

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN**

**CALIDAD OVOCITARIA EN SEGUNDO
CICLO VS PRIMER CICLO. ¿INFLUYE EL
INTERVALO DE TIEMPO ENTRE LOS
CICLOS?**

TRABAJO FIN DE MÁSTER POR:

Celia Delgado Moro

BAJO LA TUTELA DE:

Dr. D. Plácido Llana Coto

Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mostrar mis agradecimientos a todo el personal de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias por estar siempre dispuestos a ayudarme.

En especial al Dr. Plácido Llana, ginecólogo de la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA, por dirigir mi trabajo y ayudarme en las dudas que me iban surgiendo.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	6
1.1	CALIDAD OVOCITARIA	7
1.1.1	<i>Alteraciones morfológicas de los ovocitos.....</i>	8
1.1.1.1	Alteraciones extracitoplasmáticas.....	8
1.1.1.2	Alteraciones citoplasmáticas.....	11
1.1.2	<i>Factores que afectan a la calidad ovocitaria y a la respuesta ovárica en general</i>	14
1.1.2.1	Efecto de la estimulación ovárica	14
1.1.2.2	Efecto de los ciclos repetidos y la edad	16
1.1.2.3	Efecto del intervalo de tiempo entre los ciclos	17
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3	MATERIAL Y MÉTODOS	19
3.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	19
3.2	TIPO DE ESTUDIO.....	19
3.3	PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA	19
3.4	PUNCIÓN FOLICULAR	21
3.5	PROTOCOLO DE LABORATORIO.....	21
3.6	TRANSFERENCIA EMBRIONARIA	22

3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
4	RESULTADOS	24
4.1	NÚMERO DE OVOCITOS RECUPERADOS	26
4.2	NÚMERO DE OVOCITOS MADUROS	29
4.3	CALIDAD OVOCITARIA	31
4.4	NÚMERO DE OVOCITOS FERTILIZADOS	33
4.5	NÚMERO DE EMBRIONES	36
4.6	CALIDAD EMBRIONARIA.....	38
4.7	EMBARAZOS	41
	4.7.1 Tasa de embarazo.....	41
	4.7.2 Tasa de gestación evolutiva	41
5	DISCUSION	43
6	CONCLUSIÓN	47
7	BIBLIOGRAFÍA.....	48

1 INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como la incapacidad de conseguir o completar un embarazo en parejas que llevan más de 12 meses manteniendo relaciones coitales frecuentes sin el uso de métodos anticonceptivos. La infertilidad afecta aproximadamente a un 10-15% de las parejas en edad fértil y esta cifra va en aumento.

Una manera de abordar los problemas de infertilidad es el uso de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Las principales técnicas utilizadas en los laboratorios de Reproducción Asistida son la Inseminación Artificial (IA), la Fecundación *in vitro* (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide (ICSI).

Una de las tareas principales del embriólogo es escoger los gametos y embriones que puedan dar el mejor resultado posible. A principios del siglo XX, un embriólogo llamado E. B. Wilson sugirió que “*la embriogénesis comienza en la ovogénesis*” y que el desarrollo del embrión, por tanto, depende en gran medida del proceso de generación del ovocito. Aunque el espermatozoide contribuye de manera esencial en la generación del nuevo individuo, el desarrollo del embrión depende principalmente del ovocito (Coticchio et al. 2004).

En muchos casos no se consigue la fertilización del ovocito porque el espermatozoide no es capaz de penetrar en este, lo cual podría solucionarse mediante ICSI. Sin embargo, hay casos en los que se consigue la microinyección exitosa del espermatozoide en el citoplasma del ovocito pero, aún así, no se consigue la fertilización. Esto puede ser debido a una deficiencia en el factor activador del ovocito asociado al espermatozoide, pero también podría deberse a algún problema en el ovocito (De Sutter et al. 1996). En un estudio se observó que el 13% de los ovocitos no fertilizados con el uso de Técnicas de Reproducción Asistida, tenían alguna anomalía morfológica, probablemente incompatible con la fertilización (Van Blerkom 1990).

1.1 Calidad ovocitaria

La calidad de los ovocitos depende de criterios morfológicos, celulares y moleculares (Lasiene et al. 2009), sin embargo este trabajo se centra en las características morfológicas. Es importante distinguir los casos en los que los ovocitos presentan una sola alteración morfológica, de los casos en que presentan varias alteraciones morfológicas (Sá et al. 2007).

La maduración nuclear no es suficiente para determinar la competencia del ovocito. La maduración nuclear y citoplasmática deben estar completadas de manera coordinada para asegurar las condiciones óptimas para la fertilización. La perturbación o asincronía de esos dos procesos puede resultar en diferentes anomalías morfológicas en el ovocito (Hassan-Ali et al. 1998; Eichenlaub-Ritter et al. 1995; Loutradis et al. 1999; Kahraman et al. 2000).

Para llevar a cabo la ICSI, se realiza la decumulación previa de los ovocitos, que consiste en la eliminación de las células del cúmulus que los rodean. Este proceso facilita la observación de la morfología citoplasmática del ovocito y su maduración nuclear. En cambio en la FIV convencional no se decumulan los ovocitos y se consigue poca información acerca de la morfología ovocitaria.

Se considera que un ovocito tiene buena calidad cuando está maduro (en MII) y tiene una forma esférica perfecta, un citoplasma translúcido sin inclusiones (Coticchio et al. 2004), un espacio perivitelino pequeño y una zona pelúcida clara e incolora (De Sutter et al. 1996). En la ilustración 1 se puede observar un ovocito maduro de buena calidad (Ochando, 2013).

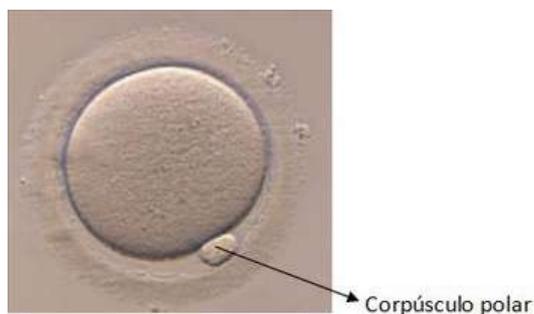


Ilustración 1. Ovocito maduro (MII)

1.1.1 Alteraciones morfológicas de los ovocitos

Las alteraciones morfológicas del ovocito pueden ser extracitoplasmáticas o citoplasmáticas. Las alteraciones extracitoplasmáticas engloban irregularidades de la zona pelúcida, del espacio perivitelino, de la forma del ovocito y del primer corpúsculo polar (Balaban and Urman, 2006). Las alteraciones citoplasmáticas engloban la granulosidad, acúmulos de Retículo Endoplasmático Liso (REL), presencia de inclusiones citoplasmáticas y presencia de vacuolas (Serhal et al. 1997).

1.1.1.1 Alteraciones extracitoplasmáticas

La **zona pelúcida** puede ser regular o irregular; delgada, gruesa o mixta; redonda u oval; clara, oscura; o septada. Las alteraciones en la zona pelúcida están relacionadas con anomalías en la estructura y la función del REL. Cuando el REL es anormal puede secretar pocos o muchos precursores de la zona pelúcida al espacio perivitelino, lo que da lugar a una zona pelúcida más delgada o más gruesa de lo normal, respectivamente. También puede ocurrir que el REL secrete precursores anormales de la zona pelúcida, lo que puede dar lugar a una zona pelúcida más densa de lo normal (Sá et al. 2007).

La zona pelúcida influye en la penetración del espermatozoide (Lasiene et al. 2009). La rotura de la zona pelúcida y la zona pelúcida vacía son consideradas alteraciones morfológicas drásticas, y los ovocitos que las presentan no son aptos para la ICSI (Loutradis et al. 1999).

En la ilustración 2 se pueden observar algunas anomalías de la zona pelúcida (Cuaderno ASEBIR).

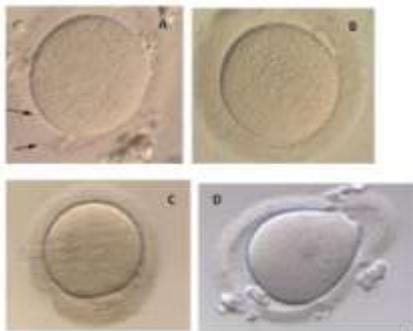


Ilustración 2. Zona pelúcida septada (A), gruesa (B), oscura (C) y zona pelúcida con forma no circular

El **espacio perivitelino** puede ser mayor o menor de lo normal, y puede contener gránulos. En la ilustración 3 se puede observar un espacio perivitelino aumentado y con gránulos (Cuaderno ASEBIR).

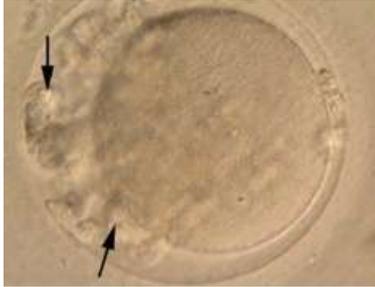


Ilustración 3. Espacio perivitelino aumentado y con presencia de gránulos

La anchura del espacio perivitelino está directamente relacionada con el tamaño del primer corpúsculo polar, con la presencia de gránulos, con el tamaño del ovocito y con la anchura de la zona pelúcida.

Los gránulos presentes en el espacio perivitelino podrían proceder de la fragmentación del primer corpúsculo polar, de una secreción anormal del REL, de restos de zona pelúcida, de una fragmentación del citoplasma o de restos de células foliculares (Sá et al. 2007), también podría ser una señal de sobredosis de gonadotropinas, ya que en un estudio se encontró que el porcentaje de ovocitos con gránulos en el espacio perivitelino era significativamente mayor cuando se aplicaban altas dosis de HMG (gonadotropina menopáusica humana) para la estimulación ovárica (Hassan-Ali et al. 1998). La granulosidad del espacio perivitelino también podría ser un fenómeno fisiológico relacionado con la maduración del ovocito, ya que en un estudio se mostró que la incidencia de gránulos en el espacio perivitelino varía con la maduración de los ovocitos, encontrando gránulos en el 34% de los ovocitos en MII, en el 4% de los ovocitos en MI y en ninguna vesícula germinal. En ese mismo estudio se mostró que la granulosidad no está relacionada con la edad, la concentración de progesterona el día de la administración de la HCG (Gonadotropina Coriónica Humana), el tiempo de incubación de los ovocitos y la respuesta a la estimulación medida como el nivel de estradiol y el número de ovocitos recuperados (Hassan-Ali et al. 1998).

Algunos autores con modelos animales dicen que el tamaño del espacio perivitelino puede afectar a la aproximación de espermatozoide a la membrana del ovocito. Esto no supone un problema para los ovocitos que van a ser sometidos a ICSI, sin embargo, sí podría suponer un fallo en la fertilización en FIV convencional (Herrero et al. 2011).

El **primer corpúsculo polar** puede tener una superficie lisa o rugosa; tener forma redonda u ovoide; tener un tamaño grande o pequeño; y puede estar intacto o fragmentado. En la ilustración 4 se pueden observar distintas morfologías del primer corpúsculo polar (Cuaderno ASEBIR).

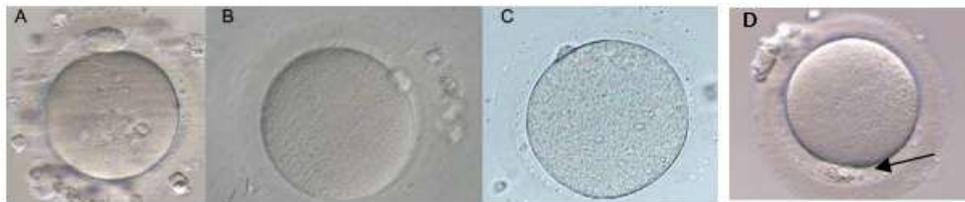


Ilustración 4. Corpúsculo polar grande (A), normal (B), pequeño (C) y fragmentado (D)

Se cree que el tamaño del corpúsculo polar está relacionado con aneuploidías (Sá et al. 2007). También se pensó que la forma irregular o la fragmentación del primer corpúsculo polar podrían estar relacionadas con aneuploidías, pero en un estudio (Verlinsky et al. 2003) se demostró que no había ninguna relación.

Se ha sugerido que el primer corpúsculo degenerado o grande podría indicar alguna perturbación en la maduración del ovocito (De Santis et al. 2005; Eichenlaub-Ritter et al. 1995).

La morfología del primer corpúsculo polar indica la edad post-ovulatoria del ovocito humano (Lasiene et al. 2009; Eichenlaub-Ritter et al. 1995). La degeneración del primer corpúsculo polar muestra un ovocito anciano (Lasiene et al. 2009).

Se encontró relación entre la fragmentación del primer corpúsculo polar y el tiempo transcurrido entre la denudación y la ICSI (Verlinsky et al. 2003). Parece que la morfología del primer corpúsculo polar cambia después de unas pocas horas en el cultivo in vitro. Por tanto, la morfología del primer corpúsculo polar no sirve como un marcador de confianza de la calidad ovocitaria y su competencia.

La extrusión del primer corpúsculo polar indica el final de la maduración meiótica. En el peor de los casos, una maduración nuclear subóptima puede llevar a un fracaso de la extrusión del primer corpúsculo polar. El hecho de que un ovocito madure rápido antes de su aspiración y quede detenido mucho tiempo en este estado antes de la fertilización podría contribuir a la degeneración del corpúsculo (Eichenlaub-Ritter et al. 1995). La estimulación ovárica puede resultar en una recuperación de ovocitos en MII con duración variable en la maduración nuclear, y por ello se pueden encontrar corpúsculos polares diferentes.

En cuanto a la **forma del ovocito**, este puede tener un tamaño normal, aumentado o disminuido; o puede tener una membrana regular o irregular. La membrana irregular y la fragmentación están asociadas a la degeneración del ovocito. (Sá et al. 2007).

Anormalidades en el tamaño se asocian con aneuploidías (Sá et al. 2007). Los embriones que proceden de ovocitos gigantes dan lugar más fácilmente a triploides (Rosenbusch et al. 2002). Aunque la aparición de estos ovocitos es relativamente rara después de la estimulación ovárica, su uso es potencialmente peligroso, ya que son cromosómicamente anormales pero pueden tener un cleavage normal y un desarrollo normal hasta blastocisto. La transferencia de estos embriones aumenta la probabilidad de aborto (Balakier et al. 2002).

La forma ovoide del ovocito se relaciona con retrasos en los parámetros in vitro (Ebner et al. 2008).

1.1.1.2 Alteraciones citoplasmáticas

La causa de las anomalías citoplasmáticas es probablemente multifactorial.

Las **vacuolas** son un tipo de inclusiones citoplasmáticas rodeadas de membrana y llenas de fluido. Pueden variar en número y tamaño (Cuaderno ASEBIR) y pueden estar presentes en el ovocito desde el principio o pueden aparecer más tarde, debido a la manipulación de los ovocitos en el laboratorio (Ebner et al. 2005).

La presencia de vacuolas podría deberse a una endocitosis incontrolable o a la fusión de vesículas preexistentes producidas por el Retículo Endoplasmático Liso o el Aparato de Golgi, que en condiciones normales saldrían por exocitosis (Ebner et al.

2005). Algunos autores consideran que las vacuolas son una señal de severa degeneración (Van Blerkom 1990).

El **REL** es un tipo de inclusión citoplasmática con tamaño similar al de un pronúcleo y forma ligeramente elíptica. Consiste en una acumulación masiva de sáculos de Retículo Endoplasmático Liso (Cuaderno ASEBIR) y podría ser una consecuencia de la estimulación ovárica, ya que no se observa en vesículas germinales procedentes de ovarios no estimulados (Van Blerkom 1990).

En la ilustración 5 se pueden observar vacuolas y REL (Cuaderno ASEBIR).



Ilustración 5. Vacuolas (V) y REL (R)

La **granulación citoplasmática** consiste en un área grande y oscura en el citoplasma. Puede ser homogénea, ocupando todo el citoplasma (Kahraman et al. 2000), o central, con un borde claro fácilmente distinguible (Serhal et al. 1997). Además la granulosidad puede ser ligera o severa. La severidad de la granulosidad se basa en el diámetro y la profundidad de la lesión. La granulosidad citoplasmática de un ovocito puede ser una señal de inmadurez citoplasmática (Kahraman et al. 2000).

No se sabe qué factores son responsables de granulosidad citoplasmática, una razón podrían ser las anomalías cromosómicas. En un estudio (Kahraman et al. 2000) se encontró una tasa de aneuploidía del 52% en embriones procedentes de ovocitos con granulosidad central severa. Sin embargo, esa alta tasa de aneuploidía podría ser debida a la morfología ovocitaria, a la avanzada edad de la mujer o a la infertilidad severa masculina, ya que en otros estudios (Van Blerkom, Henry 1988; Van Blerkom 1989) esa tasa es del 15-20%.

En la ilustración 6 se puede observar un ovocito con granulación central (Cuaderno ASEBIR).



Ilustración 6. Ovocito con granulación central

Las **inclusiones citoplasmáticas** son pequeñas áreas de necrosis. Pueden incluir cuerpos refringentes, compuestos por lípidos y gránulos densos que pueden estar agrupados o aislados, o cuerpos picnóticos no refringentes que suelen aparecer en forma de herradura (Cuaderno ASEBIR). En la ilustración 7 se pueden observar inclusiones citoplasmáticas (Cuaderno ASEBIR).

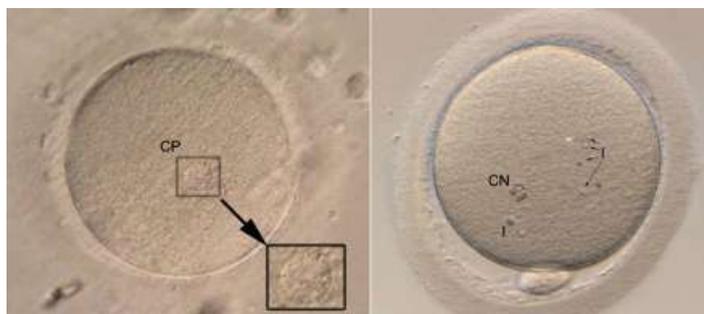


Ilustración 7. Inclusiones citoplasmáticas: cuerpos picnóticos (CP), cuerpos necróticos (CN) y cuerpos refringentes aislados (I).

Existen varios estudios acerca del efecto de la calidad ovocitaria sobre el resultado de la ICSI (Sá et al. 2007; Balaban, Urman 2006; Herrero et al. 2011; Chamayou et al. 2006; Lasiene et al. 2009; De Sutter et al. 1996; Serhal et al. 1997; Hassan-Ali et al. 1998; Rienzi, Vajta & Ubaldi 2011; Ebner et al. 2000; Kahraman et al. 2000; Rienzi et al. 2008; Coticchio et al. 2004), en algunos se encuentra relación entre la morfología del ovocito y el resultado de la ICSI y en otros no, por tanto es un tema controvertido.

1.1.2 Factores que afectan a la calidad ovocitaria y a la respuesta ovárica en general

La calidad ovocitaria puede verse afectada negativamente por varios factores, como la edad avanzada de la mujer, la elevada concentración de FSH basal, el tabaco, el tipo de estimulación ovárica, el intervalo de tiempo entre la inyección de la HMG y la punción, el nivel de estradiol (Rashidi et al. 2005), la punción folicular, el cultivo *in vitro* y la manipulación en el laboratorio (Herrero et al. 2011). La calidad ovocitaria también puede estar determinada por factores genéticos (Balaban, Urman 2006).

1.1.2.1 Efecto de la estimulación ovárica

La estimulación ovárica se emplea en las Técnicas de Reproducción Asistida para estimular el crecimiento de varios folículos y así poder obtener el mayor número de ovocitos de alta calidad que sea posible. En los protocolos de estimulación ovárica controlada, el primer aumento de los niveles de estradiol puede llevar a una oleada de LH muy temprana, llevando a un fin prematuro del ciclo. Para evitar esto, se realiza una supresión de la hipófisis utilizando agonistas o antagonistas de la GnRH (Cavagna et al. 2011).

La FSH tiene un papel muy importante en el desarrollo folicular. Su papel principal es la selección de un folículo dominante preovulatorio, a partir de un folículo antral (Zelevnik, Wildt & Schuler 1980). Sin embargo, las etapas tempranas del desarrollo folicular son relativamente independientes de las gonadotropinas (Zelevnik 2004; Zelevnik, Wildt & Schuler 1980). Se podría esperar que los elevados niveles de FSH que se alcanzan debido a los tratamientos de estimulación ovárica, provoquen un agotamiento del pool de folículos porque estimule a crecer los folículos que estaban en reposo. Sin embargo, si el pool de folículos antrales ya ha sido seleccionado independientemente de las gonadotropinas, la cantidad de FSH podría afectar solo al desarrollo de los folículos preovulatorios que vienen del pool de folículos antrales, que de otra manera podrían haber entrado en atresia debido a la selección del folículo dominante. Si esto es así, el incremento de la FSH durante la fase lútea tardía podría no afectar al número de ovocitos de la cohorte. Como resultado, los ciclos repetidos no deberían afectar a la reserva ovárica. Sin embargo, si el aumento de la FSH aumenta el

número de folículos reclutados dentro de la cohorte, el tratamiento podría incrementar la depleción del pool de folículos estimulando el resto de folículos a crecer. Esto podría resultar en una disminución del número de ovocitos disponibles y podría afectar a la reserva ovárica en repetidos ciclos (Gougeon, 1998).

El final del desarrollo folicular está marcado por el efecto de la LH a mitad de ciclo, que surge por la administración exógena de HCG. La LH induce la ruptura de la pared del folículo, desencadena la conversión de folículo a cuerpo lúteo y provoca cambios en el ovocito y las células del cúmulus. La LH hace que se reanude la meiosis, haciendo que el ovocito progrese desde vesícula germinal a MI y, posteriormente, lo detiene en MII. El citoplasma también está influenciado por la oleada de LH, teniendo lugar una serie de cambios que son críticos para que tenga lugar la fertilización normal (Coticchio et al. 2004).

La hormona clave en el desarrollo folicular es la FSH, mientras que se requieren cantidades muy pequeñas de LH en los distintos estadios del desarrollo folicular. Niveles excesivos de LH en la fase folicular pueden tener efectos adversos sobre la fertilización, implantación, tasa de embarazo, desarrollo embrionario temprano (Kolibianakis et al. 2003) y calidad ovocitaria. Además pueden aumentar la incidencia de aborto (Imthurn et al. 1996). Debido al temor al efecto adverso de la LH en la fase folicular, se hicieron estudios comparando el efecto de la estimulación ovárica con HMG (que contiene FSH y LH) y FSH sola (ya sea purificada o recombinante) sobre la calidad ovocitaria. Algunos estudios (Rashidi et al. 2005; Out et al. 1996; Tanbo et al. 1990) no encuentran diferencias significativas entre el uso de HMG o FSH sobre la calidad ovocitaria y el número de ovocitos maduros. En cambio, otros estudios (Imthurn et al. 1996; Daya, Gunby 1999) observan mayor número de ovocitos morfológicamente normales y mayor número de ovocitos maduros en las pacientes estimuladas con FSH purificada, comparado con las estimuladas con HMG.

A diferencia de lo que ocurre en el proceso *in vivo*, en el cual la maduración del ovocito ocurre como resultado de una selección natural larga y meticulosa (Van Soom et al. 2007), la estimulación ovárica suprime esta selección y esto podría resultar en la maduración de ovocitos anormales que de otra manera hubieran entrado en atresia. De esta manera la calidad ovocitaria podría verse comprometida (Swain, Pool 2008).

1.1.2.2 Efecto de los ciclos repetidos y la edad

La fertilización in vitro ha sido exitosa en un gran número de parejas (Templeton, Morris & Parslow 1996; Engmann et al. 1999). Sin embargo, la mayoría de los pacientes infértiles necesitan más de un ciclo de FIV/ICSI para conseguir embarazo, lo cual resulta en repetidas estimulaciones del ovario. Un asunto controvertido es si la respuesta ovárica se ve afectada tras varios ciclos consecutivos de estimulación ovárica controlada (Luk, Arici 2010).

Es posible que la punción folicular tenga un efecto destructivo sobre los capilares y los folículos del ovario, y ese efecto se va acumulando durante repetidas punciones. Además las punciones repetidas también podrían inducir a la liberación de autoantígenos, provocando una disminución del pool de folículos (Gobert et al. 1992; Luk, Arici 2010; de Boer et al. 2004). Si esto es verdad, se espera que en las mujeres que se someten a ciclos repetidos disminuya el número de ovocitos recuperados.

Kolibianakis et al. (2002); Hoveyda et al. (2002); de Boer et al. (2004) y Caligara et al. (2001) evaluaron a pacientes que se sometieron a varios ciclos de estimulación ovárica controlada. Todos ellos encontraron que el número de ovocitos recuperados permanecía constante en los ciclos sucesivos, mientras que la dosis de gonadotropinas requerida iba aumentando. En uno de los estudios (Kolibanakis et al. 2002) se concluyó que el aumento de la cantidad de gonadotropinas requeridas para conseguir un mismo número de ovocitos indica que hay un deterioro en la respuesta ovárica. Sin embargo, los otros tres estudios concluyeron que al no disminuir el número de ovocitos recuperados, la respuesta ovárica no se deteriora, a pesar de tener que ajustar las dosis hormonales. Además el estudio de Caligara et al. (2001) realizado en donantes de ovocitos, mostró que la calidad ovocitaria no se veía afectada a lo largo de los ciclos sucesivos.

Todos ellos encontraron que, al aumentar la edad de la mujer, disminuía el número de ovocitos recuperados y aumentaba la dosis de gonadotropinas requerida. Eso se debe a que el envejecimiento ovárico está asociado con una reducción de la reserva folicular y con una aceleración de la atresia (Richardson, Senikas & Nelson, 1987) que lleva a la recuperación de menor número de ovocitos (Croucher et al. 1998; Roest et al. 1996).

En cuanto a la tasa de embarazo, la mayoría de estudios han encontrado que ésta no disminuye, o disminuye muy poco, a lo largo de los ciclos consecutivos (Templeton et al. 1996; Meldrum et al. 1998; De Vries et al. 1999; Dor et al. 1996).

1.1.2.3 Efecto del intervalo de tiempo entre los ciclos

El hecho de esperar más tiempo o menos para comenzar el ciclo siguiente, podría tener consecuencias sobre la respuesta ovárica y el resultado de la ICSI. Un factor importante podría ser la edad, ya que el hecho de esperar un tiempo largo tiene como consecuencia un aumento de la edad de la mujer. Sin embargo, existen pocos estudios al respecto (Reichman et al. 2013; Silverberg et al. 1992; Opsahl et al. 2001; Caligara et al. 2001).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este trabajo es que “la calidad ovocitaria en aquellas mujeres en las que el intervalo de tiempo entre el primer y el segundo ciclo de estimulación ovárica es mayor de seis meses, es mejor que en las mujeres en las cuales ese intervalo es menor de seis meses”.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del tiempo transcurrido entre el primer y segundo ciclo de estimulación ovárica sobre:

- El número total de ovocitos recuperados en la punción.
- El número de ovocitos maduros obtenidos.
- La calidad ovocitaria.
- El número de ovocitos fertilizados.
- El número de embriones evolutivos.
- La calidad embrionaria.
- La tasa de embarazo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población de estudio

El presente estudio incluye pacientes que han sido tratadas en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

Se han recogido datos de 44 mujeres que han seguido un tratamiento de FIV o ICSI en un periodo comprendido entre Enero de 2012 y Mayo de 2013. Las edades de las mujeres están comprendidas entre los 30 y los 39 años de edad. En los hospitales públicos no se realizan tratamientos de reproducción asistida a mujeres que han alcanzado los 40 años de edad.

A todas las pacientes se les ha realizado un estudio de esterilidad básico con el perfil hormonal, serología, cariotipo e histerosalpingografía. En el estudio no se han tenido en cuenta los factores de esterilidad de las parejas ni la calidad seminal.

Se han tenido en cuenta el primer y segundo ciclo de FIV/ICSI de cada mujer y el tiempo transcurrido entre ambos ciclos, de manera que se han dividido las pacientes en dos grupos. Un grupo (n=22) lo forman las mujeres en las cuales transcurren menos de seis meses entre el primer y segundo ciclo, y el otro grupo (n=22) está constituido por las mujeres en las que transcurren más de 6 meses entre el primer y segundo ciclo. En ningún caso el tiempo transcurrido entre los ciclos es inferior a tres meses ni superior a once meses.

3.2 Tipo de estudio

Se trata de un estudio observacional, de cohortes, retrospectivo y unicéntrico.

3.3 Protocolo de Estimulación Ovárica

Todas las pacientes incluidas en el estudio han sido tratadas con un protocolo con agonistas o antagonistas de la GnRH, que se utilizan para el frenado de la hipófisis. El

frenado hipofisario sirve para evitar que se produzca un pico endógeno de LH, que desencadenaría la ovulación espontánea y llevaría a la cancelación del ciclo.

En los protocolos con agonistas de la GnRH, a las pacientes se les administran 0,2 ml/día del agonista a mitad de la fase lútea del ciclo previo a la estimulación (normalmente el día 21), de esta manera el ovario queda en reposo, evitando así el pico de LH antes de que se estimule la ovulación. El primer día del ciclo en el que se va a realizar la estimulación, se administra la hormona FSH (150-300 IU/día) y se baja la dosis del agonista de la GnRH a 0,1 ml/día.

En los protocolos con antagonistas de la GnRH, a las mujeres se les administran anticonceptivos orales en el ciclo previo para que el ovario quede en reposo. El día 2 o 3 del ciclo se comienza a administrar la FSH (150-300 UI/día) y el día 7 se administra el antagonista de la GnRH (0,25 mg/día).

La duración del estímulo oscila entre 10 y 12 días dependiendo de la respuesta de la mujer al tratamiento.

En ambos tipos de protocolo, el día 7 se realiza un control ecográfico para valorar el reclutamiento folicular.

La estimulación ovárica se realiza con gonadotropinas recombinantes y, en algunos casos, se utiliza una mezcla de FSH y LH en vez de FSH sola. Las dosis se ajustan en función de la edad y el peso de la paciente, así como de marcadores reserva ovárica como la FSH basal, el estradiol basal y el recuento de folículos antrales.

El día 10 del ciclo se realiza un segundo control ecográfico y el análisis de estradiol en sangre periférica, para determinar si se ha alcanzado un desarrollo folicular adecuado y observar el grosor del endometrio. Para considerar que la respuesta es normal, la paciente debe tener 100-200pg de estradiol por folículo maduro, un mínimo de 4 folículos con un diámetro entre 18-20 mm y un grosor endometrial de 7-14 mm con apariencia de triple línea.

36 horas antes de la punción folicular se administra gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir la ovulación.

En los casos en los que hay riesgo de Síndrome de Hiperestimulación ovárica, se realiza un protocolo corto con antagonista y se utiliza un agonista de la GnRH para inducir la ovulación

3.4 Punción folicular

La punción folicular se realiza el día 13 o 14 del ciclo, 36 horas después de la administración de la hCG.

La recuperación de los ovocitos se lleva a cabo en quirófano mediante punción transvaginal guiada por ecografía, con la sedación previa de la paciente. El ecógrafo lleva acoplada una aguja conectada a un sistema de aspiración, que punciona el folículo y aspira el líquido folicular donde se encuentra el ovocito. Los tubos con el líquido folicular se vacían en placas en una campana de flujo laminar con superficie calefactada a 37°C, situada en el laboratorio.

3.5 Protocolo de laboratorio

Para realizar las técnicas de FIV o de ICSI se siguen los protocolos establecidos en el laboratorio de embriología de la Unidad de Reproducción Asistida. Los medios utilizados pertenecen a la casa comercial COOK® y se siguen los protocolos indicados por esta casa comercial para el cultivo de los gametos y los embriones.

En la campana de flujo laminar se examina el líquido folicular procedente de la punción con una lupa y se recogen los ovocitos. Estos se pasan a un medio de cultivo y se mantienen en una incubadora a 37°C y con una atmósfera de 6% de CO₂. Posteriormente, se decumulan los ovocitos utilizando hialuronidasa y se valora su morfología utilizando los criterios de ASEBIR.

Se realiza la capacitación del semen por swim-up y se hace un diagnóstico de estado del semen y del número, movilidad y morfología de los espermatozoides según los criterios de la OMS.

En la mayoría de los casos la fertilización se realiza por ICSI, excepto en los casos en que se dispone de gran cantidad de ovocitos maduros, en cuyo caso, parte de los ovocitos se someten a ICSI y parte a FIV convencional.

Aproximadamente 17 horas después de la FIV/ICSI se valora la fertilización. Los ovocitos que han sido fertilizados correctamente presentan dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Posteriormente, los ovocitos fertilizados se mantienen en una incubadora a 37°C y con una atmósfera de 6% de CO₂ y se observa como va variando su morfología todos los días hasta el momento de la transferencia. La clasificación de los embriones se realiza según los criterios de calidad embrionaria de ASEBIR, agrupándolos en cuatro categorías (A, B, C y D). Los embriones de tipo A son los que tienen mayor capacidad de implantación, mientras que los embriones de tipo D son los que tienen menor probabilidad de éxito.

3.6 Transferencia embrionaria

La transferencia se realiza en día +2 o en día +3, es decir, 2 o 3 días después de la punción. Se trata de una transferencia intrauterina guiada por ultrasonografía abdominal, para la que no se requiere anestesia.

Se pueden transferir un máximo de 3 embriones, de acuerdo con la ley 14/2006. Los embriones sobrantes pueden ser criopreservados o no, dependiendo de su calidad. En este estudio no se tuvieron en cuenta los ciclos de FIV/ICSI procedentes de embriones congelados.

Después de la transferencia, se les administra progesterona a las pacientes para dar soporte a la fase lútea. Este aporte de progesterona se mantiene durante 15 días, tras los cuales se realiza el test de embarazo con la primera orina de la mañana para confirmar si hubo o no embarazo.

3.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realiza con el programa estadístico IBM SPSS Statistics v19 y v21. Para comprobar la independencia entre las variables cualitativas se utiliza el Test Chi-cuadrado, excepto en los casos en que hay casillas con frecuencia menor a 5, en cuyo caso se utiliza el Test exacto de Fisher. Para la comparación de variables cuantitativas que siguen una distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) se utiliza la prueba T de student. Con los datos que no siguen una distribución normal se lleva a cabo el Test U de Mann Withney.

Se consideran estadísticamente significativos los p-valores menores de 0,05.

4 RESULTADOS

Se tomaron datos de 44 mujeres en las que sólo se tuvieron en cuenta el primer y segundo ciclo de FIV/ICSI. Estas mujeres fueron divididas en dos grupos. Un grupo está constituido por 22 mujeres en las cuales transcurren menos de 6 meses entre el primer y segundo ciclo, y el otro grupo está formado por 22 mujeres en las cuales transcurren más de 6 meses entre ambos ciclos. Se quiere estudiar si el intervalo de tiempo transcurrido entre el primer y segundo ciclo de estimulación ovárica tiene algún efecto sobre la respuesta ovárica y el resultado de la FIV/ICSI.

Para demostrar que la muestra de estudio es homogénea, se evaluó si había diferencias en la edad, protocolo de estimulación ovárica y número de embriones transferidos. Para ello se calculó la edad media de las mujeres del grupo de “menos de seis meses” ($35,32 \pm 2,26$) y del grupo de “más de seis meses” ($34,36 \pm 2,74$) y se observó que no existe diferencia significativa entre las edades de las mujeres en ambos grupos (Tabla 1). También se calculó el número medio de embriones transferidos en ambos grupos (Tabla 1), obteniendo un número medio de embriones transferidos de $1,86 \pm 0,41$ en el grupo de “menos de seis meses” y de $1,93 \pm 0,36$ en el grupo de “más de seis meses”, encontrando que la diferencia no es significativa.

	Menos 6 meses	Más 6 meses	p-valor
Edad media mujer	$35,32 \pm 2,26$	$34,36 \pm 2,74$	$P > 0,05$ (NS)
Nº embriones transferidos	$1,86 \pm 0,41$	$1,93 \pm 0,36$	$P > 0,05$ (NS)

Tabla 1. Edad media de las mujeres y número medio de embriones transferidos en ambos grupos. NS indica que la diferencia no es significativa.

Para evaluar si había diferencias en el protocolo de estimulación ovárica (Tabla 2) en el grupo de “menos de seis meses” comparado con el grupo de “más de seis meses” se estudió si había cambios en:

- El protocolo en cuanto al uso de **antagonistas o agonistas de la GnRH**: se calculó el número de mujeres que seguían un protocolo con antagonistas, el número de mujeres que llevaban a cabo un protocolo con agonistas y el número de mujeres en las que había un cambio en el protocolo entre el primer y el segundo ciclo de estimulación ovárica. En el grupo de “menos de seis meses” 14 mujeres siguieron un protocolo con antagonistas, 5 tuvieron un cambio en el protocolo y 3 se sometieron a un protocolo con agonistas. En el grupo de “más de seis meses”, 14 mujeres se sometieron a un protocolo con antagonistas, 3 tuvieron cambio de protocolo y 5 siguieron un protocolo con agonistas. No se encontraron diferencias significativas en ambos grupos.

- El protocolo en cuanto al uso de **FSH sola o FSH+LH**: se calculó el número de mujeres en las cuales la estimulación ovárica se realizaba con FSH sola y el número de mujeres en las que se utilizaba una combinación de LH y FSH para la estimulación, así como el número de mujeres en las que se realizaba un cambio en el protocolo entre el primer y el segundo ciclo. En el grupo de “menos de seis meses” 16 mujeres se sometieron a estimulación ovárica con FSH sola, 3 a FSH+LH y 3 tuvieron un cambio en el protocolo. En el grupo de “más de seis meses” 18 mujeres se estimularon con FSH sola, 1 con FSH+LH y en 3 mujeres hubo un cambio en el protocolo. La diferencia no era significativa.

- Las **dosis de FSH o LH+FSH**: se estudió en cuántas mujeres había cambios en la dosis de gonadotropinas utilizadas en el primer y el segundo ciclo de estimulación, y cuántas permanecían con las mismas dosis en ambos ciclos. Tanto en el grupo de “menos de seis meses” como en el de “más de seis meses” 13 mujeres tuvieron un cambio en la dosis, mientras que 9 mujeres no tuvieron cambio en la dosis.

- Los **días de estimulación**: se estudió en cuántas mujeres había un cambio en el número de días de estimulación ovárica entre el primer y el segundo ciclo. Se observó que tanto en el grupo de “menos de seis meses” como en el

grupo de “más de seis meses” 13 mujeres tenían un cambio en el número de días de estimulación, mientras que 9 no tenían cambio.

		Menos 6 meses	Más 6 meses	p-valor
Antagonistas/Agonistas	<i>Antagonistas</i>	14	14	P > 0,05 (NS)
	<i>Cambio</i>	5	3	
	<i>Agonistas</i>	3	5	
FSH/FSH+LH	<i>FSH sola</i>	16	18	P > 0,05 (NS)
	<i>FSH+LH</i>	3	1	
	<i>Cambio</i>	3	3	
Dosis de gonadotropinas	<i>Cambio dosis</i>	13	13	P > 0,05 (NS)
	<i>No cambio</i>	9	9	
Días de estimulación	<i>Cambio</i>	13	13	P > 0,05 (NS)
	<i>No cambio</i>	9	9	

Tabla 2. Protocolo de estimulación ovárica. NS indica que la diferencia no es significativa.

Por tanto, no se encontraron diferencias significativas en la edad de las mujeres, el número medio de embriones transferidos y el protocolo de estimulación ovárica, en ambos grupos de mujeres. Una vez que se sabe que la muestra es homogénea, se procede al estudio del posible efecto que tiene el intervalo de tiempo entre el primer y segundo ciclo sobre la respuesta ovárica y el resultado de la ICSI/FIV.

4.1 Número de ovocitos recuperados

En cada mujer, se comparó el número de ovocitos recuperados en el primer ciclo de estimulación ovárica, con el número de ovocitos recuperados en el segundo ciclo. De esta manera se observó si el número de ovocitos aumentaba (mejoraba) en el segundo ciclo o si, por el contrario, no se encontraba mejoría. Posteriormente se calculó el número de mujeres en las que había mejoría, tanto en el grupo de “menos de seis meses” como en el grupo de “más de seis meses”.

En el grupo de “menos de seis meses” mejora el número de ovocitos recuperados en 9 mujeres (40,9%), mientras que en el grupo de “más de 6 meses” mejora el número de ovocitos en 10 mujeres (45,5%). Por tanto, la respuesta en cuanto al número de ovocitos recuperados es mejor en el grupo de “más de seis meses”, sin embargo la diferencia no es significativa. Los resultados se muestran en la tabla 3 y en la figura 1.

			Tiempo entre el 1º y 2º ciclo	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Mejoría en el nº ovocitos	Mujeres con mejora	Recuento	9	10
		%	40,9%	45,5%
	Mujeres sin mejora	Recuento	13	12
		%	59,1%	54,5%

Tabla 3. Mejoría en el número de ovocitos recuperados entre el primer y segundo ciclo en el grupo de "menos de seis meses" y el grupo de "más de seis meses"

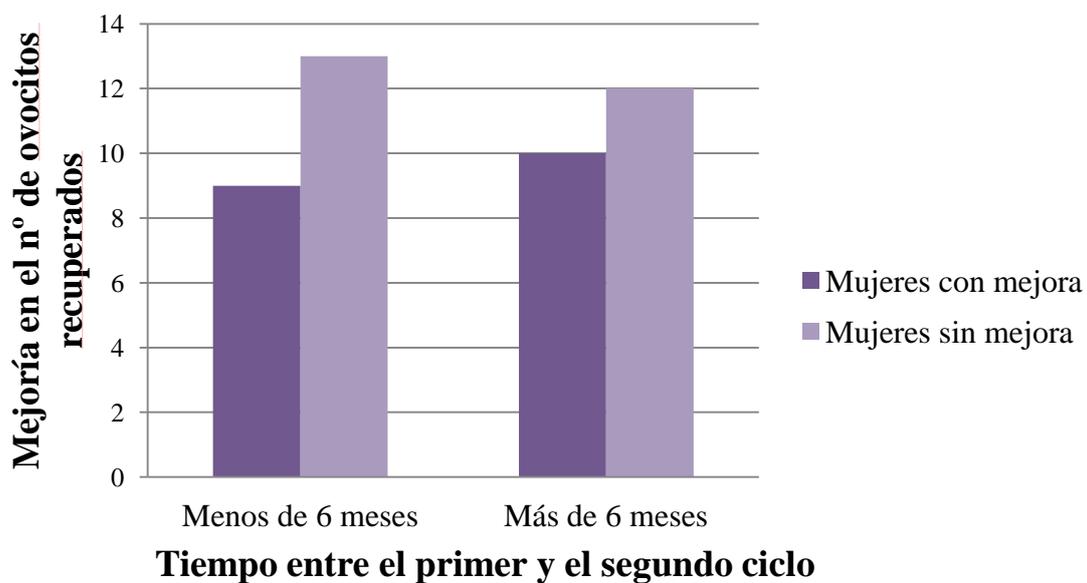


Figura 1. Mejoría en el número de ovocitos recuperados en el grupo de "menos de seis meses" y en el grupo de "más de seis meses".

También se estudia, en cada mujer, en qué cantidad varía el número de ovocitos recuperados entre el primer y el segundo ciclo (Tabla 4) y se hace la media en los dos grupos de estudio (Tabla 5). En el grupo de “menos de seis meses” se obtiene una media de $-0,18 \pm 2,938$ y en el grupo de “más de seis meses” se obtiene una media de $-0,55 \pm 3,7$. Sin embargo las diferencias no son significativas. Deducimos por tanto, que no existe diferencia significativa entre el número de ovocitos recuperados en pacientes en las que han transcurrido menos de 6 meses entre el primer y segundo ciclo y las pacientes en las que han transcurrido más de 6 meses.

Paciente	ciclo 1	ciclo 2	diferencia entre los ciclos	paciente	ciclo 1	ciclo 2	diferencia entre los ciclos
1	10	16	6	23	6	5	-1
2	10	5	-5	24	7	10	3
3	6	11	5	25	15	5	-10
4	7	7	0	26	17	11	-6
5	2	3	1	27	10	6	-4
6	14	12	-2	28	5	3	-2
7	12	13	1	29	15	20	5
8	17	15	-2	30	15	20	5
9	13	16	3	31	2	5	3
10	4	3	-1	32	9	10	1
11	9	5	-4	33	7	7	0
12	8	10	2	34	4	5	1
13	6	6	0	35	5	9	4
14	15	16	1	36	11	11	0
15	4	5	1	37	15	12	-3
16	7	7	0	38	13	8	-5
17	8	7	-1	39	17	15	-2
18	7	3	-4	40	5	6	1
19	13	13	0	41	8	9	1
20	3	3	0	42	7	4	-3
21	15	9	-6	43	9	8	-1
22	8	9	1	44	9	10	1

Tabla 4. Diferencia entre el número de ovocitos recuperados en el primer ciclo y en el segundo. A la izquierda el grupo de "menos de seis meses" y a la derecha el grupo de "más de seis meses"

	Tiempo transcurrido entre el 1° y 2° ciclo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Diferencia entre n° ovocitos en 1° y 2° ciclo	Menos de 6 meses	22	-,18	2,938	,626
	Más de 6 meses	22	-,55	3,700	,789

Tabla 5. Media de la diferencia en el número de ovocitos recuperados en el primer y segundo ciclo.

4.2 Número de ovocitos maduros

Para evaluar si la respuesta en cuanto al número de ovocitos maduros (en MII) es mejor en el grupo de “menos de seis meses” o en el grupo de “más de seis meses”, se siguió el mismo procedimiento que para los ovocitos recuperados. Se observó que en el grupo de “menos de seis meses” mejoraron 7 mujeres (31,8%), mientras que en el grupo de “más de seis meses” mejoraron 10 mujeres (45,5%). Por tanto, en cuanto al número de ovocitos en MII, mejora mayor número de mujeres en el grupo de “más de seis meses”, sin embargo, la diferencia no es significativa. Los resultados se muestran en la tabla 6 y en la figura 2.

			Tiempo entre el 1º y 2º ciclo	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Mejoría en el n° de ovocitos en MII	Mujeres que mejoran	Recuento	7	10
		%	31,8%	45,5%
	Mujeres que no mejoran	Recuento	15	12
		%	68,2%	54,5%

Tabla 6. Mejoría en el número de ovocitos maduros entre el primer y el segundo ciclo de estimulación ovárica

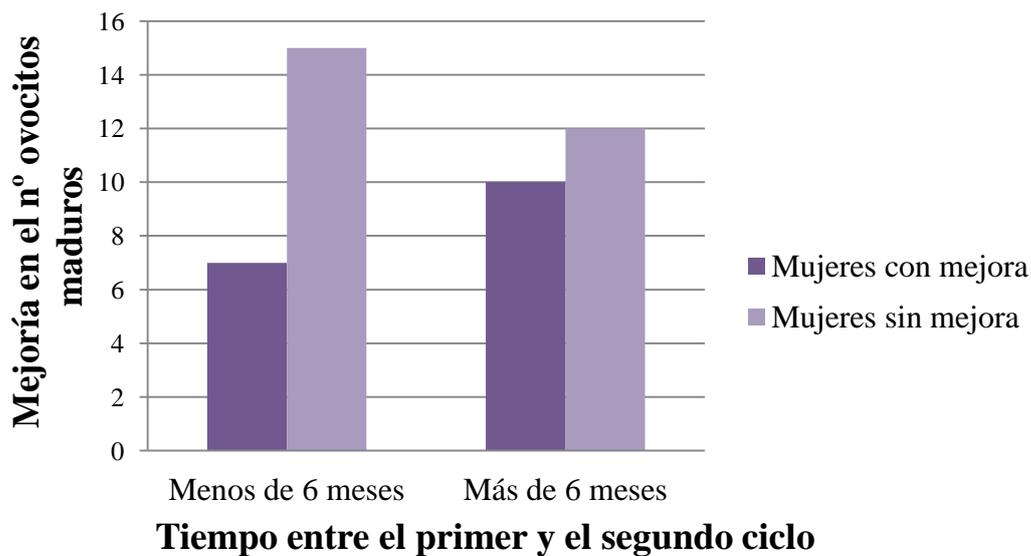


Figura 1. Mejoría en el número de ovocitos maduros en el grupo de "menos de seis meses" y en el grupo de "más de seis meses".

Al realizar la diferencia en el número de ovocitos maduros entre el primer y segundo ciclo de cada mujer y realizar la media en el grupo de “menos de seis meses” y en el grupo de “más de seis meses”, se obtienen los resultados recogidos en las tablas 7 y 8. En el grupo de “menos de seis meses” se obtiene una media de $-0,32 \pm 2,358$ y en el grupo de “más de seis meses” se obtiene una media de $-0,45 \pm 4,044$, sin embargo la diferencia no es significativa.

Con estos resultados deducimos que el intervalo de tiempo esperado entre el primer y el segundo ciclo de estimulación ovárica, no tiene un efecto adverso sobre el número de ovocitos maduros obtenidos.

Menos de 6 meses				Más de 6 meses			
Paciente	1º ciclo	2º ciclo	Diferencia entre 1º y 2º ciclo	Paciente	1º ciclo	2º ciclo	Diferencia entre 1º y 2º ciclo
1	9	14	5	23	4	5	1
2	8	5	-3	24	6	10	4
3	6	10	4	25	15	4	-11
4	6	6	0	26	15	9	-6
5	1	3	2	27	10	6	-4
6	11	10	-1	28	4	2	-2
7	10	11	1	29	13	19	6
8	14	13	-1	30	14	18	4
9	10	9	-1	31	2	3	1
10	4	3	-1	32	9	9	0
11	6	3	-3	33	6	7	1
12	8	9	1	34	2	4	2
13	5	6	1	35	4	9	5
14	13	15	2	36	6	9	3
15	4	4	0	37	14	12	-2
16	4	4	0	38	12	7	-5
17	8	6	-2	39	14	10	-4
18	7	3	-4	40	5	5	0
19	11	8	-3	41	7	7	0
20	3	3	0	42	7	4	-3
21	13	9	-4	43	8	6	-2
22	8	8	0	44	8	10	2

Tabla 7. Diferencia en el número de ovocitos maduros entre el primer y el segundo ciclo. A la izquierda se muestra el grupo de “menos de seis meses” y a la derecha el grupo de “más de seis meses”

	Tiempo transcurrido entre el 1º y 2º ciclo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Diferencia en el nº de ovocitos tratados entre el 1º y 2º ciclo	Menos de 6 meses	22	-,32	2,358	,503
	Más de 6 meses	22	-,45	4,044	,862

Tabla 8. Media de la diferencia en el número de ovocitos maduros en el primer y segundo ciclo.

4.3 Calidad ovocitaria

Para establecer la calidad de los ovocitos se tiene en cuenta su morfología. En este estudio solo se consideran los ovocitos maduros que van a ser tratados por ICSI, ya que en el caso de la FIV convencional no se realiza la decumulación ovocitaria y, por tanto, no se puede observar bien su morfología.

Para hacer la clasificación morfológica de los ovocitos me he basado en la clasificación de Sutter et al. (1996), de manera que los ovocitos fueron divididos en tres grupos:

- Ovocitos con morfología “ideal”
- Ovocitos con una anomalía morfológica
- Ovocitos con más de una anomalía morfológica

Para realizar el estudio he simplificado la clasificación haciendo dos grupos:

- Calidad 1: ovocitos con morfología “ideal”
- Calidad 2: ovocitos con anomalías morfológicas

Una vez clasificados los ovocitos, se estudia en cada mujer si mejora la calidad ovocitaria entre el primer y el segundo ciclo de ICSI. Posteriormente se compara el número de mujeres en las que hay mejoría en el grupo de “menos de seis meses” y en el grupo de “más de seis meses”. Los resultados se pueden observar en la tabla 9 y en la figura 3. En el grupo de “menos de seis meses” mejora la calidad ovocitaria en 10 mujeres (45,5%), mientras que en el grupo de “más de seis meses” mejora la calidad ovocitaria en 9 mujeres (40,9%). Se observa mayor número de mujeres con mejoría en el grupo de “menos de seis meses”, sin embargo, la diferencia no es significativa.

			Tiempo transcurrido entre el 1° y 2° ciclo	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Mejoría en la calidad ovocitaria	Mujeres con mejora	Recuento	10	9
		%	45,5%	40,9%
	Mujeres sin mejora	Recuento	12	13
		%	54,5%	59,1%

Tabla 9. Mejoría en la calidad ovocitaria entre el primer y segundo ciclo de ICSI.

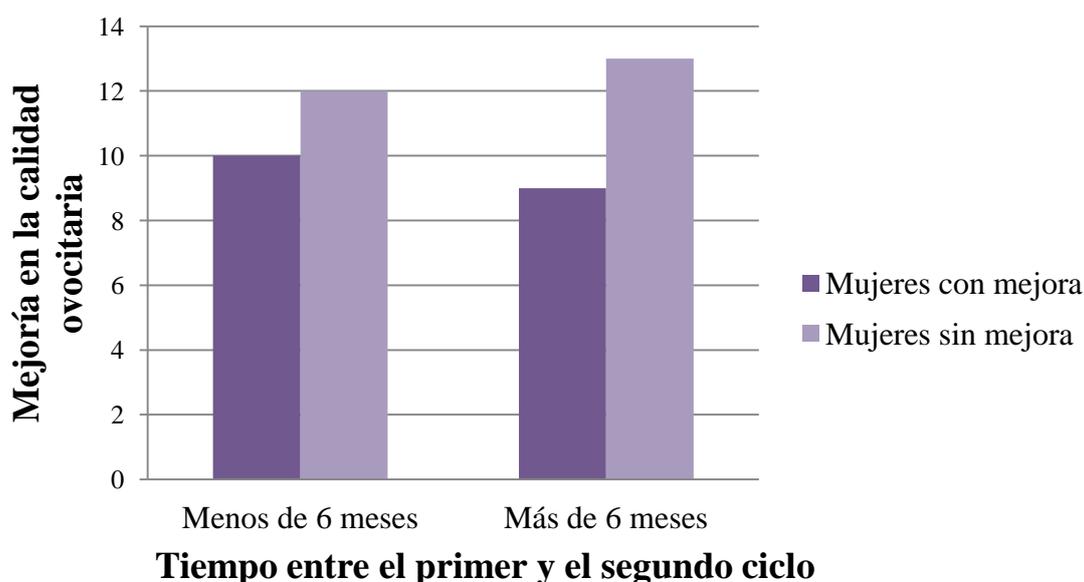


Figura 2. Mejoría en la calidad ovocitaria en el grupo de "menos de seis meses" y en el grupo de "más de seis meses"

Posteriormente, teniendo en cuenta solo los ovocitos de calidad tipo 1, se estudió en cada mujer la diferencia numérica de ovocitos de buena calidad entre el primer y segundo ciclo, y se realizó la media en los dos grupos de estudio (tablas 10 y 11). En el grupo de "menos de seis meses" se obtiene una media de $-0,27 \pm 3,641$, mientras que en

el grupo de “más de seis meses” la media es de $-0,36 \pm 3,736$. Sin embargo las diferencias no son significativas.

Con estos resultados deducimos que el intervalo de tiempo entre los ciclos no tiene ningún efecto sobre la calidad ovocitaria.

Menos de 6 meses				Más de 6 meses			
PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE EL 1º Y 2º CICLO	PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE EL 1º Y 2º CICLO
1	7	2	-5	23	2	1	-1
2	7	1	-6	24	5	5	0
3	4	5	1	25	11	3	-8
4	2	4	2	26	4	6	2
5	0	0	0	27	10	5	-5
6	5	9	4	28	2	1	-1
7	1	0	-1	29	6	11	5
8	2	3	1	30	2	7	5
9	1	8	7	31	1	2	1
10	2	1	-1	32	7	0	-7
11	2	0	-2	33	6	7	1
12	5	1	-4	34	1	1	0
13	3	4	1	35	0	6	6
14	0	1	1	36	3	5	2
15	4	1	-3	37	7	4	-3
16	0	2	2	38	3	4	1
17	7	3	-4	39	9	6	-3
18	2	2	0	40	4	4	0
19	1	6	5	41	2	6	4
20	3	0	-3	42	5	1	-4
21	2	7	5	43	7	4	-3
22	8	2	-6	44	5	5	0

Tabla 10. Diferencia en el número de ovocitos de buena calidad entre el primer y segundo ciclo de ICSI.

	Tiempo entre el 1º y 2º ciclo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Diferencia entre primer y segundo ciclo	Menos de 6 meses	22	-,27	3,641	,776
	Más de 6 meses	22	-,36	3,736	,796

Tabla 11. Media de la diferencia de ovocitos de buena calidad en el grupo de "menos de seis meses" y en el grupo de "más de seis meses"

4.4 Número de ovocitos fertilizados

Para evaluar el efecto del intervalo de tiempo transcurrido entre el primer y el segundo ciclo sobre número de ovocitos fertilizados se siguió la misma estrategia que

en los estudios anteriores. Se observó que, tanto en el grupo de “menos de seis meses” como en el de “más de seis meses” el número de ovocitos fertilizados entre el primer y segundo ciclo mejoraba en 7 mujeres (31,8%). El resultado se puede observar en la tabla 12 y en la figura 4.

			Tiempo transcurrido entre el 1° y 2° ciclo	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Mejoría en el n° de ovocitos fertilizados	Mujeres que mejoran	Recuento	7	7
		%	31,8%	31,8%
	Mujeres que no mejoran	Recuento	15	15
		%	68,2%	68,2%

Tabla 12. Mejoría en el número de ovocitos fertilizados entre el primer y el segundo ciclo

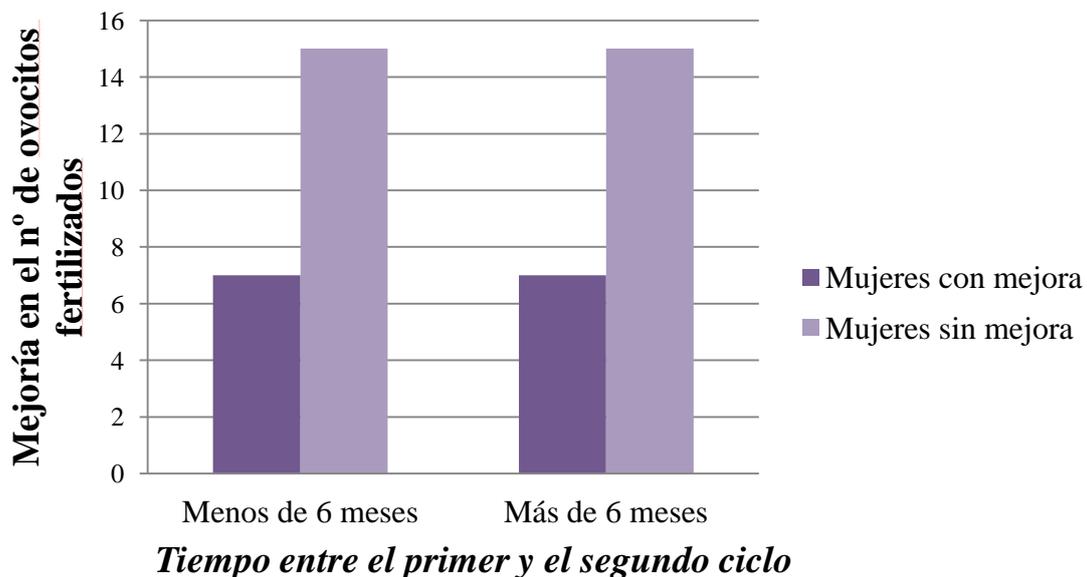


Figura 3. Mejoría en el número de ovocitos fertilizados en el grupo de "menos de seis meses" y en el grupo de "más de seis meses"

Se calcula la diferencia entre el número de ovocitos fertilizados en el primer y segundo ciclo (Tabla 13) y se realiza la mediana* en ambos grupos de estudio (Tabla 14). En el grupo de “menos de seis meses” se obtiene una mediana de -1, y en el grupo de “más de seis meses” se obtiene una mediana de -0,5. Sin embargo, las diferencias no son significativas.

Con estos resultados deducimos que el intervalo de tiempo entre los ciclos no tiene efecto sobre el número de ovocitos fertilizados.

* En este caso se tiene en cuenta la mediana en vez de la media porque los datos no se ajustan a una distribución normal.

Pacientes menos de 6 meses				Pacientes más de 6 meses			
PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE 1º Y 2º CICLO	PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE 1º Y 2º CICLO
1	4	8	4	23	2	4	2
2	6	4	-2	24	4	5	1
3	5	8	3	25	13	3	-10
4	4	2	-2	26	11	6	-5
5	1	2	1	27	7	5	-2
6	7	9	2	28	3	2	-1
7	8	7	-1	29	6	6	0
8	8	6	-2	30	6	8	2
9	8	5	-3	31	1	3	2
10	4	3	-1	32	5	4	-1
11	2	3	1	33	4	6	2
12	6	6	0	34	2	3	1
13	3	4	1	35	4	7	3
14	4	3	-1	36	4	4	0
15	4	2	-2	37	5	5	0
16	2	2	0	38	8	4	-4
17	4	5	1	39	9	7	-2
18	5	2	-3	40	3	2	-1
19	5	2	-3	41	4	4	0
20	3	2	-1	42	5	4	-1
21	9	5	-4	43	8	2	-6
22	4	3	-1	44	6	4	-2

Tabla 13. Diferencia en el número de ovocitos fertilizados entre el primer y el segundo ciclo

	Tiempo entre el 1º y 2º ciclo	Estadístico	Error típ.
Diferencia de nº ovocitos fertilizados en 1º y 2º ciclo	Menos de 6 meses	Media	-,59
		Mediana	-1,00
		Desv. típ.	2,062
	Más de 6 meses	Media	-1,00
		Mediana	-,50
		Desv. típ.	3,071

Tabla 14. Media y mediana de la diferencia del número de ovocitos fertilizados entre el primer y segundo ciclo

4.5 Número de embriones

Se evalúa el número de embriones evolutivos en D+2 siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores. En el grupo de “menos de seis meses” hay mejoría en el número de embriones entre el primer y segundo ciclo en 5 mujeres (22,7%) y en el grupo de “más de seis meses” hay mejoría en 7 mujeres (31,8%). La mejoría es mayor en el grupo de más de seis meses, sin embargo, la diferencia no es significativa. Los resultados se pueden observar en la tabla 15 y en la figura 5.

			Tiempo entre los ciclos	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Mejoría en el n° embriones	Mujeres que mejoran	Recuento	5	7
		%	22,7%	31,8%
	Mujeres que no mejoran	Recuento	17	15
		%	77,3%	68,2%

Tabla 15. Mejoría en el número de embriones entre el primer y segundo ciclo

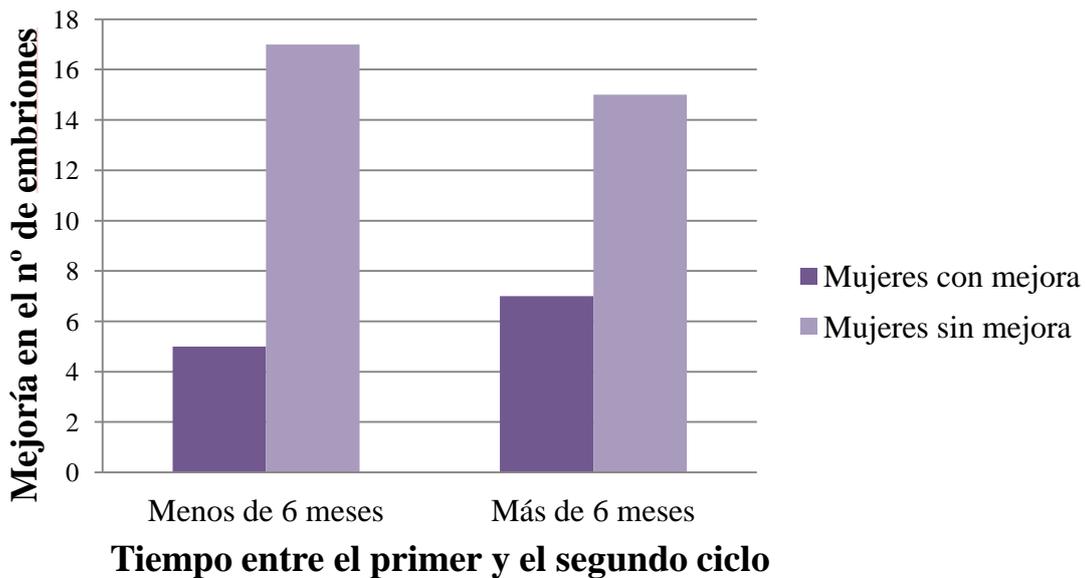


Figura 4. Mejoría en el número de embriones en el grupo de "menos de seis meses" y en el de "más de seis meses".

Se calculó la diferencia numérica del número de embriones en primer y segundo ciclo de cada mujer y se realizó la media en los dos grupos de estudio (Tablas 16 y 17). En el grupo de “menos de seis meses” se obtiene una media de $-0,50 \pm 2,198$ y en el grupo de “más de seis meses” la media es de $-1,14 \pm 3,075$. La diferencia no es significativa. Se deduce que el intervalo de tiempo transcurrido entre los ciclos no tiene ningún efecto sobre el número de embriones.

Nº EMBRIONES OBTENIDOS MENOS DE 6 MESES				Nº EMBRIONES OBTENIDOS MÁS DE 6 MESES			
PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE LOS CICLOS	PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE LOS CICLOS
1	4	8	4	23	2	4	2
2	6	4	-2	24	4	4	0
3	4	8	4	25	13	3	-10
4	4	1	-3	26	11	6	-5
5	1	2	1	27	7	5	-2
6	7	9	2	28	3	2	-1
7	8	7	-1	29	5	6	1
8	5	5	0	30	6	8	2
9	8	3	-5	31	1	3	2
10	4	3	-1	32	5	3	-2
11	2	2	0	33	4	6	2
12	6	6	0	34	1	3	2
13	3	4	1	35	4	6	2
14	4	3	-1	36	4	4	0
15	2	2	0	37	5	5	0
16	2	2	0	38	8	4	-4
17	4	4	0	39	9	6	-3
18	5	2	-3	40	3	2	-1
19	5	2	-3	41	4	3	-1
20	2	2	0	42	5	4	-1
21	8	5	-3	43	8	2	-6
22	4	3	-1	44	6	4	-2

Tabla 16. Diferencia en el número de embriones en primer y segundo ciclo. A la izquierda se muestra el resultado en el grupo de “menos de seis meses” y a la derecha el del grupo de “más de seis meses”.

	Tiempo entre los ciclos	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Diferencia entre los ciclos	Menos 6 meses	22	-,50	2,198	,469
	Más 6 meses	22	-1,14	3,075	,656

Tabla 17. Media de la diferencia del número embriones en el grupo de “menos de seis meses” y en el de “más de seis meses”

4.6 Calidad embrionaria

Se estudia la calidad de los embriones en D+2. Para la clasificación de los embriones me he basado en los criterios de clasificación de ASEBIR (Cuaderno ASEBIR):

- Categoría A: Preembrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
- Categoría B: Preembrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: Preembrión regular con una probabilidad de implantación media.
- Categoría D: Preembrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja.

Para realizar el estudio estadístico he simplificado la clasificación de la calidad embrionaria estableciendo dos grupos:

- Calidad embrionaria tipo 1: engloba a las categorías A y B.
- Calidad embrionaria tipo 2: engloba las categorías C y D.

Una vez clasificados los embriones, se observa el número de mujeres en las cuales mejora la calidad embrionaria entre el primer y segundo ciclo y se compara el “grupo de menos de seis meses” con el de “más de seis meses”. El resultado se puede observar en la tabla 18 y en la figura 6. En el grupo de “menos de 6 meses” mejora la calidad embrionaria en 9 mujeres (40,9%) y en el grupo de “más de 6 meses” mejora en 5 mujeres (22,7%). la mejoría es mayor en el grupo de “menos de seis meses”, pero esa diferencia no es significativa.

			Tiempo entre los ciclos	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Mejoría en la calidad embrionaria	Mujeres que mejoran	Recuento	9	5
		%	40,9%	22,7%
	Mujeres que no mejoran	Recuento	13	17
		%	59,1%	77,3%

Tabla 18. Mejoría en la calidad embrionaria entre el primer y el segundo ciclo

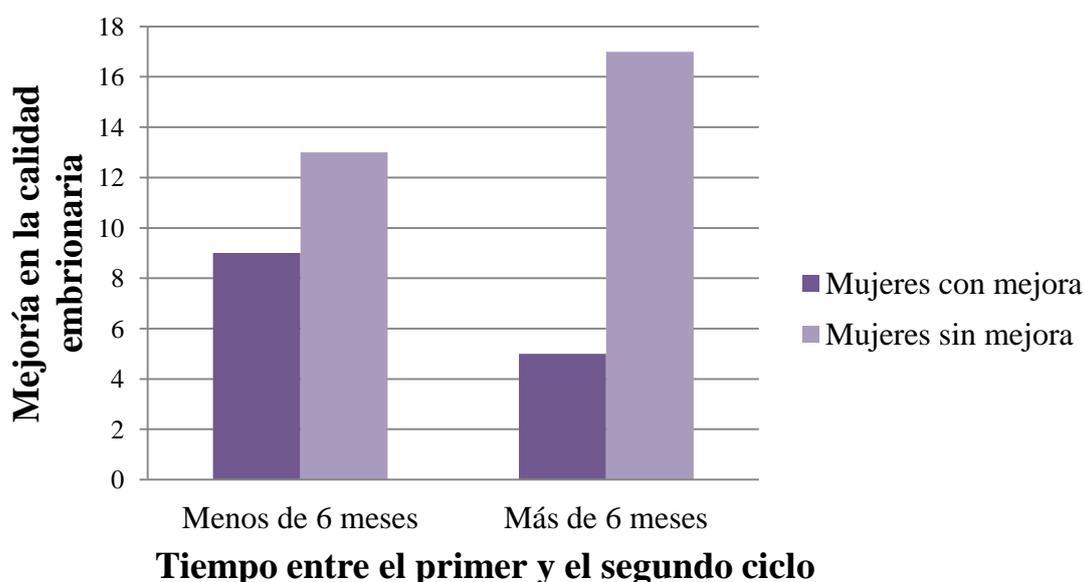


Figura 5. Mejoría en la calidad embrionaria en el grupo de "menos de seis meses" y en el de "más de seis meses".

Posteriormente, se calcula la diferencia entre la cantidad de embriones de buena calidad (calidad 1) en el primer y en el segundo ciclo, para cada mujer, y se hace la mediana* en los dos grupos de estudio (Tablas 19 y 20). En el grupo de "menos de seis meses" se obtiene una mediana de 0,00 y en el grupo de "más de seis meses" la mediana es de -1,00. La diferencia es significativa ($p < 0,05$) por tanto, cuando el tiempo

transcurrido entre el primer y el segundo ciclo es menor a seis meses, la calidad embrionaria es mejor.

*se realiza la mediana porque los datos no se ajustan a una distribución normal.

CALIDAD EMBRIONARIA MENOS DE 6 MESES				CALIDAD EMBRIONARIA MÁS DE 6 MESES			
PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE LOS CICLOS	PACIENTE	1º CICLO	2º CICLO	DIFERENCIA ENTRE LOS CICLOS
1	3	3	0	23	1	1	0
2	3	3	0	24	0	0	0
3	3	8	5	25	10	3	-7
4	4	1	-3	26	6	1	-5
5	1	2	1	27	3	4	1
6	3	8	5	28	3	1	-2
7	5	5	0	29	3	4	1
8	3	3	0	30	1	3	2
9	4	2	-2	31	1	2	1
10	1	3	2	32	2	1	-1
11	2	2	0	33	1	1	0
12	3	5	2	34	1	2	1
13	1	3	2	35	3	1	-2
14	2	3	1	36	3	1	-2
15	1	1	0	37	2	2	0
16	1	1	0	38	4	3	-1
17	2	1	-1	39	5	3	-2
18	2	0	-2	40	1	0	-1
19	1	1	0	41	1	1	0
20	2	0	-2	42	4	1	-3
21	1	5	4	43	3	0	-3
22	1	2	1	44	3	2	-1

Tabla 19. Diferencia en el número de embriones de buena calidad entre el primer ciclo y el segundo. A la izquierda el grupo de "menos de seis meses" y a la derecha el grupo de "más de seis meses"

	Tiempo entre los ciclos	Estadístico	Error típ.	
Diferencia en la calidad embrionaria entre los ciclos	Menos de 6 meses	Media	,59	,454
		Mediana	,00	
		Varianza	4,539	
		Desv. típ.	2,130	
	Más de 6 meses	Media	-1,09	,451
		Mediana	-1,00	
		Varianza	4,468	
		Desv. típ.	2,114	

Tabla 20. Media y mediana de la diferencia en el número de embriones de buena calidad entre el primer y segundo ciclo

4.7 Embarazos

Se evaluó el número de embarazos en el grupo de “menos de seis meses” y se comparó con el número de embarazos en el grupo de “más de seis meses”.

4.7.1 Tasa de embarazo

En el grupo de “menos de seis meses”, hubo 3 embarazos (13,6%) y en el grupo de “más de seis meses” hubo 11 embarazos (50%). Existe una diferencia significativa en la tasa de embarazo en ambos grupos ($p < 0,05$), siendo esta mayor en el grupo de “más de seis meses” (Tabla 21).

			Tiempo entre los ciclos	
			Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Embarazos	si	Recuento	3	11
		%	13,6%	50,0%
	no	Recuento	19	11
		%	86,4%	50,0%

Tabla 21. Tasa de embarazo en los dos grupos de estudio

4.7.2 Tasa de gestación evolutiva

En el grupo de “menos de seis meses” hubo 2 embarazos evolutivos (9,1%) y en el grupo de “más de seis meses” hubo 5 embarazos evolutivos (22,7%). Sin embargo, la diferencia no es significativa. Los resultados se pueden observar en la tabla 22 y el la figura 7.

			Tiempo entre los ciclos	
			Menos de 6 meses	Más de seis meses
Embarazos evolutivos	si	Recuento	2	5
		%	9,1%	22,7%
	no	Recuento	20	17
		%	90,9%	77,3%

Tabla 22. Tasa de gestación evolutiva

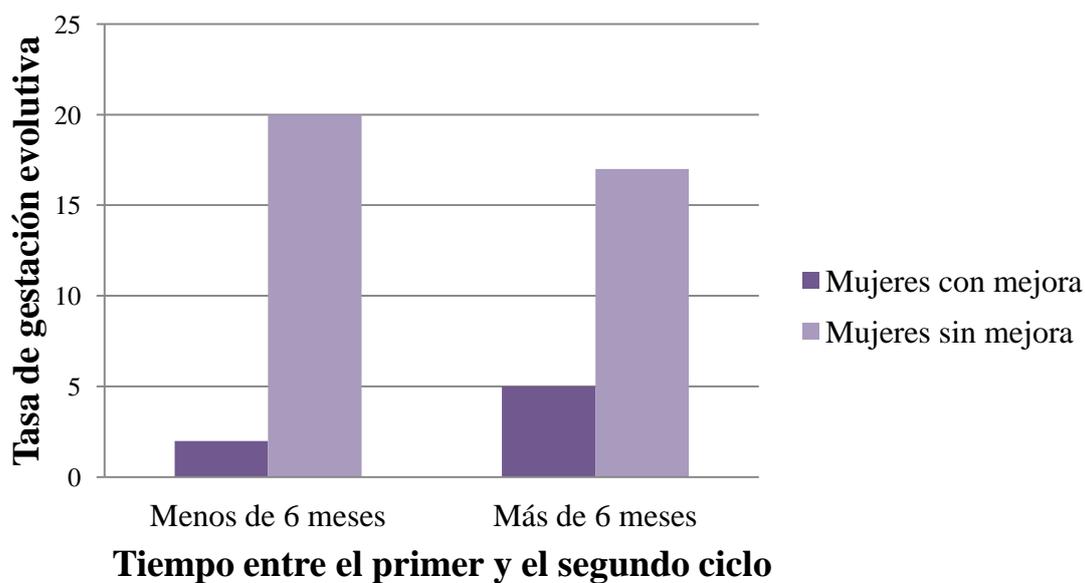


Figura 7. Tasa de gestación evolutiva en el grupo de "menos de seis meses" y en el grupo de "más de seis meses".

5 DISCUSION

La fertilización in vitro ha sido exitosa en un gran numero de parejas (Templeton, Morris & Parslow 1996; Engmann et al. 1999). Sin embargo, la mayoría de los pacientes infértiles necesitan más de un ciclo de FIV/ICSI para conseguir embarazo, lo cual resulta en repetidas estimulaciones del ovario (Luk, Arici 2010). El hecho de que un ciclo de FIV/ICSI no sea exitoso, lleva a una gran decepción de los pacientes infértiles. Sin embargo, tienen la esperanza de que el siguiente ciclo sea exitoso y ansían comenzar lo cuanto antes (Reichman et al. 2013).

En este trabajo se estudia si el tiempo transcurrido entre un ciclo de estimulación ovárica y el siguiente, tiene algún efecto sobre la respuesta ovárica y el resultado de FIV/ICSI o, por el contrario, el tiempo transcurrido entre los ciclos no tiene ningún efecto sobre estos parámetros.

Existen muy pocos estudios acerca del tiempo ideal que debe transcurrir entre dos tratamientos de Fecundación in Vitro. Uno de ellos (Reichman et al. 2013) evalúa si las pacientes que han tenido un ciclo de FIV fallido pueden proceder a otro ciclo después de esperar solo un ciclo menstrual o si es beneficioso esperar dos o más ciclos menstruales antes del procedimiento. Utilizan un protocolo de estimulación ovárica idéntico en todas las pacientes y establecen dos grupos de pacientes, unas que iniciaron el segundo ciclo después de esperar sólo un ciclo menstrual (35-55 días) y otras que esperaron dos o más ciclos menstruales (56-140 días). De esta manera el tiempo entre los ciclos no era tan largo como para asociarlo con un envejecimiento reproductivo significativo. No encontraron diferencias en el número de ovocitos recuperados, maduros y fertilizados, ni en la calidad embrionaria. Las tasas de implantación, embarazo y nacido vivo parecen ser mayores en el grupo de mujeres que esperan dos o más ciclos menstruales, pero las diferencias no son significativas. Por tanto concluyen que el tiempo transcurrido entre los ciclos de FIV, con la condición de que el tiempo no sea tan largo como para permitir un envejecimiento reproductivo significativo, no es un valor significativo para el éxito de la FIV.

Otro estudio (Silverberg et al. 1992), comparó ciclos consecutivos con ciclos alternos. Para la estimulación ovárica se utilizaba HMG, en el momento en que los

folículos tenían el tamaño adecuado se les administraba HCG a las pacientes y luego se les realizaba inseminación intrauterina o mantenían relaciones sexuales naturales. Hicieron dos grupos de mujeres, unas que se sometían al siguiente ciclo inmediatamente después de un test de embarazo negativo y otras que esperaban al menos un ciclo menstrual. Encontraron mayor tasa de embarazo en los ciclos consecutivos que en los alternos, por tanto, concluyen que los ciclos consecutivos con HMG pueden resultar en un aumento de la fecundidad comparado con los ciclos alternos de estimulación ovárica.

En otro estudio (Opsahl et al. 2001) se evalúa el tiempo entre los ciclos en donantes de ovocitos. Para ello dividieron el intervalo entre los ciclos en varios grupos: 2 meses, 3-4 meses, 5-12 meses y más de 12 meses. Encontraron que el intervalo entre los ciclos no afectaba a los días de estimulación, a la dosis de gonadotropinas requerida, al número de ovocitos maduros, a la tasa de fertilización, ni a las tasas de embarazo. Sin embargo, encontraron que cuando el intervalo entre los ciclos era superior a 12 meses se producían menos embriones, pero esto podría ser debido a que había pocos datos en ese grupo.

En otro estudio en donantes (Caligara et al. 2001) se evaluaron mujeres que se sometieron a su segundo ciclo de FIV/ICSI con un intervalo de menos de 90 días respecto al primero, y a su tercer ciclo con un intervalo de más de 90 días respecto al segundo. No encontraron un efecto negativo sobre la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados. No encontraron diferencias entre los ciclos en cuanto a ovocitos recuperados y tasas de fertilización, implantación y embarazo.

En mi trabajo se hacen dos grupos de pacientes, al primer grupo pertenecen las mujeres que se han sometido a dos ciclos entre los cuales transcurren menos de seis meses, mientras que al segundo grupo pertenecen las pacientes con un tiempo de más de seis meses entre los ciclos. Se hipotetiza que las mujeres en las que el tiempo entre el primer y el segundo ciclo es mayor de seis meses tendrán mejor respuesta ovárica que las mujeres en las que el tiempo transcurrido entre los ciclos es menor. Se espera peor respuesta cuando transcurre menos tiempo entre los ciclos debido a las posibles alteraciones producidas por la estimulación ovárica y la punción del ciclo anterior. Como se ha mencionado en la introducción, es posible que la punción folicular tenga un

efecto destructivo sobre los capilares y los folículos del ovario (Gobert et al. 1992; Luk, Arici 2010; de Boer et al. 2004).

En este trabajo se mide la respuesta ovárica en cuanto al número de ovocitos recuperados en la punción y la calidad de estos, centrándose el trabajo, sobre todo, en este último punto.

Los diferentes protocolos de estimulación ovárica podrían tener distinto efecto sobre la respuesta ovárica, sin embargo, en este estudio no se encuentran diferencias en el protocolo utilizado en los dos grupos estudiados. Tampoco se encuentran diferencias significativas en la edad de las mujeres ni en el número de embriones transferidos.

Para valorar la respuesta ovárica de las mujeres, se evaluó el número de ovocitos recuperados, el número de ovocitos maduros (MII) y la calidad de los ovocitos maduros tratados con ICSI.

No se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos recuperados, número de ovocitos maduros y calidad ovocitaria en el grupo de “menos de seis meses” comparado con el grupo de “más de seis meses”. Estos resultados coinciden con los de Reichman et al. (2013), que observaron que el intervalo de tiempo entre los ciclos no tiene ningún efecto sobre el número de ovocitos recuperados y el número de ovocitos maduros. Opsahl et al. (2001), realizando un estudio en donantes de ovocitos, tampoco encontraron diferencias en el número de ovocitos maduros cuando transcurrían diferentes intervalos de tiempo entre los ciclos de estimulación ovárica. Mis resultados también son similares a los de Caligara et al. (2001) que, realizando también un estudio en donantes, observaron que el intervalo de tiempo entre los ciclos no tenía ningún efecto adverso sobre la cantidad y la calidad de los ovocitos recuperados.

Una vez valorada la respuesta ovárica, se evaluó el posible efecto del intervalo de tiempo entre los ciclos sobre el resultado de la ICSI/FIV. Para ello se estudia el número de ovocitos fertilizados, el número de embriones en día 2, la calidad embrionaria y la tasa de embarazo.

No se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos fertilizados. Estos resultados coinciden con los de Reichman et al. (2013); Opsahl et al. (2001) y Caligara et al. (2001), que tampoco encontraron que el intervalo de tiempo entre los ciclos tuviera algún efecto sobre la tasa de fertilización.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de embriones en día 2 en los dos grupos de estudio. Sin embargo, se encuentran diferencias significativas en cuanto a la calidad embrionaria, ésta mejora en el 59,1% de las mujeres entre el primer y el segundo ciclo en el grupo de “menos de seis meses” y en el 36,4% de las mujeres pertenecientes al grupo de “más de seis meses”. Por tanto, el hecho de esperar un intervalo de tiempo mayor de seis meses entre los ciclos, podría tener un efecto negativo sobre la calidad embrionaria. Este resultado no coincide con el de Reichman et al. (2013), que no encontraron diferencias en la calidad embrionaria, sin embargo en su estudio el mayor intervalo de tiempo entre los ciclos es de 140 días (4,67 meses), que en mi estudio entraría dentro del grupo de “menos de seis meses”. En los demás estudios acerca del efecto del intervalo entre los ciclos (Opsahl et al. 2001; Caligara et al. 2001; Silverberg et al. 1992) no se evaluó la calidad embrionaria.

En cuanto a la tasa de embarazo, se encontró una tasa significativamente mayor en el grupo de “más de seis meses” (50%) que en el de “menos de seis meses” (13,6%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de gestación evolutiva en ambos grupos. Estos resultados coinciden con los de Reichman et al. (2013); Opsahl et al. (2001) y Caligara et al. (2001) que tampoco encontraron ningún efecto del intervalo entre los ciclos sobre la tasa de gestación evolutiva. Sin embargo, mis resultados no coinciden con los de Silverberg et al. (1992), en cuyo estudio se encontró mayor tasa de embarazo en los ciclos consecutivos. Sin embargo, en el estudio de Silverberg et al. (1992) se realizaba inseminación intrauterina o las pacientes tenían relaciones sexuales, mientras que en mi estudio se realizaba FIV convencional o ICSI.

En general, no se encuentra efecto del intervalo de tiempo entre los ciclos sobre la respuesta ovárica y el resultado de la FIV/ICSI, a excepción de la calidad embrionaria. Esto puede deberse a que el estudio fue realizado con un número pequeño de pacientes. Sin embargo, en el resto de estudios acerca del tiempo transcurrido entre los ciclos, los resultados son muy parecidos a los de mi estudio.

6 CONCLUSIÓN

El intervalo de tiempo entre los ciclos de estimulación ovárica no tiene ningún efecto sobre el número de ovocitos recuperados, el número de ovocitos en MII, la calidad ovocitaria, el número de ovocitos fertilizados, el número de embriones y la tasa de gestación evolutiva. Sin embargo, un intervalo de tiempo entre los ciclos de más de seis meses podría tener un efecto adverso sobre la calidad embrionaria.

Sería interesante realizar estudios orientados en esta línea con el fin de comprobar esta asociación que se observa en el presente estudio.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Balaban, B. & Urman, B. 2006, "Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation", *Reproductive biomedicine online*, vol. 12, no. 5, pp. 608-615.
- Balakier, H., Bouman, D., Sojecki, A., Librach, C. & Squire, J.A. 2002, "Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 9, pp. 2394-2401.
- Caligara, C., Navarro, J., Vargas, G., Simon, C., Pellicer, A. & Remohi, J. 2001, "The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 11, pp. 2320-2323.
- Cavagna, M., Paes de Almeida Ferreira Braga, D., Biaggioni Lopes, F., de Cassia Savio Figueira, R., Iaconelli, A., Jr & Borges, E., Jr 2011, "The effect of GnRH analogues for pituitary suppression on ovarian response in repeated ovarian stimulation cycles", *Archives of medical science : AMS*, vol. 7, no. 3, pp. 470-475.
- Chamayou, S., Ragolia, C., Alecci, C., Storaci, G., Maglia, E., Russo, E. & Guglielmino, A. 2006, "Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos", *Reproductive biomedicine online*, vol. 13, no. 5, pp. 661-667.
- Coticchio, G., Sereni, E., Serrao, L., Mazzone, S., Iadarola, I. & Borini, A. 2004, "What criteria for the definition of oocyte quality?", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1034, no. 1, pp. 132-144.
- Croucher, C.A., Lass, A., Margara, R. & Winston, R.M. 1998, "Predictive value of the results of a first in-vitro fertilization cycle on the outcome of subsequent cycles", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 13, no. 2, pp. 403-408.
- Cuaderno ASEBIR "Criterios de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos" in *Cuaderno de embriología clínica ASEBIR*.
- Daya, S. & Gunby, J. 1999, "Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 9, pp. 2207-2215.
- de Boer, E.J., Den Tonkelaar, I., Burger, C.W., Looman, C.W., van Leeuwen, F.E., te Velde, E.R. & OMEGA project group 2004, "The number of retrieved oocytes does not decrease during consecutive gonadotrophin-stimulated IVF cycles", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 19, no. 4, pp. 899-904.
- De Santis, L., Cino, I., Rabellotti, E., Calzi, F., Persico, P., Borini, A. & Coticchio, G. 2005, "Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality", *Reproductive biomedicine online*, vol. 11, no. 1, pp. 36-42.

- De Sutter, P., Dozortsev, D., Qian, C. & Dhont, M. 1996, "Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 11, no. 3, pp. 595-597.
- De Vries, M.J., De Sutter, P. & Dhont, M. 1999, "Prognostic factors in patients continuing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection treatment and dropouts", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 4, pp. 674-678.
- Dor, J., Seidman, D.S., Ben-Shlomo, I., Levrant, D., Ben-Rafael, Z. & Mashiach, S. 1996, "Cumulative pregnancy rate following in-vitro fertilization: the significance of age and infertility aetiology", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 11, no. 2, pp. 425-428.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Shebl, O., Jesacher, K. & Tews, G. 2005, "Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development", *Fertility and sterility*, vol. 83, no. 6, pp. 1635-1640.
- Ebner, T., Shebl, O., Moser, M., Sommergruber, M. & Tews, G. 2008, "Developmental fate of ovoid oocytes", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 1, pp. 62-66.
- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O. & Tews, G. 2000, "Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 2, pp. 427-430.
- Eichenlaub-Ritter, U., Schmiady, H., Kentenich, H. & Soewarto, D. 1995, "Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 10, no. 9, pp. 2343-2349.
- Engmann, L., Maconochie, N., Bekir, J.S., Jacobs, H.S. & Tan, S.L. 1999, "Cumulative probability of clinical pregnancy and live birth after a multiple cycle IVF package: a more realistic assessment of overall and age-specific success rates?", *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, vol. 106, no. 2, pp. 165-170.
- Gobert, B., Barbarino-Monnier, P., Guillet-May, F., Bene, M.C. & Faure, G.C. 1992, "Anti-ovary antibodies after attempts at human in vitro fertilization induced by follicular puncture rather than hormonal stimulation", *Journal of reproduction and fertility*, vol. 96, no. 1, pp. 213-218.
- Gougeon, A. 1998, "Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles", *Maturitas*, vol. 30, no. 2, pp. 137-142.
- Hassan-Ali, H., Hisham-Saleh, A., El-Gezeiry, D., Baghdady, I., Ismaeil, I. & Mandelbaum, J. 1998, "Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal

- gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 13, no. 12, pp. 3425-3430.
- Herrero, M., Feliu, P., Vives, C., Albaijes, G., Ballesteros, M., Planella, T., Vidal, F. & Saumell, I. 2011, "Impact of oocyte perivitelline space size in the embryo development and implantation rate", *Revista ASEBIR*, .
- Hoveyda, F., Engmann, L., Steele, J., Lopez, A. & Barlow, D.H. 2002, "Ovarian response in three consecutive in vitro fertilization cycles", *Fertility and sterility*, vol. 77, no. 4, pp. 706-710.
- Imthurn, B., Macas, E., Rosselli, M. & Keller, P.J. 1996, "Endocrinology: Nuclear maturity and oocyte morphology after stimulation with highly purified follicle stimulating hormone compared to human menopausal gonadotrophin", *Human Reproduction.*, vol. 11, no. 11, pp. 2387-2391.
- Kahraman, S., Yakin, K., Donmez, E., Samli, H., Bahce, M., Cengiz, G., Sertyel, S., Samli, M. & Imirzalioglu, N. 2000, "Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 11, pp. 2390-2393.
- Kolibianakis, E.M., Albano, C., Kahn, J., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A.C. & Devroey, P. 2003, "Exposure to high levels of luteinizing hormone and estradiol in the early follicular phase of gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles is associated with a reduced chance of pregnancy", *Fertility and sterility*, vol. 79, no. 4, pp. 873-880.
- Kolibianakis, E., Osmanagaoglu, K., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A. & Devroey, P. 2002, "Effect of repeated assisted reproductive technology cycles on ovarian response", *Fertility and sterility*, vol. 77, no. 5, pp. 967-970.
- Lasiene, K., Vitkus, A., Valanciute, A. & Lasys, V. 2009, "Morphological criteria of oocyte quality", *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, vol. 45, no. 7, pp. 509-515.
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S. & Michalas, S. 1999, "Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 2, pp. 240-244.
- Luk, J. & Arici, A. 2010, "Does the ovarian reserve decrease from repeated ovulation stimulations?", *Current opinion in obstetrics & gynecology*, vol. 22, no. 3, pp. 177-182.
- Meldrum, D.R., Silverberg, K.M., Bustillo, M. & Stokes, L. 1998, "Success rate with repeated cycles of in vitro fertilization-embryo transfer", *Fertility and sterility*, vol. 69, no. 6, pp. 1005-1009.

- Ochando, I. , ¿*Qué es un ovocito maduro?* / *Foro de Instituto Bernabeu* . Available: <http://www.institutobernabeu.com/foro/2013/12/16/que-es-un-ovocito-maduro/> [2014, 5/5/2014].
- Opsahl, M.S., Blauer, K.L., Black, S.H., Dorfmann, A., Sherins, R.J. & Schulman, J.D. 2001, "Pregnancy rates in sequential in vitro fertilization cycles by oocyte donors", *Obstetrics & Gynecology*, vol. 97, no. 2, pp. 201-204.
- Out, H.J., Mannaerts, B.M., Driessen, S.G. & Coelingh Bennink, H.J. 1996, "Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies", *Human reproduction update*, vol. 2, no. 2, pp. 162-171.
- Rashidi, B.H., Sarvi, F., Tehrani, E.S., Zayeri, F., Movahedin, M. & Khanafshar, N. 2005, "The effect of HMG and recombinant human FSH on oocyte quality: a randomized single-blind clinical trial", *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 120, no. 2, pp. 190-194.
- Reichman, D.E., Chung, P., Meyer, L., Greenwood, E., Davis, O. & Rosenwaks, Z. 2013, "Consecutive gonadotropin-releasing hormone-antagonist in vitro fertilization cycles: does the elapsed time interval between successive treatments affect outcomes?", *Fertility and sterility*, vol. 99, no. 5, pp. 1277-1282.
- Richardson, S.J., Senikas, V. & Nelson, J.F. 1987, "Follicular Depletion During the Menopausal Transition: Evidence for Accelerated Loss and Ultimate Exhaustion*", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 65, no. 6, pp. 1231-1237.
- Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K. & Greco, E. 2008, "Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome", *Fertility and sterility*, vol. 90, no. 5, pp. 1692-1700.
- Rienzi, L., Vajta, G. & Ubaldi, F. 2011, "Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature", *Human reproduction update*, vol. 17, no. 1, pp. 34-45.
- Roest, J., van Heusden, A.M., Mous, H., Zeilmaker, G.H. & Verhoeff, A. 1996, "The ovarian response as a predictor for successful in vitro fertilization treatment after the age of 40 years", *Fertility and sterility*, vol. 66, no. 6, pp. 969-973.
- Rosenbusch, B., Schneider, M., Glaser, B. & Brucker, C. 2002, "Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 9, pp. 2388-2393.
- Sá, R., Cremades, N., Silva, J., Oliveira, C., Barros, A. & Sousa, M. 2007, "Oocyte morfological quality. Importance for diagnosis, prognosis and therapeutical decisions", *Revista ASEBIR*, .

- Serhal, P.F., Ranieri, D.M., Kinis, A., Marchant, S., Davies, M. & Khadum, I.M. 1997, "Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection.", *Human Reproduction*, vol. 12, no. 6, pp. 1267-1270.
- Silverberg, K.M., Klein, N.A., Burns, W.N., Schenken, R.S. & Olive, D.L. 1992, "Consecutive versus alternating cycles of ovarian stimulation using human menopausal gonadotrophin", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 7, no. 7, pp. 940-944.
- Swain, J.E. & Pool, T.B. 2008, "ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization", *Human reproduction update*, vol. 14, no. 5, pp. 431-446.
- Tanbo, T., Dale, P.O., Kjekshus, E., Haug, E. & Abyholm, T. 1990, "Stimulation with human menopausal gonadotropin versus follicle-stimulating hormone after pituitary suppression in polycystic ovarian syndrome", *Fertility and sterility*, vol. 53, no. 5, pp. 798-803.
- Templeton, A., Morris, J.K. & Parslow, W. 1996, "Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment", *The Lancet*, vol. 348, no. 9039, pp. 1402-1406.
- Van Blerkom, J. 1990, "Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation", *Journal of electron microscopy technique*, vol. 16, no. 4, pp. 324-346.
- Van Blerkom, J. 1989, "The origin and detection of chromosomal abnormalities in meiotically mature human oocytes obtained from stimulated follicles and after failed fertilization in vitro", *Progress in clinical and biological research*, vol. 296, pp. 299-310.
- Van Blerkom, J. & Henry, G. 1988, "Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequences of perturbations in chromosomal organization and complement", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 3, no. 6, pp. 777-790.
- Van Soom, A., Vandaele, L., Goossens, K., de Kruif, A.t. & Peelman, L. 2007, "Gamete origin in relation to early embryo development", *Theriogenology*, vol. 68, pp. S131-S137.
- Verlinsky, Y., Lerner, S., Illkevitch, N., Kuznetsov, V., Kuznetsov, I., Cieslak, J. & Kuliev, A. 2003, "Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential?", *Reproductive biomedicine online*, vol. 7, no. 3, pp. 336-341.
- Zeleznik, A.J. 2004, "The physiology of follicle selection", *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 2, pp. 31.

Zeleznik, A.J., Wildt, L. & Schuler, H.M. 1980, "Characterization of Ovarian Folliculogenesis during the Luteal Phase of the Menstrual Cycle in Rhesus Monkeys Using [3H] Thymidine Autoradiography*", *Endocrinology*, vol. 107, no. 4, pp. 982-988.