visitas. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia a 60x.


ELISA VARELA SANZ
20-7-2022

ISABEL CORDOVA

20/07/22

