
Título: ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LÍQUIDO FOLICULAR PARA OPTIMIZACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES.

Subtítulo: HORMONAS ESTEROIDEAS FOLICULARES COMO NUEVOS MARCADORES DE CALIDAD OVOCITARIA.

Doctorando: Nayara López Carpintero.

Lugar de presentación: Universidad Autónoma de Madrid.

Lugar de investigación: Hospital Universitario La Paz.

Directores: Onica Armijo Suárez.

José Ignacio Sánchez Méndez.

Título a que opta: Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Fecha de presentación: Septiembre de 2013.

A Rodrigo y a Claudia

AGRADECIMIENTOS:

A la Profesora Doctora Doña M^a Carmen Cuadrado Mangas por su ayuda en la iniciación de la investigación.

A la Doctora Onica Armijo Suárez, directora de la tesis, por su confianza en mí, su apoyo incondicional y si inestimable ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Al Doctor José Ignacio Sánchez Méndez por su impulso en la culminación de esta tesis.

A todo el Servicio de Esterilidad y Reproducción del Hospital la Paz por su inestimable ayuda en la inclusión de pacientes en el estudio y de recogida de las muestras.

A Carolina González Varela, bióloga del equipo de Reproducción, por su valiosa colaboración en el estudio.

A Rubén Gómez Rioja y al Servicio de Bioquímica del hospital la Paz por su colaboración desinteresada y su total disponibilidad en el análisis de las muestras.

Al Departamento de bioestadística del Hospital La Paz, y concretamente a Mariana por su colaboración imprescindible en el análisis y comprensión de los datos.

RESUMEN:

Introducción:

En las técnicas de reproducción asistida, el objetivo de alcanzar el mayor número de ovocitos posible ha sido sustituido por el de conseguir una cohorte de ovocitos y de embriones de buena calidad.

A pesar de la maduración ovocitaria nuclear, no todos los ovocitos son fecundados, por lo que deben existir otros factores implicados entre los que se postulan diversos componentes del líquido folicular como predictores bioquímicos de calidad ovocitaria, con el subsecuente potencial para una adecuada fecundación y desarrollo embrionario.

Hipótesis y objetivos:

Los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular se postulan como buenos indicadores de maduración ovocitaria, efecto que podría ampliarse al de mejor calidad embrionaria y mayores tasas de gestación.

Los objetivos del estudio son:

- Relacionar los niveles hormonales de esteroides de cada folículo individual con la madurez ovocitaria, la capacidad de fecundación, la calidad embrionaria y las tasas de embarazo y, por otra parte, relacionar dichos niveles hormonales con los resultados globales del ciclo de cada paciente.
- Establecer las diferencias de concentraciones de hormonas esteroideas en líquido folicular entre los distintos folículos de cada paciente y entre pacientes diferentes.

Material y Métodos:

Se incluyeron pacientes entre 25 y 38 años y con esterilidad tubárica, de origen desconocido o de causa masculina seguidas en las consultas de reproducción del Hospital La Paz e incluidas de forma consecutiva desde febrero 2011 hasta febrero 2013.

Se empleó exclusivamente un protocolo largo con agonistas de GnRH y rFSH.

Se obtuvo el líquido folicular procedente de la primera y segunda aspiración de cada ovario y se realizó un análisis hormonal mediante quimioinmunoanálisis de los niveles de estradiol, progesterona, testosterona y DHEA-S. El método de fecundación preestablecido fue la microinyección espermática.

De cada folículo individual, se evaluó la presencia de ovocito, la maduración meiótica, el tipo de fecundación, la calidad embrionaria y las tasas de gestación.

Dentro de los resultados globales del ciclo, se evaluaron la calidad ovocitaria global, el número de complejos puncionados, de ovocitos recuperados, de ovocitos maduros, de ovocitos degenerados y de embriones y también el número de embriones globales de las distintas calidades embrionarias, la tasa de gestación y de recién nacido vivo.

Resultados:

Se incluyeron 31 pacientes y 73 muestras de líquido folicular, de las que 59 contenían ovocito (81 %: 59/73) y el 19 % restante carecía del mismo (14/73).

El 64,4% (38/59) de los ovocitos fecundaron con normalidad y el 35,6% (21/59), presentaron una fecundación fallida. 21 embriones fueron transferidos y 10 criopreservados. Los 7 embriones restantes no evolucionaron.

El 35,5% (11/31) de las pacientes consiguieron una gestación siendo la tasa de recién nacido vivo del 22,5 % (7/31).

En las muestras foliculares sin ovocito, se observó una correlación positiva entre la testosterona y el estradiol ($r= 0,552$; $p = 0,041$) y entre la testosterona y la DHEA-S ($r= 0,644$; $p= 0,013$). En los líquidos foliculares con presencia de ovocito maduro, tanto en casos de fecundación normal como en fecundación fallida, se obtuvo una correlación positiva entre la testosterona y la progesterona folicular ($r=0,794$; $p= 0,0001$ y $r=0,829$; $p = 0,0001$).

Los niveles de estradiol, progesterona, testosterona y DHEA-S fueron superiores en casos de fecundación normal frente a fecundación fallida. La asociación alcanzó la significación estadística en el caso de la progesterona ($p = 0,003$).

En los resultados globales del ciclo, se obtuvo una correlación negativa entre las cifras de testosterona y el número de complejos puncionados ($r = -0,360$; $p = 0,002$). Una correlación negativa se estableció también entre la testosterona y el número de embriones de calidad D ($r = -0,233$; $p = 0,047$). El número de ovocitos maduros fue menor en folículos con mayores niveles de testosterona folicular ($p = 0,008$).

La progesterona folicular fue superior en pacientes con ovocitos de buena calidad global frente a los de calidad no destacable ($p = 0,006$) y a los de muy mala calidad ovocitaria ($p = 0,04$).

Los embriones de calidad B presentaron cifras superiores de estradiol que los de calidad C ($p = 0,01$).

Los niveles de estradiol fueron superiores en las pacientes que consiguieron una gestación ($p = 0,02$).

La variación entre los distintos folículos de una misma paciente en los niveles de estradiol fue aproximadamente el doble que la variación entre sujetos ($p = 0,05$). En el caso de la progesterona y de la testosterona, la variación intra-sujeto fue similar a la variación entre sujetos ($p = 0,006$, $p = 0,002$). Y, la variación intra-sujeto en los niveles de DHEA-S fue aproximadamente un tercio de la variación entre sujetos ($p = 0,0003$).

Conclusiones:

Las cifras de progesterona folicular fueron superiores en casos de fecundación normal, existiendo una correlación positiva entre las cifras de testosterona y de progesterona. Los embriones de tipo B y los casos de gestación se dieron entre los líquidos foliculares ricos en estradiol. El análisis de la composición hormonal folicular podría considerarse en un futuro como una nueva herramienta en la selección de embriones a transferir.

DESCRIPTORES: estradiol, progesterona, andrógenos, Fertilización In Vitro y embarazo.

ABSTRACT

Introduction:

In assisted reproduction techniques, the goal has switched from reaching the biggest number of oocytes to achieve an oocytes and embryos cohort of good quality.

Despite oocyte nuclear maturation, not all oocytes are fertilized, so there must be others factors implied. Among them, diverse components of the follicular liquid have been postulated as biochemical predictors of oocyte quality, thus with potential for an adequate fertilization and embryonic development.

Hypothesis y objectives:

Steroid hormones levels have been postulated as good indicators of oocyte maturation, this effect could also be extended to better embryo quality and bigger gestation rates.

The objectives of the study are:

- Linking steroid hormone levels of each individual follicle with oocyte maturation, fertilization capacity, embryo quality and pregnancy rates and, moreover, relate these hormone levels with the overall results of each patient cycle.
- Set differences in steroid hormone concentrations in follicular fluid interpatient and between follicles.

Methods:

Patients aged between 25 and 38 years old, with tubal infertility of unknown origin or infertility of male cause, followed in La Paz Hospital reproduction service were included consecutively from February 2011 to February 2013.

It was used a long protocol exclusively with GnRH agonists and rFSH.

Follicular fluid was obtained from the first and second aspiration of each ovary hormonal and the analysis was performed by immunoassay. Preset fertilization method was intracytoplasmic sperm injection.

From each individual follicle, it was assessed oocyte presence, meiotic maturation, fertilization type, embryo quality and pregnancy rates.

Within the overall results of the cycle, it was assessed the global cycle egg quality, the number of punctured complexes, the number of oocytes retrieved, of mature oocytes, of degenerate oocytes, of embryos and also the overall number of embryos of different embryonic qualities.

Results:

31 patients and 73 follicular fluid samples were included, 59 of them contained oocyte (81%: 59/73), the remaining 19% lacked it (14/73).

64,4% (38/59) of oocytes experimented normal fertilization and 35,6% (21/59) a failed fertilization. 21 embryos were transferred and 10 cryopreserved.

35,5% (11/31) of patients achieved a pregnancy and the live birth rate was 22,5% (7/31).

In follicular samples without oocyte, we observed a positive correlation between testosterone and estradiol ($r = 0,552$, $p = 0,041$) and between testosterone and DHEA-S ($r = 0,644$, $p = 0,013$). In the follicular fluid with presence of mature oocyte, both in cases of normal and failed fertilization, we obtained a positive correlation between testosterone and progesterone follicular ($r = 0,794$, $p = 0,0001$ and $r = 0,829$, $p = 0,0001$).

The levels of estradiol, progesterone, testosterone and DHEAS were higher in cases of normal fertilization as compared to those with failed fertilization. The association reached statistical significance in the case of progesterone ($p = 0,003$).

In the overall results of the cycle, we obtained a negative correlation between testosterone levels and the number of punctured complexes ($r = -0,360$, $P = 0,002$). A negative correlation was also established between testosterone and the number of quality embryos D ($r = -0,233$, $p = 0,047$). The number of mature oocytes was lower in follicles with higher follicular testosterone levels ($p = 0,008$).

Follicular progesterone was higher in good quality oocytes compared to those with not remarkable quality ($p = 0,006$) or very poor oocyte quality ($p = 0,04$).

B quality embryos showed higher estradiol values than C quality embryos ($p = 0,01$).

Estradiol levels were higher in patients who achieved a pregnancy ($p=0,02$).

Intra-subject variation in estradiol levels was approximately double than the variation between subjects ($p = 0,05$). In progesterone and testosterone case, the variation within subjects was similar to variation between subjects ($p = 0,006$, $p = 0,002$). And, the intra-subject variation in the levels of DHEAS was about a third of the variation between subjects ($p = 0,0003$).

Conclusions:

The levels of follicular progesterone were higher in cases of normal fertilization, in this cases a positive correlation between testosterone and progesterone levels was also found. B type embryos and gestation cases appeared in environments with high estradiol levels. The analysis of the hormonal follicular composition can be consider a new tool in the selection of embryos for transference.

DESCRIPTORS: estradiol, progesterone, androgens, Fertilization In Vitro, pregnancy.

ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LÍQUIDO FOLICULAR PARA OPTIMIZACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES.

- ❖ Lista de ilustraciones.
- ❖ Lista de tablas.
- ❖ Abreviaciones y símbolos.
- ❖ Introducción.
 1. Antecedentes y estado actual del problema.
 2. Perfil hormonal de secreción.
 3. Regulación del ciclo ovárico.
 4. Calidad ovocitaria.
 5. Calidad embrionaria.
 6. Mecanismo de acción de los andrógenos.
 7. Suplemento androgénico.
- ❖ Hipótesis y objetivos.
- ❖ Métodos.
 1. Sujetos. Selección y descripción de las participantes.
 2. Estimulación ovárica, inducción de la ovulación y apoyo de la fase lútea.
 3. Medida del tamaño folicular y recogida del ovocito.
 4. Análisis de hormonas en líquido folicular.
 5. Recuperación espermática.
 6. Ovocito y evaluación de la fecundación.
 7. Técnica de ICSI.
 8. Calidad embrionaria.
 9. Transferencia embrionaria.
 10. Vitricación embrionaria.
 11. Resultados reproductivos globales del ciclo.
 12. Tasas de embarazo.
 13. Ética y legislación vigente.
 14. Análisis estadístico.
- ❖ Resultados.
- ❖ Discusión.

- ❖ Conclusiones.
- ❖ Referencias.
- ❖ ANEXO A. Consentimiento informado de microinyección espermática.
- ❖ ANEXO B. Consentimiento informado específico del estudio.
- ❖ ANEXO C. Informe de la comisión de investigación.
- ❖ ANEXO D. Informe del comité ético.

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Biosíntesis de hormonas esteroideas	31
Ilustración 2. Función de biosíntesis hormonal por las células de la granulosa y de la teca	32
Ilustración 3. Esquema ovocitario	45
Ilustración 4. Organelas agrupadas en el centro del ovocito	50
Ilustración 5. Agregación de retículo endoplasmático liso	50
Ilustración 6. Existencia de vacuola	50
Ilustración 7. Número de células	58
Ilustración 8. Ritmo de división	58
Ilustración 9. Fragmentación aproximada del 10 %	59
Ilustración 10. Fragmentación superior al 35%	59
Ilustración 11. Existencia de vacuolas	61
Ilustración 12. Calidades embrionarias según la clasificación embrionaria ASEBIR 2007	64
Ilustración 13. Clasificación de calidad embrionaria en día +2 y día+3 según criterios de ASEBIR	64
Ilustración 14. Clasificación de calidad embrionaria en día+2 y día+3 según criterios de ASEBIR	65
Ilustración 15. Calidad embrionaria categoría A en día +2 y día+3	66
Ilustración 16. Calidad embrionaria categoría B en día+2 y día+3	66
Ilustración 17. Calidad embrionaria categoría C en día+2 y día+3	67
Ilustración 18. Calidad embrionaria categoría D en día+2 y día+3	67
Ilustración 19. Punción folicular ecoguiada	85
Ilustración 20. Clasificación ovocitaria	89
Ilustración 21. Tipos de fecundación	90
Ilustración 22. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides en el interior del óvulo	90
Ilustración 23. Distribución de la muestra por edad	99
Ilustración 24. Distribución de la muestra según el recuento de folículos antrales	100
Ilustración 25. Distribución de la muestra según el tipo de esterilidad	100

Ilustración 26. Distribución de la muestra según el recuento de espermatozoides móviles	101
Ilustración 27. Distribución de muestras según presencia o no de ovocito y tipo de fecundación	103
Ilustración 28. Relación entre los niveles hormonales de dheas en líquido Folicular y las cifras séricas de hormona antimulleriana	108
Ilustración 29. Relación entre las cifras séricas de FSH y los ratios de estradiol/progesterona y de estradiol/testosterona en líquido folicular	109
Ilustración 30. Relación entre los niveles hormonales de testosterona y el ratio estradiol/testosterona en líquido folicular y el recuento de folículos antrales	110
Ilustración 31. Relación entre los niveles hormonales en líquido folicular y los resultados globales del ciclo	113
Ilustración 32. Correlación entre los distintos niveles hormonales en líquido folicular entre sí en ausencia de ovocito	121
Ilustración 33. Correlación entre la progesterona y la testosterona folicular en casos de ovocito con fecundación normal	122
Ilustración 34. Correlación entre la progesterona y la testosterona folicular en casos de ovocito con fecundación fallida	122
Ilustración 35. Valoración de hormonas esteroideas intrasujeto	136
Ilustración 36. Variabilidad de los niveles de estradiol intra-sujeto y entre sujetos	139
Ilustración 37. Variabilidad de los niveles de progesterona intra-sujeto y entre sujetos	141
Ilustración 38. Variabilidad de los niveles de testosterona intra-sujeto y entre sujetos	142
Ilustración 39. Variabilidad de los niveles de DHEAS intra-sujeto y entre sujetos	143

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos cuantitativos de reserva ovárica de la muestra	101
Tabla 2. Descripción de las características del ciclo de estimulación	102
Tabla 3. Niveles hormonales en líquido folicular	104
Tabla 4. Respuesta global por paciente del ciclo de estimulación	105
Tabla 5. Calidad embrionaria global de la muestra	105
Tabla 6. Niveles hormonales en líquido folicular y parámetros cuantitativos de reserva ovárica	107
Tabla 7. Niveles hormonales en líquido folicular y resultados 8 globales del ciclo	112
Tabla 8. Hormonas en líquido folicular y número de ovocitos maduros	116
Tabla 9. LH sérica y andrógenos foliculares	117
Tabla 10. Relación entre niveles hormonales y diversas características del ciclo	118
Tabla 11. Correlación hormonal folicular según la presencia de ovocito y el tipo de fecundación	120
Tabla 12. Niveles hormonales procedentes de folículos con y sin ovocito	123
Tabla 13. Características del ciclo y tipo de fecundación	124
Tabla 14. Diferencias en hormonas foliculares según fecundación normal o fallida	125
Tabla 15. Niveles hormonales en líquido folicular y calidad ovocitaria global	126
Tabla 16. Relación entre las hormonas en líquido folicular y la calidad embrionaria	127
Tabla 17. Relación entre las hormonas en líquido folicular y la calidad embrionaria de los embriones transferidos o criopreservados	128
Tabla 18. Diferencias en los niveles hormonales entre embriones transferidos o no y criopreservados o no	131
Tabla 19. Diferencias en niveles hormonales en casos de gestación y no gestación	132

Tabla 20. Diferencias hormonales entre los casos de aborto y gestación evolutiva	133
Tabla 21. Diferencias en los niveles hormonales intra-sujeto	135

ABREVIATURAS:

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALFA-FP: alfa- fetoproteína

AMH: hormona antimulleriana

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

BCB: *brilliant cresyl blue* (azul de cresol brillante)

BFGF: *basic fibroblast growth factor* (factor de crecimiento básico de fibroblastos)

BMP: *bone morphogenetic proteins* (proteínas morfogenéticas del hueso)

CA 125: *cancer antigen* (antígeno cancerígeno)

CDC: *Center for Diseases Control* (Centros para el control y prevención de enfermedades).

CEA: *carcinoembryonic antigen* (antígeno carcinoembrionario)

CYP 19: citocromo 19 de la familia de citocromo p450

DHEA: dehidroepiandrosterona

DHEAS: dehidroepiandrosterona sulfato

DHT: dihidrotestosterona

EGF: *Epidermal Grow Factor* (factor de crecimiento epidérmico)

FIV: fecundación *in vitro*

FSH: *follicle stimulating hormone* (hormona folículo-estimulante; Folitropina)

FSHr: *recombinant follicle stimulating hormone* (hormona folículo-estimulante recombinante)

GAP: *gap union* (unión en hendidura)

GDF: *growth differentiation factor* (factor de crecimiento y diferenciación)

GH: *growth hormone* (hormona de crecimiento)

GnRH: *gonadotropin releasing hormone* (hormona liberadora de gonadotropinas)

hCG: *human chorionic gonadotropin* (gonadotropina coriónica humana)

hMG: *human menopausal gonadotropin* (gonadotropina menopáusica humana)

ICSI: *intracytoplasmic sperm injection* (inyección intracitoplasmática de espermatozoides)

IGF: *insulin-like growth factor* (factor de crecimiento insulínico)

IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein* (proteína de unión al factor de crecimiento insulínico)

LH: *luteinizing hormone* (hormona luteinizante; Lutropina)

LHr: *recombinant luteinizing hormone* (hormona luteinizante recombinante)

MAPK: *mitogen-activated protein kinase* (protein-kinasa activada por mitógenos)

MPF: *maturation promoting factor* (factor promotor de la maduración)

PVP: polivinil pirrolidona

REM: Recuento de espermatozoides móviles.

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno)

SOP: síndrome de ovarios poliquísticos

TGF: *transforming growth factor* (factor de crecimiento transformante)

TNF-alpha: *tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral)

VEGF: *vascular endothelial growth factor* (factor de crecimiento endotelial vascular)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La infertilidad afecta al 12-15% de parejas en todo el mundo. Desde el primer tratamiento de reproducción asistida exitoso en 1978 llevado a cabo por *Steptoe y Edwards*, el uso de estas técnicas se ha incrementado de modo exponencial y actualmente suponen el 1-3 % de nacimientos anuales (1). La primera fecundación *in vitro* (FIV) se llevó a cabo en un ciclo natural espontáneo, pero el uso de estos ciclos fue muy pronto sustituido por protocolos de estimulación ovárica (2) en un intento de optimizar los resultados obteniendo más folículos por ciclo y llevando a cabo una selección de embriones a transferir (3).

De entre las técnicas de reproducción asistida, hoy por hoy la microinyección espermática (ICSI) es generosamente aplicada en todas las partes del mundo para una variedad de indicaciones y no exclusivamente para infertilidad por factor masculino como se planteó en sus inicios (4).

La fecundación asistida, y particularmente la ICSI, ha descendido el ratio entre los gametos a 1:1, donde cada espermatozoide individual se une con un ovocito, sentando el camino para el entendimiento de la interacción entre los dos gametos (4).

A raíz de la ICSI, se desencadenó el interés científico por el estudio tanto del espermatozoide como del ovocito de forma aislada. La microinyección espermática permite precisar el momento de la fecundación del ovocito y apreciar la importancia de la sincronización entre la maduración nuclear y citoplasmática (5). En los protocolos de ICSI estándares, las células del cúmulo y de la corona radiada son separadas del ovocito, permitiendo la identificación morfológica total de los ovocitos en varias etapas de la maduración meiótica, desde la etapa de vesícula germinal, a través de metafase I hasta metafase II (6).

En este contexto, la selección de espermatozoides y de ovocitos de buena calidad posibilitada por la ICSI se hace prioritaria. Se acepta mayoritariamente que el desarrollo embrionario está ampliamente dictado por la calidad del ovocito con resultados de una buena tasa de implantación (7). De ahí que la calidad ovocitaria sea un tema de interés creciente.

Sin embargo, la calidad ovocitaria determinada sólo por la morfología del ovocito presenta diversas limitaciones y hace necesaria la búsqueda de nuevas herramientas adicionales que podrían jugar un papel fundamental en la selección de los mejores embriones. Es entre estas herramientas entre las que se encuentran diversos marcadores bioquímicos del líquido folicular.

1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA:

En las técnicas de reproducción asistida es necesario realizar una hiperestimulación ovárica controlada con el fin de generar múltiples ovocitos en un determinado ciclo intentando asegurar así el éxito del proceso. En los últimos años, este concepto de intentar alcanzar el mayor número de ovocitos posible ha sido sustituido por el de buscar obtener una cohorte de embriones de buena calidad (8).

Durante la inducción de la ovulación en reproducción asistida, la concentración de estradiol sérico y el tamaño folicular son los parámetros rutinarios usados para monitorizar el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria (9, 10, 11, 12).

A pesar de la maduración ovocitaria nuclear, no todos los ovocitos son fecundados, por lo que deben existir otros factores implicados. El líquido folicular se postula como uno de ellos representando una posible fuente de predicción bioquímica de calidad ovocitaria, con el subsecuente potencial para conseguir fecundación y desarrollo embrionario.

La mayor parte de la comunidad científica acepta la relevancia e implicación de la calidad ovocitaria en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en que la calidad ovocitaria morfológica sea un parámetro que posteriormente modifique la calidad embrionaria ni las tasas de gestación. *Balaban y cols* concluyen que no existen diferencias en tasas de embarazo ni en tasas de implantación entre ovocitos normales y anormales morfológicamente tras el estudio de 5 903 metafases II clasificadas en función de sus alteraciones y realizando ICSI en todos los casos(13).

Durante el tratamiento con gonadotropinas para la hiperestimulación ovárica controlada, la composición del líquido folicular muestra cambios dinámicos en las células del folículo ovárico, por secreción de diferentes hormonas, factores de crecimiento y citocinas que pueden influir en el desarrollo y viabilidad ovocitaria(14). Los esteroides del líquido folicular son producidos por células de la granulosa y de la teca bajo el control de las gonadotropinas, y el microambiente hormonal puede ser de cierta relevancia en el desarrollo pre-ovulatorio del folículo, la calidad ovocitaria y los resultados de FIV(15).

El uso de estimulación ovárica induce cambios en el líquido folicular y en la expresión génica de las células del cúmulo que pueden afectar a procesos inmunológicos, a la meiosis y al proceso de ovulación(1).

El estradiol, la progesterona y la testosterona son los principales esteroides que juegan un papel esencial durante la fase folicular y lútea del ciclo ovárico. Además hay otras citocinas (inhibinas, activinas, factor de crecimiento insulínico-2 (IGF-2), proteína de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBP), factor de necrosis tumoral B (TNF-B), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)) que también se han correlacionado con la maduración ovocitaria (16, 17, 18, 19).

Son muchos los constituyentes químicos estudiados del líquido folicular. Éstos se pueden agrupar en las siguientes categorías: superfamilia de los TGF tipo B (factor de crecimiento transformante tipo B), otros factores de crecimiento e interleukinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), factores anti-apoptóticos, proteínas, péptidos y aminoácidos, azúcares y prostaglandinas y hormonas(20).

En la superfamilia del factor de crecimiento TGF-B, se ha buscado la asociación entre la inhibina y la activina, la hormona antimulleriana (AMH) y el BMP-15 (proteína morfogenética del hueso-15), y la calidad ovocitaria sin que ninguno de ellos pueda considerarse como marcador claro de dicha calidad ovocitaria. Son necesarias más investigaciones al respecto (20).

El IGF-II, IGFBP-3 e IGFBP-4 intrafoliculares se han correlacionado con la fecundación ovocitaria y con el desarrollo embrionario en día+3 (21). El IGF-I y IGFBP-I en líquido folicular se han asociado con la calidad y la maduración ovocitaria(22). Son precisos más trabajos para establecer la utilidad de estos factores como biomarcadores no invasivos de calidad ovocitaria (20). Otros factores de crecimiento como el TNF-alpha, el EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (BFGF) en líquido folicular no han logrado establecerse aún como marcadores de calidad ovocitaria(20).

En cuanto a las interleukinas intrafoliculares, es la interleukina-1beta la que se ha correlacionado positivamente con la maduración citoplasmática y la fecundación normal, pero sin hallar correlación con el desarrollo embrionario(23). Los niveles

de interleukinas-1 alpha, 2 y 10, y el leucotrieno B4 intrafoliculares no se han logrado relacionar de modo significativo con los resultados de FIV (24, 25); y la IL-12 se ha relacionado con embriones altamente fragmentados.

El impacto del estrés oxidativo en la maduración ovocitaria parece ser deletéreo, aunque su papel exacto no está totalmente clarificado existiendo resultados conflictivos(20). Un balance óptimo entre la capacidad oxidativa del ovocito y los antioxidantes parece crítico para permitir la formación normal del huso meiótico y el correcto alineamiento de los cromosomas. La capacidad antioxidante total del líquido folicular es un marcador medible de actividad antioxidante y sus niveles altos podrían ser un marcador de folículos maduros que conducen al crecimiento de ovocitos de alta calidad(20). Un exceso de producción de óxido nítrico en el microambiente que rodea al ovocito podría conducir a la apoptosis en el folículo afectando al desarrollo ovocitario. Las concentraciones de nitritos/nitratos intrafoliculares podrían eventualmente ser usados como marcadores negativos de calidad ovocitaria(20).

Las cifras de VEGF en líquido folicular aparecen también como marcadores negativos de calidad ovocitaria(26).

El sFas, como factor antiapoptótico, no es un marcador válido de calidad ovocitaria(20).

El análisis de la composición proteica del líquido folicular (proteómica) permitiría identificar moléculas que podrían ser usadas como marcadores de buen desarrollo folicular para optimizar el proceso de selección ovocitaria. Se han evaluado en este contexto la alpha-fetoproteína (α -FP), el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno cancerígeno 125 (Ca-125), el antígeno CD44, la alpha-I-antitripsina, la leptina, la endotelina-2, el inhibidor de maduración ovocitaria, la homocisteína, la beta-endorfina, la lactoferrina, la angiotensina-II, la prorenina, y aminoácidos como alanina, glicina y ácido aspártico. Sin embargo, globalmente el entendimiento general sobre las proteínas y su papel en el crecimiento folicular y en la maduración ovocitaria es todavía bastante limitado(20).

Azúcares como el ácido hialurónico y el mioinositol, y diversas prostaglandinas (F2alpha y E2) también han intentado relacionarse con la maduración ovocitaria.

La corta vida media y las importantes variaciones en líquido folicular de las prostaglandinas hacen difícil que puedan ser usados como predictores de calidad ovocitaria en la práctica clínica(20).

Dentro de las hormonas estudiadas en este marco, son las gonadotropinas, la hormona de crecimiento (GH), la prolactina, los estrógenos, la progesterona, los andrógenos y los corticoides los que se han relacionado con la calidad ovocitaria(20).

Altas concentraciones de FSH (hormona foliculoestimulante), hCG (gonadotropina coriónica humana) y LH (hormona luteinizante) en líquido folicular promueven la maduración ovocitaria y se han asociado con ovocitos con tasas mayores de fecundación(14, 27, 28, 29). Las gonadotropinas actúan sinérgicamente con el estradiol para alcanzar la maduración citoplasmática y el control de la meiosis ovocitaria(20). La GH potencia la producción de estrógenos FSH dependiente por las células de la granulosa y la formación de receptores de FSH y LH en estas células(30). Sin embargo, una clara asociación entre las cifras de GH intrafoliculares y las tasas de embarazo no ha sido hallada(20). Tampoco la prolactina intrafolicular puede considerarse un marcador válido de calidad ovocitaria(20). Los corticoides se han considerado importantes para alcanzar la maduración ovocitaria y la implantación embrionaria por varios autores(31).

Concretamente el estudio de las hormonas esteroideas en líquido folicular es un campo de actual controversia. Existe un interés creciente sobre si hay o no diferencias en la concentración de las mismas en los folículos que producen un ovocito sano y los que producen un ovocito incapaz de ser fecundado, existiendo trabajos con resultados dispares.

El contenido de esteroides en el líquido folicular humano de ciclos normales y estimulados se correlaciona con el crecimiento y la morfología folicular y las tasas de fecundación de ovocitos humanos(32, 33, 34, 35).

Aunque hay determinados autores que defienden que el nivel absoluto de esteroides se asocia con el tamaño folicular y no con la maduración ovocitaria (36), muchos estudios, sin embargo, han sugerido que los niveles en líquido folicular pre-ovulatorio luteinizado de progesterona, estradiol y testosterona, incluso el

ratio estradiol/progesterona, es mejor indicador de maduración ovocitaria que el tamaño folicular sólo (23, 28, 37, 38).

La mayoría de los autores que defienden diferencias hormonales en líquido folicular según madurez ovocitaria aportan resultados con niveles mayores de estradiol y progesterona en folículos de los que se obtiene un ovocito que será fecundado (23, 28, 34, 37, 38). *Mendoza* y cols demuestran que los ovocitos que son fecundados proceden de folículos con mayor concentración de progesterona (23). *Ellsworth* relaciona también la maduración ovocitaria con las mayores concentraciones de progesterona (28). Y *Artini* y cols hayan mayor concentración de estradiol en los ovocitos maduros (37).

Sin embargo, varios autores muestran datos con niveles inferiores de andrógenos (testosterona, androstendiona) en estos ovocitos maduros (28, 36).

Es aceptado que un ambiente intrafolicular predominantemente estrogénico se asocia con buen crecimiento folicular y tiene efectos anti-atresia. Además, el estradiol potencia la maduración citoplasmática de los ovocitos vía directa no-genómica a nivel de la membrana plasmática, induciendo la entrada a la célula de calcio extracelular y aportando un patrón específico de oscilaciones de calcio(39). La concentración de estradiol intrafolicular hallada es menor en folículos que producen un ovocito que degenera o uno en el que falla la fecundación. El descenso en la producción de esteroides por las células de la granulosa sugiere que estas células fallan a pesar de una estimulación suprafisiológica gonadotrópica. Esto es consistente con atresia de tipo B, a través de la cual la desaparición de las células de la granulosa precede a la del ovocito(40). Así surgiría la duda de si esta diferencia se debe a algo inherente al folículo, dentro del propio ovocito o entre pacientes. Los folículos de una misma paciente pueden producir ovocitos diferentes en fecundación y en capacidad de desarrollo.

La elevación del estradiol y del ratio estradiol/progesterona en líquido folicular indica un estadio más avanzado de maduración ovocitaria y se ha encontrado repetidamente la asociación con una mayor posibilidad de conseguir un embarazo(33, 34, 37, 39, 41, 42, 43, 44). Esta observación, sin embargo, no ha sido confirmada por otros estudios(29, 45, 46, 47).

Existe también conflicto de evidencias revisando los niveles de progesterona en líquido folicular. Varios autores encuentran que altas concentraciones de progesterona (o baja ratio estradiol/progesterona) son predictivas de subsecuente implantación y embarazo(48, 49, 50, 51). Podría ser considerado como un reflejo de la luteinización folicular progresiva y de la reducción de la actividad aromataasa unida al alcance de la maduración ovocitaria final. Por otro lado, sin embargo, los ovocitos de folículos con mayores niveles de progesterona han sido asociados con ovocitos post-maduros que fecundan anormalmente y dan lugar a embriones multipronucleares(52). Parece que mientras una exposición óptima a progesterona tiene un efecto positivo sobre las características ovocitarias, una excesiva exposición conduciría a un rápido empeoramiento de la calidad celular. Un claro conocimiento del umbral en el que la progesterona comienza a dañar el ovocito no se tiene actualmente.

Niveles elevados de andrógenos (testosterona) se han asociado con baja calidad ovocitaria, y en particular con ovocitos que muestran una tendencia a menores tasas de éxito tras la fecundación(35). El ratio estradiol/testosterona ha sido también hallado mayor en folículos que se asocian con gestación posterior(53, 54). Todo ello podría indicar que una baja ratio estradiol/testosterona en líquido folicular puede asociarse con atresia folicular temprana y con efectos negativos en la viabilidad del ovocito, pudiendo limitar la posibilidad de fecundación y embarazo. De hecho, el concepto de que el ambiente androgénico folicular predominante puede conducir a atresia folicular es bien aceptado, pero al mismo tiempo, es profundamente aceptado que una cierta cantidad de andrógenos foliculares son necesarios para obtener un crecimiento folicular óptimo. De hecho, en ciclos de FIV con respuesta ovárica insuficiente a FSH, se añade LH (lo que estimula la síntesis de andrógenos por células de la teca) encontrándose mejoría en el crecimiento folicular y la maduración ovocitaria(55, 56). En ciclos estimulados los niveles de testosterona son mayores que en ciclos no estimulados (1).

A pesar de que poco se conoce sobre los niveles de DHEA y DHEAS en líquido folicular y de cómo se relacionan con los resultados de fecundación y embarazo, sólo algunos estudios abordan el tema. Éstos muestran la utilización de DHEAS por

células de la granulosa vía sulfatasa en la producción de estrógenos y andrógenos(57, 58). La DHEA del líquido folicular contribuye a la esteroidogénesis en los folículos preovulatorios en el escenario de estimulación ovárica, como se sugiere por su correlación con la testosterona y los estrógenos intrafoliculares. La misma correlación se mantiene tanto cuando se analizan folículos individuales como cuando se analiza la concentración folicular media de estas hormonas en cada sujeto. A pesar de que la DHEA folicular se correlaciona con los niveles de estradiol y testosterona, se correlaciona negativamente con la calidad ovocitaria y embrionaria (estado de maduración ovocitario, tasa de fecundación y número de embriones viables)(59). La DHEA se postula como un predictor más potente de los resultados de FIV que los niveles de testosterona o estrógenos (59). Esta asociación negativa podría ser atribuida a su papel como precursor en la esteroidogénesis o a un efecto directo desconocido. Una posible vía de acción sería a través de los glucocorticoides (60). Niveles elevados de DHEA y DHEAS se han asociado con niveles altos de cortisol que pueden directamente inhibir la esteroidogénesis (61). Las cifras altas de cortisol intrafolicular se han asociado con resultados negativos de FIV(57, 61). Sin embargo, la suplementación con DHEA oral se ha postulado como agente de mejora de los resultados de FIV(62).

Lamb y cols publican un artículo en 2010 en el que demuestran, no sólo un nivel de estrógenos y de progesterona en líquido folicular menor sino también niveles de testosterona inferiores en aquellos folículos que producen un ovocito que degenera, a pesar de niveles de gonadotropinas similares, con respecto a aquellos casos en los que el ovocito es fecundado (16, 63). Postulan así que el perfil hormonal del líquido folicular que rodea un ovocito que degenera o falla en la fecundación con ICSI es claramente diferente del que rodea a un ovocito que será fecundado normalmente(63). Ello sugiere que la salud del ovocito es un factor significativo en el éxito de la fecundación mediante ICSI. Limitando el estudio a ICSI se posibilita investigar la relación entre los niveles de hormonas intrafoliculares y el resultado de fecundación específico por control de la maduración nuclear.

La implicación de los niveles hormonales en la calidad ovocitaria ha sido un concepto tratado en diversos estudios como se ha expuesto, pero con

determinadas limitaciones. *Andersen* encontró que los ovocitos y los embriones procedentes de folículos con altas concentraciones de andrógenos y con una tasa estrógenos/andrógenos reducida eran menos aptos para conseguir un embarazo con FIV(54). Estudios previos habían evaluado la fecundación, pero mediante técnica de inseminación convencional limitando así el impacto de la maduración nuclear ovocitaria en los resultados(40). La limitación del análisis hormonal asegurando el folículo del que proceden se subsana mediante ICSI, como hizo *Mendoza*; aunque sin considerar la diferencia necesaria en calidad ovocitaria y en concentración hormonal folicular según el tamaño folicular(23). Desafortunadamente, hay muchos artículos que muestran una correlación significativa entre hormonas en líquido folicular y madurez ovocitaria, que agrupan los folículos en maduros o inmaduros según un punto de corte folicular arbitrario. Esta tendencia se basa en que la maduración ovocitaria está en función del tamaño folicular y que la producción esteroidea por el folículo es también función de la masa folicular. Por lo que, inevitablemente, si los folículos sólo son separados en maduros (grandes) e inmaduros (pequeños), los niveles mayores de esteroides se hallaran en aquellos folículos de los que hay una mayor tasa de fecundación. Cualquier relación entre el resultado de la fecundación y los niveles esteroideos predominantes será una función causal del tamaño folicular(36). *Asimakopoulos y cols*, a pesar de emplear ICSI como técnica de fecundación, no hayan diferencias relevantes en las concentraciones foliculares de los líquidos que rodean a ovocitos que son fecundados normalmente frente a ovocitos en los que falla la fecundación (64). No obstante, no se analizaron, como una variable aparte en los resultados, los ovocitos que degeneraron.

Incluso el estudio de *Lamb y cols* podría ser mejorado(65). Se podrían definir las indicaciones de ICSI y clasificar los resultados según las diferentes etiologías de infertilidad. La calidad embrionaria es otro de los factores cruciales a valorar y el protocolo de estimulación ovárica debe definirse con exactitud. Por último, las características demográficas de las pacientes deben ser especificadas (rango de edad, índice de masa corporal, estradiol en día 3 del ciclo, recuento de folículos antrales, periodo de infertilidad, ciclos previos, embarazos previos)(65).

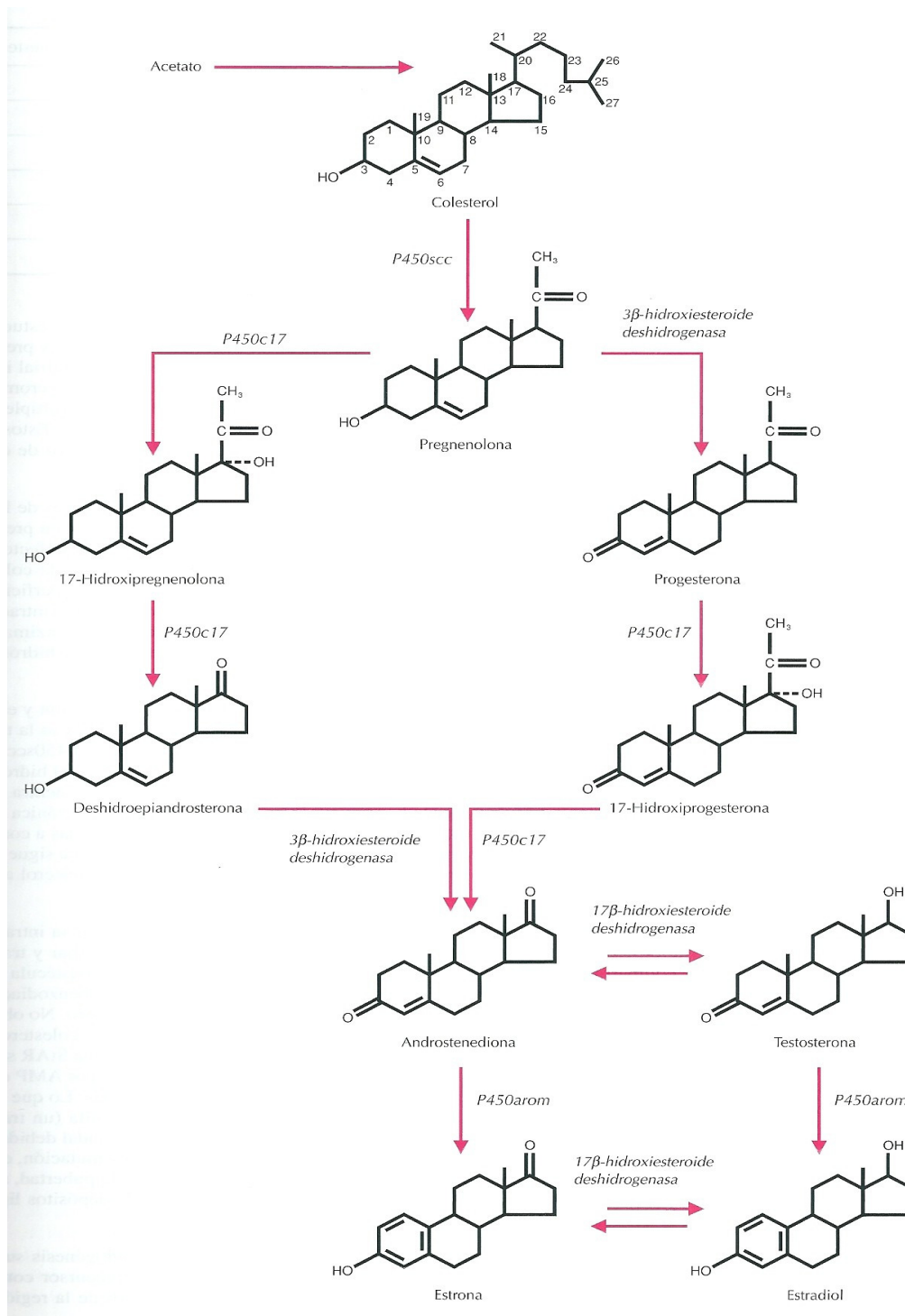
Desafortunadamente, hasta hoy los estudios que han buscado como objetivo encontrar un buen predictor molecular de calidad ovocitaria en líquido folicular, no han logrado encontrar sustancias que puedan ser usadas como marcadores válidos estandarizados de competencia ovocitaria para fecundación, desarrollo embrionario y embarazo(20).

2. PERFIL HORMONAL DE SECRECIÓN.

En el folículo ovárico humano, *Ryan y Smith* llevaron a cabo el primer estudio en 1961 sobre la capacidad de biosíntesis hormonal (66, 67, 68). Ellos demostraron que, además del estradiol y la estrona, había también producción de algunos andrógenos y de progesterona en el ovario. Sin embargo, este primer experimento se vio comprometido por el hecho de que la incubación celular se llevó a cabo en presencia de progesterona, debido a la hipótesis previamente anclada de que era necesario un precursor extrínseco de la síntesis estrogénica por parte de las células de la granulosa y de la teca.

La vía general de biosíntesis de esteroides aceptada hoy está basada fundamentalmente en los trabajos de *Ryan* (Ilustración 1).

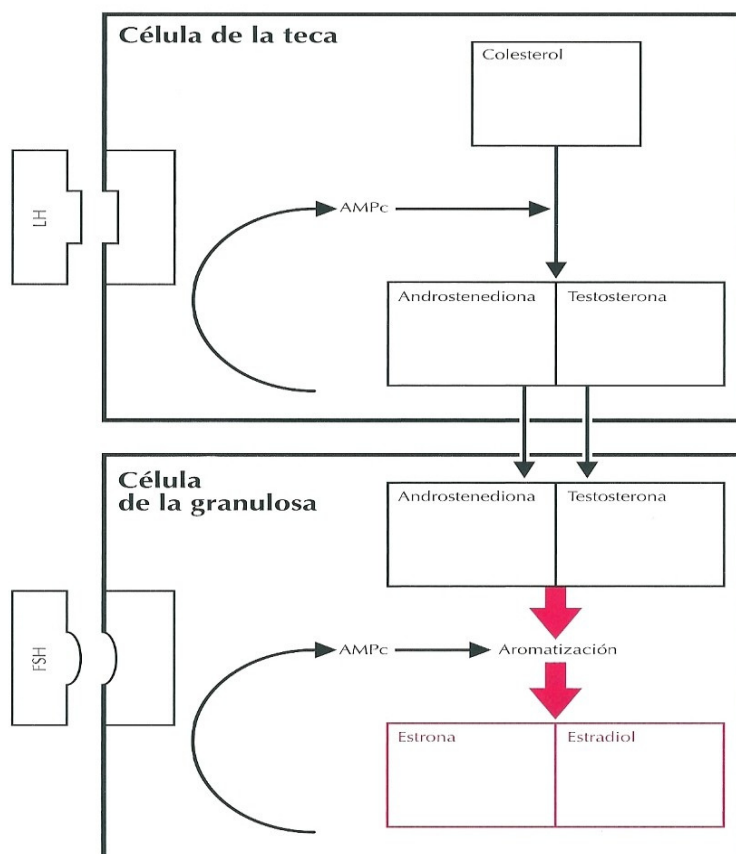
Ilustración 1. BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS



En un estudio anterior de folículos de rata, *Falck* observó que, tanto las células de la granulosa como las de la teca, eran necesarias para la biosíntesis de estrógenos, producto de la interacción de los dos tipos de células (69). Sin embargo, *Channing y Coudert* mostraron que sólo las células de la teca en monos eran suficientes para producir una cantidad normal de estrógenos, concluyendo que las células de la teca eran las principales productoras de estrógenos más que las células de la granulosa. Esto discrepa con la teoría aceptada hoy de “dos células, dos gonadotropinas”, teoría de la esteroidogénesis folicular que se encuentra en múltiples textos y basada en la propuesta por *Falck* en 1959. De acuerdo a esta teoría, las células de la granulosa son la principal fuente de la producción de estradiol, que resulta de la conversión de andrógenos derivados de células de la teca (70, 71, 72) (Ilustración 2).

Ilustración 2. FUNCIÓN DE BIOSÍNTESIS HORMONAL POR LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y DE LA TECA

LH: hormona luteinizante. FSH: hormona folículo estimulante. AMPc: adenosín monofosfato cíclico.



La teoría del sistema bicelular aúna información sobre el lugar de producción de esteroides específicos junto con la aparición e importancia de los receptores hormonales. Como hechos relevantes se incluyen: 1. En las células de la granulosa existen receptores de FSH; 2. Los receptores de FSH son inducidos por la propia FSH; 3. En las células de la teca hay receptores de LH, que inicialmente están ausentes en las células de la granulosa, aunque, conforme crece el folículo, la FSH induce la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa; 4. La FSH induce la actividad de la enzima aromatasa en las células de la granulosa; 5. Y todas estas acciones se encuentran moduladas por factores autocrinos y paracrinos secretados por las células de la granulosa y de la teca.

Está ampliamente basado en múltiples estudios que la aromatización es estimulada por la FSH, cuya actividad sólo puede ser activada por su unión al receptor de las células de la granulosa. De hecho es comúnmente aceptado que las células de la teca producen progesterona bastante más que estradiol, debido al bajo nivel de la actividad aromatasa (citocromo 19 (CYP 19)) (71).

3. REGULACIÓN DEL CICLO OVÁRICO:

En la fase folicular temprana, la activina producida por las células de la granulosa en los folículos inmaduros potencia la acción de la FSH sobre la actividad de la aromatasas y la formación de receptores de FSH y LH, mientras que se suprime simultáneamente la síntesis tecal de andrógenos.

En la fase folicular tardía, el incremento en la producción de inhibina (específicamente inhibina B) por las células de la granulosa (y la reducción de la activina) potencia la síntesis de andrógenos en las células de la teca en respuesta a la LH y al factor de crecimiento insulínico (IGF II) a fin de facilitar sustrato para una producción de estrógenos aún mayor en las células de la granulosa. En la granulosa madura del folículo preovulatorio dominante, la activina sirve para evitar la luteinización prematura y la producción de progesterona. En esta fase y como consecuencia, se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas periféricas de andrógenos en la mitad del ciclo. Se observa un incremento del 15% de la androstendiona y de un 20% de la testosterona (73).

El folículo dominante es el que adquiere el mayor nivel de actividad de aromatasas y de receptores de la LH en respuesta a la FSH. El folículo dominante se caracteriza por la mayor producción de estrógenos (por retroalimentación central) y de inhibina (por acciones local y central). Este logro se consigue sincrónicamente con la adecuada expresión de activina. El máximo nivel de activina génica para la codificación de activina se observa en los folículos antrales inmaduros y el nivel más bajo, en los folículos preovulatorios. Por tanto, las proteínas de la activina se producen en mayor cantidad al principio del desarrollo folicular para potenciar la receptividad de la FSH. Como sucede con las concentraciones circulantes de inhibina, la inhibina B es la predominante en el líquido folicular de los folículos preantrales y la inhibina A aumenta cuando los folículos incrementan su tamaño y maduran. La síntesis y la secreción de inhibina durante la fase folicular están reguladas por la FSH y los factores de crecimiento.

La expresión del receptor de LH es máxima en las células de la granulosa de folículos preovulatorios antes de la inducción de la ovulación presentando una asociación significativa con la expresión del receptor androgénico y con el

estradiol y la progesterona folicular. Esta expresión del receptor de LH no está restringida a los grandes folículos preovulatorios sino que se extiende a folículos antrales pequeños. La LH es crucial en la conducción del desarrollo folicular en la segunda mitad de la fase folicular, especialmente en conexión con la administración de FSH exógena. Sin embargo, las altas dosis de FSH durante la estimulación ovárica producen un fenómeno de *down-regulation* en la expresión del receptor de FSH. Este patrón de expresión de los receptores de FSH y LH es consistente con la del ciclo menstrual, destacando la FSH en el reclutamiento y crecimiento de folículos preantrales pequeños y cobrando importancia la LH en la selección folicular y el progreso de grandes folículos antrales y preovulatorios(74)

La concentración adecuada de andrógenos en las células de la granulosa promueve la actividad de la aromatasa y la producción de inhibina, y a su vez, la inhibina promueve la síntesis tecal de andrógenos por la estimulación de la LH. Con el desarrollo del folículo, la expresión de la inhibina A pasa al control de la LH. Una de las claves para el éxito de la ovulación y de la función lútea es la conversión de la producción de inhibina en la receptividad de la LH para mantener la supresión central de la FSH y la potenciación local de la acción de la LH. En efecto, las respuestas de los folículos ováricos a la estimulación con FSH y LH exógenas en técnicas de reproducción asistida, indican que la maduración y la función finales del folículo dominante antes de la ovulación están influidas significativamente por la LH. La maduración final del folículo dominante y la salud del ovocito se optimizan en presencia de la LH (75, 76, 77).

Las células de la teca de los folículos pre-antrales de un ovario normal producen androstendiona, testosterona y dehidroepiandrosterona (DHEA).

Los andrógenos pueden actuar de tres modos:

- Por conversión intracelular de testosterona en dihidrotestosterona (DHT), actividad intracrina.
- Por la propia testosterona, actividad endocrina.
- Por conversión intracelular de testosterona en estradiol (aromatización), actividad intracrina.

FUNCIÓN ESENCIAL DE LA CONCENTRACIÓN DE ANDRÓGENOS EN EL FOLÍCULO OVÁRICO:

Al servir de sustrato para la aromatización inducida por la FSH, los andrógenos en concentraciones bajas aumentan la actividad de la aromatasas y la producción de estrógenos. En concentraciones superiores, las células de la granulosa favorecen la conversión de los andrógenos en andrógenos 5 α -reducidos, más potentes, que no se pueden convertir en estrógenos y, además, son capaces de inhibir la actividad de la aromatasas y la inducción de receptores de LH por la FSH. Así pues, el incremento de la concentración local de andrógenos por encima de un valor crítico inhibe la aparición de un folículo dominante y conduce a la atresia folicular. Aunque esta acción en el ciclo normal puede ser importante para garantizar que sólo un folículo alcance el punto de ovulación, una concentración excesiva de andrógenos puede impedirlo.

4. CALIDAD OVOCITARIA.

Para obtener embriones de buena calidad que puedan ser transferidos asegurando las posibilidades de embarazo, es imprescindible la obtención tanto de un número adecuado de ovocitos como la obtención de ovocitos de buena calidad con un adecuado estado de maduración de los mismos. En la práctica diaria se puede comprobar que tanto la precipitación como la demora en la punción y aspiración de los ovocitos pueden estropear todo el proceso de estimulación ovocitaria.

En un contexto clínico, la selección de ovocitos y embriones de buena calidad es la clave para la mejora de las técnicas de reproducción asistida (78).

Es incuestionable la importancia del ovocito en el desarrollo adecuado del embrión antes, durante y tras el proceso de implantación. Así, al hablar de calidad embrionaria generalmente se hace extensivo a calidad ovocitaria. Aunque el papel del espermatozoide es cada vez más evidente, tanto en la calidad como en la viabilidad del embrión, la calidad ovocitaria ocupa un papel relevante (79).

La medida de la calidad ovocitaria en las técnicas de reproducción asistida es un tema de interés creciente entre los profesionales dedicados a reproducción, llegando a convertirse en uno de los principales objetivos en este campo. La elección de los mejores ovocitos es fundamental tanto en FIV como en ICSI y, de hecho, podría ayudar a limitar la sobreproducción embrionaria y a mejorar los resultados de los programas de criopreservación de embriones (20).

En comparación con los ciclos naturales, los ciclos de estimulación ovárica en FIV pueden forzar la producción de ovocitos desde folículos que no han alcanzado su maduración óptima, por lo que posiblemente darán lugar a ovocitos que no son completamente competentes (15, 80, 81, 82).

A la luz de estos datos, se sabe que la mera presencia de un corpúsculo polar es insuficiente para evaluar la competencia ovocitaria y que otros rasgos moleculares y subcelulares son necesarios para permitir la fecundación y el adecuado desarrollo embrionario(83, 84, 85).

La adquisición de la competencia ovocitaria se basa en el buen control de los eventos acompañantes de desarrollo folicular (86, 87, 88).

El uso de gonadotropinas exógenas puede distorsionar este proceso por dos posibles mecanismos: por el sobrecontrol sobre la fisiología folicular normal o por producción de folículos pequeños que dan lugar a ovocitos incompetentes (1).

La maduración ovocitaria es un complicado proceso que incluye la reiniciación y cierre de la primera división meiótica, con la progresión subsiguiente a metafase II mientras que se produce la preparación del citoplasma ovocitario. El proceso de maduración ovocitaria incluye pues cambios tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear, que no siempre son sincrónicos ni se desarrollan con el mismo grado de maduración. Ovocitos con maduración nuclear en metafase II podrían presentar deficiencias en su proceso de maduración citoplasmática que podrían comprometer el desarrollo adecuado del embrión. Las competencias nuclear y citoplasmática deberán coordinarse de modo apropiado para alcanzar una afinada viabilidad ovocitaria.

Este proceso de cambio nuclear y citoplasmático es crucial para la fecundación y el desarrollo embrionario precoz. En él intervienen una serie de parámetros que pueden afectar al desarrollo madurativo final del ovocito con el condicionamiento posterior del desarrollo del embrión y su implantación (89).

En ciclos en los que se realiza ICSI, la proporción media de ovocitos en metafase II es de aproximadamente el 80%, con la mayoría de los protocolos de inducción de la ovulación, pero existe un 8-9% de ciclos en los que < 50% son ovocitos maduros (4). A medida que aumenta la cohorte de ovocitos inmaduros con ICSI se produce un mayor efecto negativo en el desarrollo embrionario; se reducen las tasas de fecundación, de embarazo clínico y las tasas de parto (5).

Los ovocitos recuperados en metafase I en la punción folicular que alcanzan la maduración en el momento de la ICSI presentan menores tasas de fecundación e implantación al compararlos con ovocitos recuperados en metafase II. La persistencia de características citoplasmáticas inmaduras en algunos ovocitos en metafase II podría ser la razón para el fallo en la fecundación.

In vivo, la LH es la señal fisiológica para el reinicio de la meiosis, mediante la disminución de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en el ovocito y la fosforilación de las uniones tipo GAP (unión en hendidura) entre las células de la

granulosa y el ovocito. La exposición del folículo a altas concentraciones de LH induce la maduración del ovocito. Los ovocitos no presentan receptores de LH; son las células de la teca y de la granulosa las que expresan dicho receptor, por lo que debe producirse una liberación de factores paracrinos, en respuesta a dicha hormona, por parte de estas células que actúan directamente sobre la maduración del ovocito y la expansión del cúmulo. Las células de la granulosa, tras la pérdida de comunicación directa con el ovocito, son capaces de secretar una amplia gama de factores que amplifican o atenúan de manera autocrina o paracrina, el efecto de las gonadotropinas (hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), IGF, EGF, VEGF y TGF-2) (90).

El ovocito aportará la mitad del ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear y de su citoplasma contribuyendo así ampliamente en la formación del cigoto. La salud citoplasmática del gameto femenino es capaz de influir en la calidad genética del mismo (79).

El ovocito humano en estadio de profase I, envuelto en el folículo antral, va adquiriendo gradualmente competencia meiótica durante su fase final del crecimiento. Lo cual se fomenta mediante las olas periovulatorias de gonadotropinas, que van induciendo cambios cuali y cuantitativos en el microambiente del ovocito relativos al metabolismo, estructura e información(91).

La competencia citoplasmática se consigue tras una adecuada síntesis y acúmulo de transcritos, una apropiada síntesis de proteínas, un adecuado mecanismo post-traducciona l y una serie de cambios en la ultraestructura citoplasmática y en la macroanatomía ovocitaria (92) .

- *Síntesis y almacenamiento de ácido ribonucleico mensajero (ARNm).* La actividad transcripcional del ovocito va decreciendo a medida que va alcanzando su tamaño máximo, dependiendo así de la acumulación del ARN almacenado para su correcta maduración final.

Los ovocitos en metafase II que proceden de folículos pequeños presentan menor tasa de fecundación y peor desarrollo embrionario, que los ovocitos en metafase II, nuclearmente maduros, procedentes de folículos con tamaño adecuado. Cuando proceden de folículos pequeños no han finalizado de

forma adecuada su desarrollo y pueden presentar deficiencias en la acumulación de ARNm o de proteínas dando lugar a un desarrollo embrionario subóptimo (93, 94).

Diversos factores se han propuesto como determinantes en la maduración citoplasmática entre los que destacan las fosfatasas CD25A, PCNA y SOCS27 (95).

Una vez alcanzado el tamaño final, el ovocito continúa experimentando una disminución progresiva en la expresión de diferentes genes, de modo que el ovocito en metafase II es el que expresa el menor número de genes con respecto a estados evolutivos anteriores (95).

La transcripción genética a partir de la fecundación y durante el desarrollo embrionario temprano (4-8 células) es escasa o nula, por lo que el crecimiento y la división de los embriones hasta estos estadios dependen de los transcritos y proteínas secuestradas por el ovocito (96).

Así se puede concluir que la maduración citoplasmática tiene un peso específico en la calidad del ovocito y en el potencial desarrollo del embrión en términos de acumulación de ARNm. Aún así, hay otros factores a tener en cuenta puesto que fallos en la activación de la transcripción embrionaria no necesariamente son la causa del bloqueo prematuro del desarrollo embrionario(96).

- *Mecanismos de tipo post-traducción.* La concentración de factores claves relacionados con la competencia meiótica son también primordiales en la competencia citoplasmática. Los más estudiados son principalmente dos: el factor promotor de la maduración (MPF) con sus correspondientes reguladores como cdc25 o c-mos, y la protein-kinasa activada por mitógenos (MAPK) que comparte muchos de los sustratos con el MPF.

Cdc-25 y c-mos presentan una actividad caracterizada por dos picos de elevada actividad; en el momento de la reanudación de la meiosis y en la detención en metafase II. El MPF está implicado en el ciclo celular; en la disolución de la membrana nuclear, en la condensación de la cromatina y en cambios en el citoesqueleto. Tras la activación ovocitaria debe disminuir rápidamente (92).

Ambas proteínas, MPF y MAPK, junto con la actividad del receptor del inositol trifosfato implicado en la activación ovocitaria, se han relacionado con problemas para completar la maduración citoplasmática. La actividad de ambas es menor en ovocitos que dan lugar a embriones con un desarrollo comprometido (97).

- *Ultraestructura citoplasmática.* Los cambios en la estructura citoplasmática se producen hasta su diferenciación a ovocito; no deteniéndose en el ovocito primario, sino continuando a través de su crecimiento dentro del folículo en sus diferentes estadios evolutivos. Tras la utilización de protocolos de estimulación ovárica controlada pueden estar en diferentes estadios madurativos dependiendo del momento en que se administra la hCG, o incluso dependiendo del tamaño del folículo aspirado. Cada uno de estos estadios presenta a su vez unas características concretas en su microanatomía.

A nivel ultraestructural, la inmadurez citoplasmática de los ovocitos es diagnosticada mediante una diferente disposición y apariencia de las distintas organelas citoplasmáticas (98). Por otro lado, la dinámica citoesquelética podría verse alterada dando lugar a defectos en la disposición de microtúbulos y microfilamentos propia de los ovocitos maduros (99).

- *Macroestructura ovocitaria.* Además de una ultraestructura adecuada, otros aspectos relacionados con las características morfológicas de los ovocitos están cobrando su peso específico.

Algunas deficiencias citoplasmáticas a nivel molecular y/o estructural podrían ser reflejo de ciertas anomalías citoplasmáticas muy concretas que se observan macroscópicamente.

Teóricamente, un ovocito maduro en metafase II de buena morfología debería tener un citoplasma claro y homogéneo, con moderada granulosidad y sin inclusiones citoplasmáticas (100). No obstante, muchos de los ovocitos obtenidos tras regímenes de estimulación ovárica son ovocitos que presentan una amplia variedad de fenotipos (101, 102, 103).

Asumiendo que defectos relacionados con la madurez citoplasmática pueden ser responsables de fallos en la fecundación y posterior desarrollo embrionario, se pueden clasificar estos fallos en tres puntos:

- *Fallos en la fecundación.* Muchos casos de infertilidad masculina han sido resueltos actualmente mediante ICSI, pero aún así el éxito de la técnica va a estar limitado por la calidad ovocitaria. Del estudio de estos ovocitos no fecundados tras ICSI, se ha podido observar errores en la consolidación de los pronúcleos masculino y femenino como resultado de defectos en la penetración del espermatozoide en el oolema, de fallos en la técnica o por rotura insuficiente de la membrana del espermatozoide. No obstante, existen otros fallos en la fecundación que se pueden explicar por la situación maduracional del citoplasma (104).

Por una parte, hay casos en los que los espermatozoides han iniciado las primeras fases de descondensación de la cromatina, pero el ovocito no ha llegado a culminar su activación. La fusión de una célula en mitosis con una célula interfásica (espermatozoide) induce una condensación prematura de cromosomas. Si el MPF permanece en concentraciones altas propias de un ovocito no citoplasmáticamente maduro, los espermatozoides sufrirán esta condensación prematura de cromosomas (47, 105).

Por otra parte, estos fallos de fecundación tras ICSI pueden estar en relación con la actividad mitocondrial, basadas en las diferencias entre el número de copias de ADN mitocondrial de ovocitos con fallos por factor masculino versus las halladas en ovocitos con fallos de fecundación inexplicados (106).

- *Anomalías cromosómicas del embrión.* La segregación cromosómica está controlada por el huso meiótico que depende de gran parte del componente citoplasmático. Cada vez se aportan más evidencias sobre la existencia de factores citoplasmáticos responsables de las anomalías estructurales del huso meiótico que pueden conllevar defectos de segregación de los cromosomas y originar embriones aneuploides (107). Diversos estudios en ovocitos de pacientes mayores muestran una mayor frecuencia de aberraciones del huso meiótico y cromosomas mal alineados

(108). De ahí el aumento en la tasa de aneuploidías de embriones procedentes de mujeres añosas (109).

El análisis del huso (*spindle analysis*) se ha propuesto como un marcador de competencia ovocitaria (110, 111, 112).

- *Morfología embrionaria alterada*. Las mitocondrias y el citoesqueleto son dos elementos citoplasmáticos que pueden afectar a la calidad embrionaria. El aparato mitocondrial, además de contribuir con la energía como adenosín trifosfato (ATP), contribuye al potencial redox celular y a la homeostasis del calcio, claves para la dinámica celular y el citoesqueleto porque la división celular (y la de los embriones en particular) implican una reorganización radical del citoesqueleto.

El tamaño y el número de copias de ADN mitocondrial tienen implicación en el desarrollo embrionario. Así, la aparición de fragmentos celulares puede deberse a deficiencias transitorias de ATP en blastómeras concretas (113). También embriones más fragmentados proceden de ovocitos con desórdenes en su batería citoesquelética (114).

Mientras que la maduración nuclear ovocitaria es fácilmente identificable por la aparición del primer corpúsculo polar, la maduración citoplasmática conlleva mayor dificultad de medición (78).

La tinción de ovocitos de oveja con azul de cresol brillante (BCB) promueve la selección de ovocitos más competentes o de blastocistos con mayor actividad mitocondrial y del factor MPF(115). La tinción se basa en la capacidad del colorante BCB para ser reducido por la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. Así, los ovocitos que han alcanzado su fase de crecimiento y presentan poca actividad enzimática no pueden reducir el BCB, y son los ovocitos en crecimiento, con alta actividad enzimática, los capaces de reducir el colorante azul que resulta en un ovocito con citoplasma pálido (BCB negativo). En conclusión, el colorante BCB es un buen sistema para seleccionar ovocitos de acuerdo a su competencia(78).

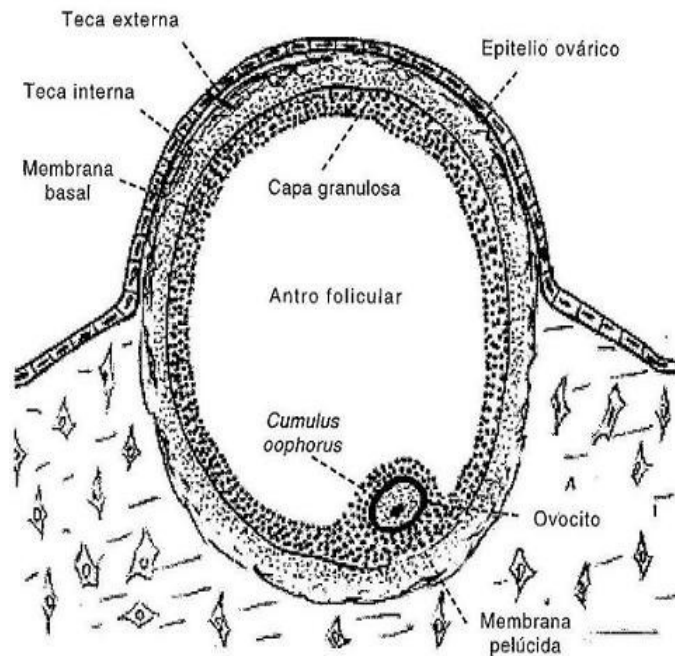
Como se ha expuesto, también las mitocondrias son jugadores claves en la actividad citoplasmática. Los ovocitos de mayor calidad contienen

significativamente más altos niveles de ATP y producen mayores tasas de blastocisto tras la fecundación (113, 116, 117).

La tinción con BCB y el contenido de ATP son dos formas de medida de maduración citoplasmática en ovejas. Varios investigadores han hallado mayor producción de blastocistos procedentes de ovocitos BCB positivos en otras especies animales (cabras, búfalos, cerdos, ratones, y caballos). Los ovocitos BCB positivos en ovejas presentan mayor contenido de ATP que los ovocitos BCB negativos (78).

En resumen, la calidad ovocitaria, medida por tinción con BCB, afecta significativamente al porcentaje y a la calidad de blastocistos pero sólo de los obtenidos tras FIV. Este efecto no se obtiene en blastocistos procedentes de ovocitos de ovejas después de ICSI (78). Una posible explicación sobre el desarrollo embrionario mejor de ovocitos BCB negativos tras ICSI podría ser la precisión en la selección de ovocitos en metafase II previa a la inyección espermática y la falta de cigotos poliespérmicos (78).

Ilustración 3. ESQUEMA OVOCITARIO



El diálogo entre el ovocito y las células del cúmulo supone también una gran contribución para la meiosis del ovocito y el desarrollo de su competencia. Por un lado, el ovocito modula el crecimiento folicular a través de la expresión de genes específicos (factor de crecimiento diferencial (GDF-9) y familia de BMP) así como su meiosis (118, 119). Bajo estas acciones de proliferación, el ovocito controlará en parte la diferenciación de las células del cúmulo con una particular implicación de GDF-9 y del BMP15 en este proceso de maduración tardía. Y, por otro lado, las células somáticas son la principal diana de las gonadotropinas y modularán el crecimiento ovocitario y su maduración. Las uniones GAP entre el ovocito y las células del cúmulo juegan un papel fundamental en esta interacción, permitiendo la acción de algunos genes específicos ovocitarios (GDF-9) y el control de su propio metabolismo y movimientos de calcio (120).

Para el crecimiento y la maduración del ovocito (competencia ovocitaria) es esencial la comunicación existente entre las células de la granulosa y el ovocito que

se inicia en el momento de la oogénesis durante el desarrollo fetal y, que se mantendrá hasta la maduración prácticamente completa del ovocito (87). La maduración del ovocito es la culminación de un prolongado periodo de crecimiento y desarrollo ovocitario y folicular conjunto. Durante semanas, e incluso meses, el ovocito va adquiriendo gradualmente la maquinaria celular necesaria para permitir el desarrollo temprano del embrión. Esta capacidad ovocitaria de sustentar el desarrollo temprano embrionario es lo que se denomina desarrollo del ovocito competente, y está intrínsecamente ligado al proceso de foliculogénesis y a la adecuada formación del folículo en desarrollo. Durante el curso de dicha foliculogénesis, un grupo celular adyacente al ovocito se diferencia y se relaciona con éste a través de procesos intercelulares comunicantes y conexinas (uniones tipo GAP). Estas células establecen un íntimo contacto metabólico entre ellas mismas y el ovocito, formando el complejo cúmulo-ovocitario, que nutre y regula la maduración del ovocito.

Así, el desarrollo embrionario adecuado, especialmente en los estadios iniciales, dependerá en gran medida de que todos los procesos de maduración ovocitarios se hayan desarrollado correctamente (121). Todo ello sólo ocurrirá cuando la interacción entre el ovocito y las células de la granulosa se realice de modo correcto. El mantenimiento de una adecuada comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo, especialmente durante el periodo preantral y antral temprano, es fundamental para el adecuado acompasamiento entre los procesos de maduración nuclear y citoplasmática que permitirán la competencia ovocitaria. Así, este complejo cúmulo-ovocitario acaba formando una especie de sincitio íntimamente relacionado hasta las etapas finales de la foliculogénesis. Estas uniones se fosforilarán unas horas antes de la ovulación, inutilizándolas, para favorecer dicha ovulación.

El ambiente folicular se encarga tanto de impedir que la maduración nuclear ovocitaria se produzca antes de que se complete la maduración citoplasmática (manteniendo al ovocito en profase I), como de nutrir al ovocito, regular la expresión génica y la síntesis de proteínas y de ARNm necesarias para el ovocito para sustentar el inicio del desarrollo embrionario.

Los ovocitos maduros presentan una mayor complejidad citoplasmática, son competentes para finalizar la meiosis y capaces de ser fecundados y de dividirse, en comparación con el ovocito de un folículo primordial. Estos maduros ovocitos presentan microvellosidades que se interrelacionan con la capa interna de la zona pelúcida: acúmulos de gránulos corticales en las inmediaciones de la membrana del ovocito que evitan la poliespermia en la fecundación, aumento del número de mitocondrias en el ovocito relacionadas con el retículo endoplasmático, acúmulo de ribosomas, ARNm y proteínas. Todo este almacenamiento molecular sólo es posible gracias a las aportaciones que las células del cúmulo realizan al ovocito (120).

Esta interacción puede tener también un efecto negativo sobre el ovocito. En dichas células existe un proceso de apoptosis fisiológico que aumenta con la edad y que afecta al ovocito. Se postula que ésta podría ser una de las razones de la disminución de la fertilidad ligada a la edad (122).

La capacidad de división y desarrollo de un embrión en los primeros días de su evolución, depende fundamentalmente de la calidad ovocitaria. De hecho, la calidad embrionaria está en relación a dicha calidad ovocitaria. Como resumen de lo expuesto, se puede afirmar que la calidad ovocitaria es un parámetro directamente relacionado con las interrelaciones que se dieron entre el ovocito y las células de la granulosa adyacentes a él, y el folículo durante el proceso de foliculogénesis. Mediante las uniones físicas entre el cúmulo y el ovocito (procesos intercelulares comunicantes y uniones GAP) se transvasan multitud de factores que promueven la competencia ovocitaria que determinará la calidad embrionaria futura. Por otro lado, estas células somáticas secretan también al espacio folicular el líquido folicular con todos sus componentes de los que se ha demostrado que participan de forma activa en la maduración ovocitaria. Finalmente, el propio ovocito secreta factores de crecimiento de forma paracrina, que rigen el crecimiento de las células del cúmulo y la maduración folicular, lo que acabará revirtiendo en su propia maduración y competencia (120).

El líquido folicular es fácilmente accesible en el proceso de recogida de ovocitos mediante punción folicular y teóricamente representa una óptima fuente potencial de predicción bioquímica de calidad ovocitaria.

El líquido folicular provee un importante microambiente para el desarrollo de los ovocitos (Ilustración 3). Es producto tanto de la transferencia de componentes del plasma sanguíneo que cruzan la barrera folículo-hemática (por difusión), como de la actividad secretora de las células de la granulosa y de la teca(123) . Las células de la granulosa presentan canales que permiten el paso de moléculas de un peso similar a 500 000 dalton a la cavidad folicular, por lo que presenta una composición similar al plasma filtrado (124).

La mayor parte de estas sustancias tienen un modo de acción autocrino o paracrino. El análisis de los componentes del líquido folicular podría también proveer información sobre cambios metabólicos en el suero sanguíneo; así el ambiente bioquímico circulatorio podría estar reflejado en la composición del líquido folicular (125).

Es razonable pensar que algunas características bioquímicas del líquido folicular que rodea al ovocito puedan jugar un papel crítico en determinar la calidad ovocitaria y subsecuentemente, la fecundación y el desarrollo embrionario. La composición del líquido folicular, producido fundamentalmente por células de la granulosa, jugaría pues un papel esencial en la formación de ovocitos de buena calidad.

El líquido folicular contiene una amplia variedad de proteínas, citoquinas y factores de crecimiento, así como hormonas, electrolitos, precursores metabólicos y otros factores desconocidos.

Durante el tratamiento con gonadotropinas para la hiperestimulación ovárica controlada, la composición del líquido folicular muestra cambios dinámicos en las células individuales del folículo ovárico en respuesta a dichas gonadotropinas administradas, por secreción de diferentes hormonas, factores de crecimiento y citocinas. De estas sustancias, al menos algunas, presentan influencia, bien directa o indirectamente, en el desarrollo potencial y en la viabilidad ovocitaria (14).

En la práctica clínica, múltiples métodos de selección ovocitaria han sido propuestos. El estudio de la morfología ovocitaria es muy empleado, siendo relativamente rápido y simple; sin embargo puede conducir a identificar más frecuentemente predictores “negativos” que “positivos” de calidad ovocitaria

(126). El mismo concepto puede ser aplicado a estudios que polarizan el análisis microscópico.

Algunos autores han estudiado la expresión de genes en células de la granulosa o en el propio ovocito buscando marcadores moleculares específicos de calidad ovocitaria (127). La biopsia del corpúsculo polar ha sido usada para cribar ovocitos con defectos cromosómicos derivados de errores en las dos divisiones meióticas (128). La mayor parte de estas técnicas son bastante complicadas, requieren costosos equipamientos de laboratorio y largas horas de trabajo, y consecuentemente no son aplicables en la práctica clínica.

Criterios morfológicos según ASEBIR(89):

Los parámetros morfológicos evaluados por ASEBIR en el estadio de maduración ovocitario incluyen alteraciones morfológicas citoplasmáticas, extracitoplasmáticas y relativas al complejo cúmulo corona radiata-ovocito. El ovocito maduro puede presentar alteraciones en su morfología o dimorfismos que permiten realizar una valoración morfológica.

Entre las alteraciones morfológicas citoplasmáticas se incluyen: la agrupación de organelas y granulosidad localizada en el centro del ovocito, la agregación de retículo endoplasmático liso, la existencia de vacuolas y de inclusiones citoplasmáticas (ilustraciones 4, 5 y 6).

Ilustración 4. **ORGANELAS AGRUPADAS EN EL CENTRO DEL OVOCITO**

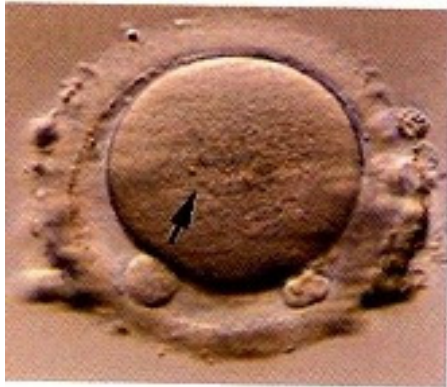


Ilustración 5. **AGREGACIÓN DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO LISO**

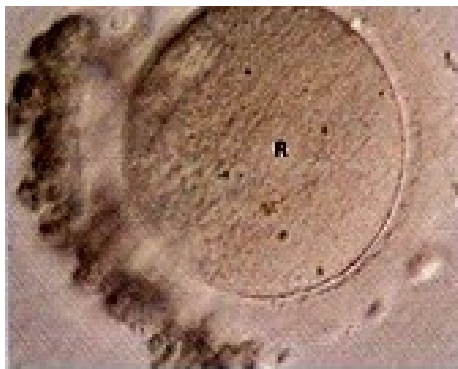


Ilustración 6. **EXISTENCIA DE VACUOLA**



Entre las alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas se incluyen la existencia de exudados en el espacio perivitelino y el espacio perivitelino aumentado, las anomalías de la zona pelúcida y alteraciones del primer corpúsculo polar.

Los exudados en el espacio perivitelino podrían considerarse como un fenómeno relacionado con la maduración fisiológica del ovocito, ya que su presencia no parece relacionarse con las tasas de fecundación, calidad embrionaria, gestación o implantación (101). La existencia de detritus podría ser un signo de exceso de gonadotropinas empleadas en los ciclos de estimulación ovárica.

El espacio perivitelino aumentado hace que el ovocito quede “flotando” en el interior de la zona pelúcida. Si además presenta un primer corpúsculo polar grande, se asocia con una disminución de la calidad embrionaria en día+2 (53).

Las alteraciones del primer corpúsculo polar se refieren a su fragmentación y tamaño. La morfología del primer corpúsculo polar cambia tras unas horas de cultivo *in vitro* pudiendo cambiar así dependiendo del momento de observación (101). Se ha observado un incremento de la fragmentación del primer corpúsculo polar a lo largo del tiempo.

La variación en el tamaño del primer corpúsculo polar (grande, pequeño) puede tratarse como una condición anómala del ovocito pues pueden dar lugar a alteraciones cromosómicas (129). El factor determinante es probablemente la posición del huso meiótico en relación con la superficie del ovocito.

Globalmente, los resultados del efecto de las alteraciones extracitoplásmicas son controvertidos. Estos ovocitos, más que anómalos, se podrían considerar como desviaciones fenotípicas fruto de la heterogeneidad de los ovocitos extraídos (101).

Y, por último, se incluyen las alteraciones morfológicas relativas al complejo cúmulo corona radiata-ovocito compactado. El grado de madurez del complejo ha sido usado como indicador de madurez ovocitaria, aunque la sincronía entre ambos en ciclos estimulados parece cuestionable (130, 131). Podría deberse a diferente sensibilidad de las células del complejo cúmulo-corona y del núcleo

ovocitario a la maduración inducida por las gonadotropinas u otros factores intrafoliculares (101).

La evidencia científica hasta ahora existente no permite establecer aún que parámetros morfológicos de los analizados tienen una relación directa por sí solos sobre las variables reproductivas de importancia. Existen multitud de artículos que revelan gran disparidad en los resultados, probablemente porque son retrospectivos, no homogéneos y, en su mayoría, basados en un número insuficiente de casos.

Diversos autores hallan correlación entre la morfología ovocitaria y las tasas de embarazo (132). Otros hallan esta correlación con las tasas de implantación. Y otros autores encuentran correlación entre la morfología ovocitaria y, tanto las tasas de gestación como la tasas de implantación (102, 133, 134).

A la hora de evaluar la existencia de correlación entre esta morfología ovocitaria y las tasas de fecundación y calidad embrionaria, determinados estudios la hallan para con ambas características (135) y otros estudios la encuentran sólo con la calidad embrionaria (53, 133).

Hay autores que muestran además datos con correlación entre esta morfología ovocitaria valorada y anomalías genéticas (103). La correlación entre las tasas de aborto y la morfología ovocitaria es también hallada por *Alikani* (136). Diferentes dimorfismos ovocitarios (zona pelúcida oscura y espacio perivitelino aumentado; citoplasma oscuro, granular; alteraciones en la forma) que se observan tras la estimulación ovárica pueden ser variaciones normales del aspecto del ovocito, y con poco o ningún impacto en la fecundación, calidad embrionaria o implantación (13).

Basado en los datos publicados, son las alteraciones citoplasmáticas severas, como la presencia de acumulaciones de retículo liso endoplasmático, la acumulación de organelas/granulosidad severa centralizada y la vacuolización excesiva las que más podrían perjudicar el desarrollo embrionario y su potencial implantatorio. Por tanto, son estas alteraciones severas de la normalidad citoplasmática las que habrá que tener en cuenta a la hora de establecer diferencias entre embriones de la misma calidad morfológica (101).

Atendiendo a la aplicación clínica diaria, los parámetros rutinarios usados en la práctica clínica para monitorizar el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria durante la inducción de la ovulación en reproducción asistida son la concentración de estradiol sérico y el tamaño folicular (9, 10, 11, 12).

La mayoría de los artículos revisados basan su concepto de maduración ovocitaria en la maduración nuclear, considerando los ovocitos en metafase II como maduros o competentes. Las tasas de fecundación de los ovocitos que proceden de diferentes tamaños foliculares son paralelas a las tasas de maduración ovocitaria (137). La cuestión que se plantea es si un ovocito con maduración nuclear, atendiendo al tamaño del folículo de origen, presenta igual capacidad de fecundación. Como se ha expuesto, la maduración citoplasmática y el diálogo entre el ovocito y las células del cúmulo también juegan un papel importante en la competencia ovocitaria. Desafortunadamente, no existen buenos marcadores de maduración citoplasmática o de membrana plasmática (138, 139). Aunque sí se han propuesto varios parámetros morfológicos ovocitarios como posibles marcadores, ninguno ha logrado establecerse como un predictor consistente de los resultados en las tasas de fecundación (13, 53, 100, 136).

En los tratamientos de reproducción asistida, la administración de hCG, que mimetiza el pico endógeno de LH, es el evento final que determina la madurez folicular y el desarrollo de la competencia ovocitaria. El momento de administración está típicamente guiado por el tamaño del folículo dominante o de la cohorte de folículos dominantes. Esta actitud clínica se basa en la asunción de que el tamaño folicular predice la competencia del ovocito (54, 94, 137, 140, 141, 142, 143, 144).

El ovocito humano tiene una capacidad tamaño-dependiente para reactivar y completar la maduración meiótica: los ovocitos más grandes, que se producen de folículos de mayor tamaño, tienen mayores tasas de maduración meiótica (145, 146). Además, la capacidad de síntesis hormonal por las células de la granulosa también depende del tamaño folicular, especialmente en lo relativo a la capacidad de aromatización (145, 146, 147, 148).

La competencia ovocitaria depende del crecimiento de los folículos y de los mililitros intrafolículos. La tasa de 2 pronúcleos (PN) es mayor para ovocitos metafase II procedentes de folículos de > 18 mm que para ovocitos procedentes de folículos menores. Lo que puede sugerir que el tamaño folicular es un marcador subyacente de maduración citoplasmática aunque en menor medida que un marcador de maduración nuclear (137).

La tasa de fecundación y formación de blastocisto es más baja para ovocitos recuperados de folículos pequeños, de <10 mm (1 ml de líquido folicular equivale aproximadamente a folículos superiores a 12 mm) (140, 141, 144, 149).

La *odds ratio* de maduración nuclear ovocitaria disminuye de forma estadísticamente significativa en los folículos pequeños (137).

El grupo folicular de > 18 mm es el que presenta mejores tasas de madurez ovocitaria, capacidad de fecundación y una mejor base para el desarrollo de embriones de alta calidad. Sin embargo, los folículos menores de 18 mm son también útiles en tanto en cuanto de ellos se pueden obtener, aunque en tasas menores, ovocitos maduros, capaces de ser fecundados y con embriones aptos (137). De hecho, los folículos de unos 18 mm son los preferidos en reproducción.

Hay datos que apoyan que el punto de corte más bajo que refleja maduración folicular/ovocitaria es de 14 mm (42). No existe una simple correlación lineal entre el tamaño folicular y las tasas de fecundación, como han apuntado algunos estudios (137, 150) sino que el tamaño óptimo para maduración ovocitaria se produce entre los 14 y 21 mm. Existe un fenómeno de post-maduración con tamaños foliculares por encima de 21 mm.

Y el tamaño folicular también podría tener implicación en términos de calidad embrionaria. Los embriones procedentes de ovocitos de folículos de > 18 mm presentan menores tasas de fragmentación (137). Sin embargo, el profundo rango de fragmentación de los que proceden de folículos pequeños sugiere que embriones de buena calidad pueden derivar de ovocitos procedentes de folículos con tamaño pequeño, aunque menos frecuentemente que de folículos de mayor tamaño (137).

La *odds* ratio de fecundación de los ovocitos de cada tamaño folicular es similar para ICSI y para inseminación convencional, por lo que se podría asumir que si el ovocito es maduro, incluso en situaciones de número límite de ovocitos, sería igualmente apropiada la fecundación con inseminación convencional y con ICSI, dando un papel relevante al ovocito maduro en los resultados de reproducción asistida (137).

En resumen, se podría resumir el papel del tamaño del folículo en su significativo impacto tanto en la salud del ovocito como en la concentración de hormonas foliculares.

El estradiol sérico se relaciona también con la competencia ovocitaria y con la predicción de una normal fecundación. La concentración de estradiol sérico es mayor en pacientes con folículos que producen un ovocito en metafase II que llega a tener 2 pronúcleos.

El estradiol sérico es a menudo usado como un marcador del desarrollo folicular y de la actividad esteroideogénica de las células de la granulosa con la maduración folicular (9, 11, 151). Niveles de estradiol altos implicarían un global incremento en la actividad de las células de la granulosa, al ser también más elevado por folículo y por ovocito recuperado, por ello habría que considerarlo como marcador secundario, más que como elemento clave en la maduración citoplasmática.

La hiperestimulación ovárica controlada produce una elevación exagerada de los niveles de estradiol, seguida de una alteración en la concentración plasmática del ratio estrógenos-progesterona (7). Diversos autores han descrito que los niveles altos de estradiol o alteraciones en el ratio estrógenos-progesterona pueden condicionar la receptividad endometrial alterando la formación glandular y el periodo ventana de implantación. El impacto que esta elevación suprafisiológica de estradiol tiene sobre el ciclo es un tema de profundo debate. Hay autores que concluyen que niveles elevados de estradiol producen alteraciones en la receptividad endometrial y en la calidad embrionaria/ovocitaria (152). Y otros que no hallan diferencias en calidad ni en maduración ovocitaria en pacientes con distintos niveles de estradiol (<1500, 1500-3000, >3000 pg/ml), pero que encuentran tasas de implantación superiores con niveles elevados de estradiol

(153, 154). *Checa y cols* apoyan que niveles de estradiol suprafisiológicos más que afectar adversamente la calidad y el desarrollo de los ovocitos, pueden afectar a la receptividad endometrial (7).

5. CALIDAD EMBRIONARIA.

El método más habitual para valorar la calidad embrionaria es la utilización de parámetros morfológicos. El recurso a la morfología continúa siendo el sistema más extendido y eficiente (155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162).

Una vez recogidos todos los parámetros morfológicos, se ponderan y se establece una clasificación por categorías. La clasificación por puntuación presenta mayor dificultad para consensuar una ponderación adecuada a cada uno de los parámetros (101, 163, 164).

Recientemente se ha introducido una herramienta novedosa denominada *EmbryoScope*. El *Embryoscope* aporta un sistema de monitorización integrada en un seguro y controlado medio de cultivo que permite la adquisición de imágenes de alta resolución en lapsos de tiempo, posibilitando así la detección retrospectiva de acontecimientos críticos en el desarrollo embrionario(165). La monitorización por lapsos de tiempo en el *EmbryoScope* aporta un análisis morfológico, temporal y espacial del desarrollo embrionario sin perjudicar la calidad embrionaria ni modificar los resultados reproductivos. El *EmbryoScope* permite que la elección del embrión a transferir no esté basada sólo en el número de células o en el estudio morfológico del día de la transferencia(165).

La valoración morfológica en los estadios de día+2 y día+3 ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria.

Se ha evidenciado gran disparidad de criterios sobre calidad embrionaria entre los diferentes laboratorios, disparidad que se acentúa en la zona intermedia de la calidad (166). La ausencia de criterios comunes afecta tanto a los parámetros a evaluar como a los puntos de corte entre categorías, e incluso al algoritmo que define la categorización de la calidad embrionaria.

El intervalo de observación recomendado es de 44-47 horas para día+2 y de 67-71 horas para día+3, post-inseminación.

Los parámetros evaluados en la clasificación empleada en este estudio, en el estadio de día+2 y día+3, son diez (89):

1) Número celular y ritmo de división.

El número celular se emplea en transferencias en día+2 y el ritmo de división celular en transferencias en día+3 (ilustración 7).

Ilustración 7. NÚMERO DE CÉLULAS



Son escasos los estudios que pueden aportar un esquema claro asignando tasas de implantación diferentes para cada número celular o ritmo de división. En general, no se discrimina este parámetro de otros como la multinucleación, el punto de corte de fragmentación y la exclusión de observación en día+2, que pueden influir claramente en el potencial implantatorio (163, 167, 168).

Con los estudios actuales es posible agrupar los embriones en función de la tasa de implantación según el número de células observadas, de mejor a peor tasa de implantación: 4 células, 2 ó 5 células, 3 ó 6 células, 1 ó más de 6 células (ilustración 8). Si bien no se encuentran diferencias evidentes entre 2 ó 5 células, la presencia de 5 células tiende a aportar mejor tasa de implantación; situación que se repite en el grupo de 3 ó 6 células.

Ilustración 8. RITMO DE DIVISIÓN



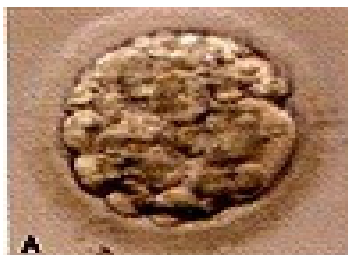
2) Porcentaje y tipo de fragmentación celular.

La gradación de mejor a peor tasa de implantación abarca desde fragmentación del 10% con mejor tasa de implantación, seguida del 11 al 25%, del 26 al 35%, y mayor del 35% o presencia de fragmentación tipo IV de *Alikani* con menores tasas de implantación (ilustraciones 9 y 10).

Ilustración 9. **FRAGMENTACIÓN APROXIMADA DEL 10 %.**



Ilustración 10. **FRAGMENTACIÓN SUPERIOR AL 35%**



La existencia de fragmentos celulares es común, y no necesariamente se correlaciona con una baja tasa de implantación. Cuando el grado de fragmentación es inferior al 20-25 %, la implantación del embrión no se ve comprometida (169, 170, 171, 172).

El tamaño y la distribución de los fragmentos se correlacionan también con la probabilidad de implantación (172). Existe un patrón de fragmentación, denominado “tipo IV” de *Alikani*, en el que predominan los restos de gran tamaño repartidos por todo el embrión con el que las posibilidades de implantación son escasas (132).

3) Desigualdad en el tamaño de los blastómeros.

Los blastómeros iguales o semejantes se asocian a mejores tasas de implantación que los blastómeros diferentes según criterios de *Hardason*.

Las células de las primeras divisiones mitóticas no siempre se dividen sincrónicamente y son simétricas. Un embrión con divisiones sincrónicas y simétricas presentará 2, 4, 8 ó 16 células de similar tamaño.

La división asimétrica se define por una diferencia entre los diámetros de los blastómeros mayor y menor del 20 %; lo cual se correlaciona con una disminución en el potencial implantatorio del embrión (167).

En caso de divisiones celulares asincrónicas (3,5,6,7,9.. células) coexisten células de dos ciclos celulares distintos, por lo que es esperable tamaños celulares diferentes (160).

La desigualdad de tamaño en los blastómeros podría ser compatible con una buena clasificación si:

3 células = 2 pequeñas + 1 grande

5 células = 2 pequeñas + 3 grandes

6 células = 4 pequeñas + 2 grandes

7 células = 6 pequeñas + 1 grande

Cualquier combinación de tamaño diferente implicaría divisiones asimétricas con distribución anómala de citoplasma entre las células resultantes.

4) Contorno del blastómero.

La existencia de un contorno irregular puede ser el resultado de una alteración fisiológica o ser un blastómero en división(173). Su relación con el potencial de implantación es difícil de valorar, por lo que no se ha incluido entre los criterios de selección.

5) Visualización de núcleos y grado de multinucleación.

La ausencia de blastómeros multinucleados se asocia a mejor tasa de implantación que la presencia de dichos blastómeros.

La presencia de dos o más núcleos o micronúcleos en una misma célula tiene una correlación directa con un aumento en la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias (167). El hallazgo de blastómeros multinucleados implica un incremento en la tasa de abortos (174).

6) Anillo/ halo acitoplasmático en día+3.

El anillo acitoplasmático aparece por la retracción del citoplasma que deja un amplio anillo translúcido sin organelas en la periferia del blastómero. Se relaciona con un proceso de lisis celular (129). La mejor tasa de implantación se da en ausencia de anillo acitoplasmático.

7) Presencia de vacuolas (ilustración 11).

Ilustración 11. EXISTENCIA DE VACUOLAS

A: Presencia de grandes vacuolas. B: Vacuola de aproximadamente 5 micrómetros.



En ausencia de vacuolas la tasa de implantación es mejor que con vacuolas escasas de diámetro < de 5 μm y, con estas pequeñas vacuolas la tasa de implantación es mejor que en presencia de vacuolas abundantes.

La existencia de vacuolas se asocia con una disminución del potencial de desarrollo. Sin embargo, no existen claras evidencias de relación entre la cantidad, tamaño o distribución de las vacuolas y la tasa de implantación. Vacuolas de < 5 μm de diámetro pueden no comprometer el desarrollo embrionario (129).

8) Zona pelúcida.

Las anomalías de la zona pelúcida son debidas a la falta de eclosión. Una zona pelúcida sana se define como aquella con una silueta redonda y de aspecto translúcido, de 17 μm aproximadamente de grosor no homogéneo, ausencia de doble capa por tabicación de la zona interna y ausencia de abultamientos (129, 175). La mejor tasa de implantación se da en presencia de una zona pelúcida normal.

9) Grado de compactación/adhesión temprana.

La compactación temprana es un signo de activación embrionaria que conlleva un contacto intercelular, la formación de uniones intercelulares y el inicio de la polarización embrionaria (129).

En la bibliografía no existen datos suficientes para poder incluir este parámetro en un esquema de clasificación embrionaria. Se ve influenciado por el protocolo y los medios de cultivo empleados.

10) *Pitting* o moteado.

Al igual que la adhesión celular, la aparición de este parámetro morfológico indica activación citoplasmática y debe acontecer en el momento fisiológico de la activación embrionaria en día+3 embrionario. No hay que confundirlo con una excesiva vacuolización (163).

Los parámetros incluidos en el sistema de clasificación embrionaria tomado como referencia fueron considerados por su relación con la tasa de implantación. Del resto de parámetros, es posible seleccionar algunos para proponer recomendaciones en la selección embrionaria.

En el proceso de selección más fina entre embriones de calidad morfológica similar, se consideraron los siguientes parámetros:

FAVORABLES:

- Ante la observación de un número de células diferente de 2,4,8 ó 16, debe haber 2 patrones de tamaño celular, correspondientes a una asincronía en la división.
- Presencia de uninucleación en todas las células.
- Inicio de adhesión, siempre que aparezca en día+3 y con pre-embryones de 7-8 células.
- Presencia de moteado en día+3.

DESFAVORABLES:

- Inicio de adhesión o de compactación en día+2.
- Compactación muy avanzada en día+3.
- 3 células del mismo tamaño en día+2.

ESQUEMA DE GRADACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA:

Las diferentes observaciones de un mismo embrión deben aportar información relevante para su clasificación. No se debe valorar a un embrión por una observación aislada en un momento puntual de su desarrollo. La categorización debe realizarse tras múltiples evaluaciones realizadas a lo largo de del desarrollo pre-implantacional.

Se han establecido 4 categorías divididas en función del potencial implantatorio esperado(89) (Ilustraciones 12- 18):

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

Ilustración 12. CALIDADES EMBRIONARIAS SEGÚN LA CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA ASEBIR 2007

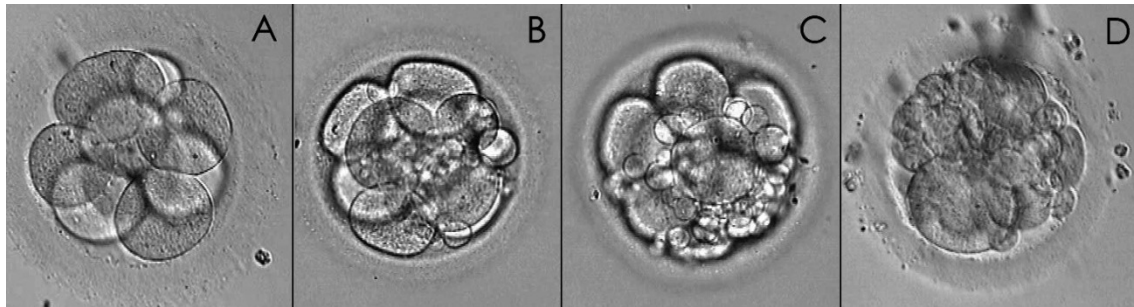


Ilustración 13. CLASIFICACIÓN DE CALIDAD EMBRIONARIA EN D+2 Y D+3 SEGÚN CRITERIOS DE ASEBIR

CALIDAD	Día transferencia	Nº de células (→ indica paso de D+2 a D+3)	% fragmentación	Semejanza de tamaño*	Multinucleación	Citoplasma	Zona pelúcida
A	D+2	- 4	- < 10% - No tipo IV	Iguales o semejantes	No	No vacuolas	Normal
	D+3	- 4 → 7-8					
B	D+2	- 2 ó 5** - 4 (si frag. 11%-25%)	- < 26 - No tipo IV				
	D+3	- 4 → ≥ 7-8 (si frag. 11%-25%) - 4 → ≥ 9					

* El patrón de semejanza o igualdad entre blastómeros sólo es valorable en estadios de 2,4,8 y 16 células.

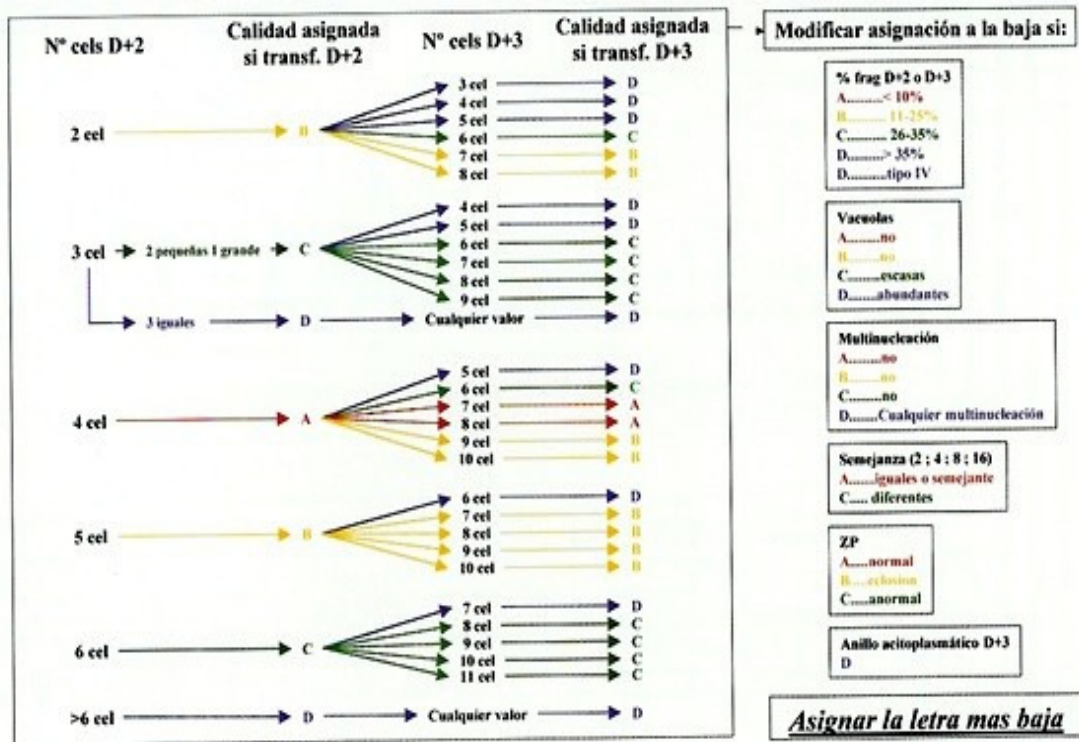
**Con preferencia a 5 células.

CALIDAD	Día transferencia	Nº de células (→ indica paso de D+2 a D+3)	% fragmentación	Multinucleación	Citoplasma	Siempre que exista
C	D+2	- 2 ó 6 (si frag. 26%-35%) - 3* ó 6**	- < 35% - No tipo IV	No	No o escasas vacuolas	- Desigualdad en el tamaño celular. - Vacuolas escasas - Zona pelúcida anormal sin eclosión asistida***
	D+3	- 2 ó 4 ó 5 → >7 (si frag. 26%-35%) - 6 → ≥8 (si frag. <35%) - 2 ó 4 → 6 - 3* → >6				
D	D+2	- 1 ó >6 - 3 (células semejantes)				- Multinucleación. - Vacuolas abundantes. - Fragmentación >35. - Fragmentación tipo IV. - Anillo acitoplasmático D+3
	D+3	- 1 ó > 6 → cualquier valor - cualquier valor → <6 - De D+2 a D+3 sólo ha aumentado 1 célula				

* 1 célula grande y 2 pequeñas.** Con preferencia a 6 células.

*** Si la única alteración es la ZP anormal se considerará preembrion de calidad C. Si se realiza eclosión asistida pasa a calidad B.

Ilustración 14. CLASIFICACIÓN DE CALIDAD EMBRIONARIA EN D+2 Y D+3 SEGÚN CRITERIOS DE ASEBIR



Opción 1. Para transferencias en D+2 y D+3

Ilustración 15. **CALIDAD EMBRIONARIA CATEGORÍA A EN D+2** (imagen de la izquierda) **Y D+3** (imagen de la derecha)

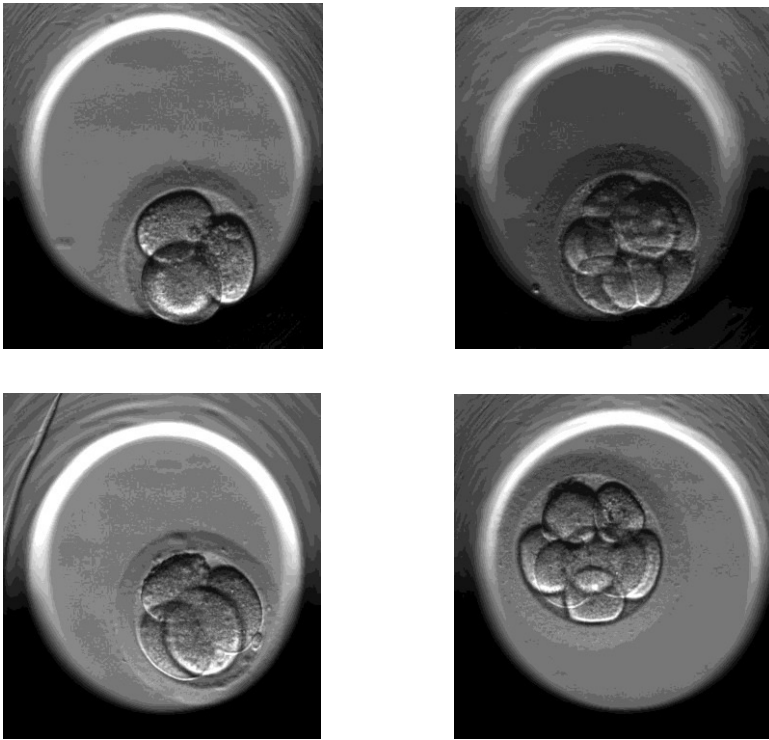


Ilustración 16. **CALIDAD EMBRIONARIA CATEGORÍA B EN D+2** (imágenes de la izquierda) **Y D+3** (imágenes de la derecha)

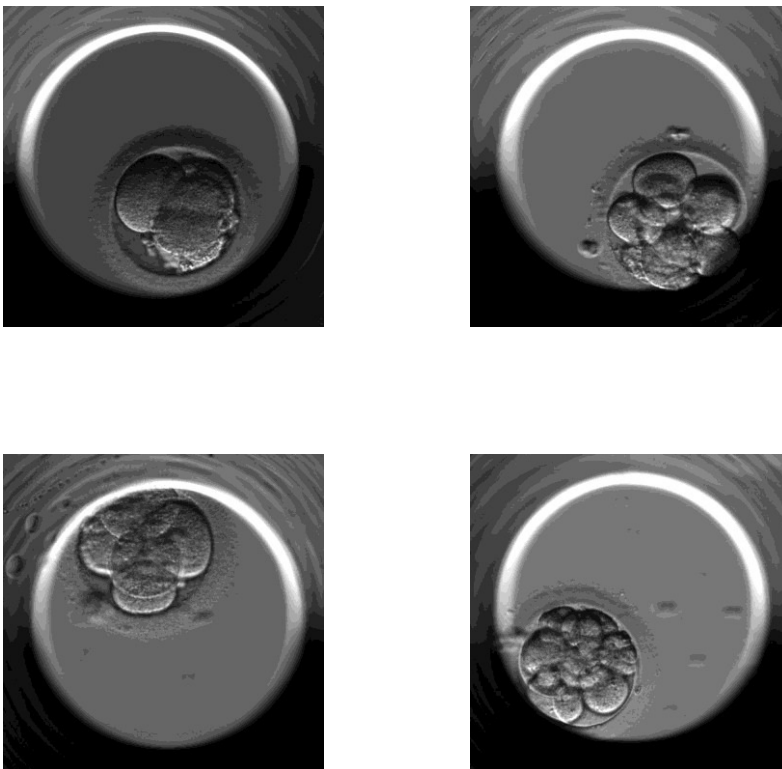


Ilustración 17. CALIDAD EMBRIONARIA CATEGORÍA C EN D+2 (imágenes de la izquierda) Y D+3 (imágenes de la derecha)

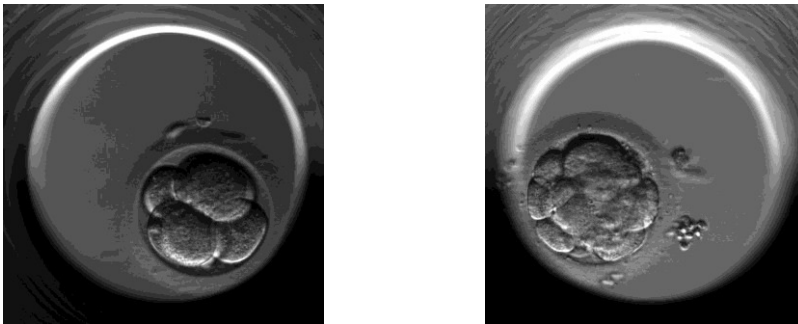
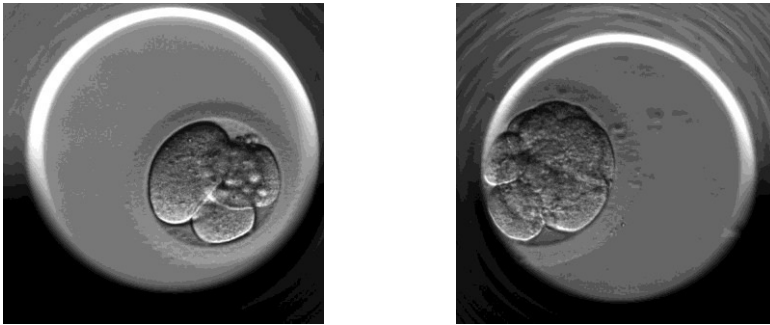
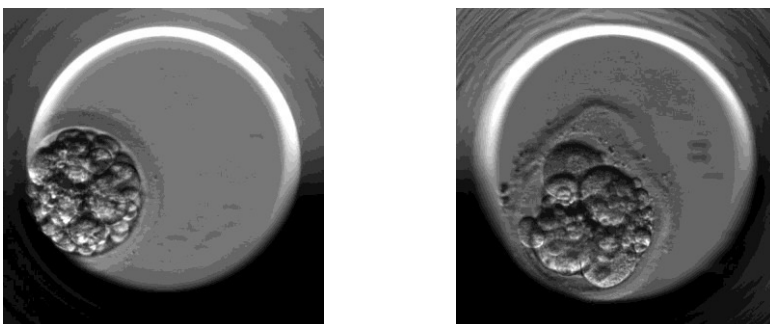
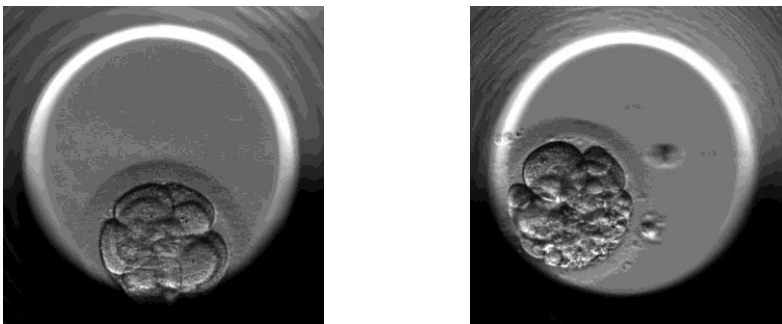


Ilustración 18. CALIDAD EMBRIONARIA CATEGORÍA D EN D+2 (imágenes de la izquierda) Y D+3 (imágenes de la derecha)



6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS:

Los primeros estudios realizados en este campo mostraron que la estimulación de las células de la granulosa por la FSH es un proceso andrógeno-modulado *in vitro*, y en trabajos más recientes en ovarios de primates, se ha sugerido que los andrógenos pueden influir en la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas (176, 177).

Los andrógenos son productos del metabolismo de la progesterona y actúan como un sustrato esencial para la producción de estrógenos vía modelo de 2 células/2 gonadotropinas (70). Además, el papel fisiológico de los andrógenos en la función ovárica implica también la contribución de los mismos en la regulación paracrina de la maduración y atresia folicular (178). La distribución de los receptores de andrógenos en las células de la granulosa es mucho mayor en folículos preantrales y antrales que en folículos pre-ovulatorios, por lo que se puede postular que la reducción en el número de receptores de andrógenos serviría para proteger a las células de la granulosa contra la acción inhibitoria androgénica, asegurando la dominancia folicular preovulatoria (178).

En relación a la función folicular, los andrógenos han sido mostrados como agentes con acciones positivas y negativas dependiendo del modelo experimental.

La mayor parte de los datos estudiados sobre la acción local de los andrógenos como reguladores de la función ovárica provienen de murinos. De modo interesante, el tratamiento con testosterona y dehidroepiandrosterona en ratas intactas conduce a alteraciones en el ciclo celular de las células de la granulosa y a atresia folicular, mientras la administración de antagonistas androgénicos a animales hipofisectomizados, amplifica los efectos de estimulación de la FSH, lo que indica que los andrógenos endógenos son antagonistas en la función ovárica estimulada por gonadotropinas (179, 180, 181, 182). Por lo tanto, la mayor parte de estudios en ovarios murinos conducen al concepto de que los andrógenos inducen atresia. Sin embargo, un estudio reciente en ratones ha mostrado que el incremento en los andrógenos y en la expresión génica de los receptores de andrógenos por folículos pequeños se asoció con un aumento en la expresión de receptores de FSH. Así, se revela que los receptores de andrógenos promueven el

crecimiento folicular preantral y previenen la atresia folicular siendo esenciales para el desarrollo folicular normal y para la fertilidad (183). Todo ello está basado en los resultados con ratones *knock-out* para receptores de andrógenos ovario-específicos que presentaron fallo ovárico prematuro y subfertilidad, con ciclos más largos y pocos ovocitos ovulatorios(183).

Este concepto, sin embargo, no puede ser extrapolado a primates. Una serie de estudios en macacos ha indicado que los andrógenos son reguladores positivos del desarrollo folicular y muestran un efecto sinérgico con la FSH en la foliculogénesis (184). De forma destacable, se ha publicado que la administración de DHT o testosterona durante 3-10 días aumenta la expresión del receptor de FSH en las células de la granulosa(185, 186), promueve el inicio del crecimiento de los folículos primordiales y aumenta los niveles de IGF-1 (187) y además incrementa el número de folículos preantrales y antrales pequeños en crecimiento (188). La expresión del receptor de andrógenos se incrementa en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales y desciende en las células de la teca interna y del estroma de monos tratados con testosterona (185). Los folículos pre-ovulatorios (>1 cm) sin embargo, no se ven incrementados en los animales tratados con andrógenos. En estos animales tratados, la atresia folicular no se incrementa y existe un menor fenómeno de apoptosis en las células de la granulosa (188). Globalmente, estos estudios sugieren que el tratamiento con andrógenos, al menos durante un corto periodo de tiempo, promueve el desarrollo folicular y la biosíntesis de estrógenos por vía indirecta, mediante la amplificación de los efectos de la FSH en el ovario, apoyando el efecto positivo en la función folicular en modelos farmacológicos o patológicos.

El concepto de que los andrógenos son inductores de atresia, derivado de estudios en ovarios murinos, es difícil de reconciliar con la experiencia en humanos. Las pacientes con hiperandrogenismo presentan un mayor desarrollo folicular que las mujeres con ciclos normales sugiriendo que sus células de la granulosa son especialmente sensibles a la estimulación con FSH (188, 189). Así, los casos de síndrome de ovario poliquístico muestran estos cambios a nivel folicular como resultado de la exposición a andrógenos ováricos, y a andrógenos extra-ováricos en casos de hiperplasia congénita suprarrenal o en tumores productores de

andrógenos (184). En humanos y ovejas, el patrón de expresión de receptores de andrógenos en células de la granulosa es diferente al de murinos y primates. Se ha documentado que los receptores de andrógenos presentan una distribución más fuerte en folículos preovulatorios que en folículos más pequeños (183). Sin embargo, desde que los receptores de andrógenos en mujeres aparecen con expresión predominante en folículos pre-ovulatorios (190), surgen dudas sobre la sensibilidad a la FSH y la potenciación de la respuesta folicular en folículos pequeños en humanos. *Nielsen y cols* llevan a cabo un estudio en corteza ovárica criopreservada para determinar la expresión de ARNm de receptores de andrógenos en folículos antrales normales pequeños correlacionándolo con la expresión de ARNm de receptores de FSH (191). Sus datos muestran que la expresión génica del receptor de FSH en las células de la granulosa de folículos ≤ 9 mm estuvo significativamente asociada con la expresión génica del receptor androgénico en dichas células y, además significativamente asociada con las concentraciones intrafoliculares de andrógenos (androstendiona y testosterona). Es poco probable que la acción androgénica sea directa. Podría ser que los andrógenos en líquido folicular influyan en la estabilidad del ARNm del receptor de FSH o bien actúen por efecto indirecto, quizá aumentando la producción de IGF-1 o inhibina B (187). Todo ello sugiere el efecto colectivo de los andrógenos como promotores de la respuesta a gonadotropinas en el desarrollo folicular humano (191).

Es interesante además reseñar que la expresión del ARNm del receptor II de la hormona antimulleriana está también significativamente asociada a la expresión del ARNm de los receptores androgénicos. Por lo que este receptor de la hormona antimulleriana parece también estar involucrado en la complicada regulación del desarrollo y crecimiento folicular (191).

El hecho de que los andrógenos y la expresión génica de los receptores de andrógenos promuevan la expresión de receptores de FSH, en folículos humanos añade otro elemento regulador al complejo de 2 células-

-2 gonadotropinas en la síntesis de estradiol folicular. Ello sugiere que la propia estimulación de FSH es un prerrequisito para que la acción androgénica sea efectiva (191).

En base a que la exposición temporal de los folículos a niveles altos de andrógenos puede aumentar su respuesta a FSH, LH y hCG, mediante la administración de DHEA, testosterona o inhibidores de la aromatasa, se han hechos muchos estudios en pacientes, principalmente con reserva ovárica disminuida, obteniendo resultados inconclusos (192, 193, 194, 195, 196, 197)

En escenarios clínicos, se ha publicado que el suplemento con DHEA (198) o con letrozol (inhibidor de la aromatasa que induce un cúmulo temporal de andrógenos intraovario permitiendo la inducción de receptores de FSH en las células de la granulosa por acción de dichos andrógenos) (199) (200), incrementa los niveles de estradiol y/o mejora la respuesta folicular al tratamiento con gonadotropinas.

El pretratamiento con un bolo de hCG en co-administración con un inhibidor de la aromatasa para prevenir la conversión de andrógenos a estrógenos supone un aumento en el número de embriones tras estimulación ovárica y FIV, apoyando el concepto de que los andrógenos pueden potenciar el desarrollo folicular y la expresión de receptores de FSH en humanos (201).

7. SUPLEMENTO ANDROGÉNICO:

La baja respuesta a la estimulación ovárica frecuentemente es reflejo de un declive edad-dependiente en la capacidad reproductiva (pacientes añosas con un perfil endocrino anormal), pero el mismo fenómeno puede ocurrir en pacientes jóvenes (202, 203, 204). Algunas pacientes de este grupo, se engloban en el llamado “fallo ovárico oculto” evidenciado por concentraciones séricas elevadas de FSH (205); sin embargo, otras pacientes presentan concentraciones séricas de FSH normales, sin aparente razón para una baja respuesta repetitiva a protocolos agresivos de estimulación ovárica. Durante el avance de las técnicas de reproducción asistida, el manejo de estas pacientes jóvenes con perfil hormonal normal ha sido uno de los puntos más decepcionantes en medicina reproductiva. Independientemente del protocolo de estimulación empleado, la tasa de embarazo es baja en estas pacientes, a menos que la pareja recurra a la difícil decisión de la donación ovocitaria (203, 206, 207, 208).

El suplemento con andrógenos se plantea como opción válida para mejorar los resultados reproductivos en este colectivo de pacientes.

Balasch y cols en 2006, soportan con sus resultados el efecto sinérgico de los andrógenos con la FSH en el crecimiento y desarrollo folicular(204) . El 80% de pacientes con baja reserva sometidas a un pre-tratamiento con 20 mcg/kg diarios de testosterona transdérmica, durante los 5 días previos al tratamiento con gonadotropinas, llegan a punción folicular, siendo la cantidad total de gonadotropinas requeridas menor a la empleada en los dos ciclos previos cancelados. Se elige la administración de baja dosis de testosterona y en un corto periodo de tiempo en base a los experimentos citados en monos que mostraron que los andrógenos consiguen un realce en la supervivencia y crecimiento folicular (185, 186, 187, 188). Asumiendo que son 3 meses los mínimos necesarios para que un folículo primordial alcance la etapa preovulatoria (209), se afectarían más los eventos tempranos implicados en la maduración folicular que las etapas tardías en dicho estudio. Para apoyar esta hipótesis, en este trabajo se basan en los hallazgos en primates sobre la distribución de la expresión del receptor de andrógenos restringida a folículos pre-antrales tardíos y antrales (178, 185).

El recuento de folículos antrales se incrementó durante el tratamiento con testosterona y el número de folículos válidos para el reclutamiento y desarrollo en el momento del inicio de la estimulación con FSH, fue mayor en los ciclos que llegaron a punción folicular. Finalmente, el tratamiento con andrógenos promueve la acción de la FSH en los folículos reclutados tal como sugiere el incremento de los niveles séricos de androstendiona e IGF-1 (ambos considerados como marcadores de respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas) en ciclos que llegan a punción en contraste con los ciclos cancelados (204). Los niveles séricos de LH fueron más bajos en los ciclos que llegan a punción, teniendo múltiples folículos en crecimiento durante la estimulación ovárica (204). Esto podría explicarse en base a que, durante la inducción de la ovulación, los estrógenos y las inhibinas estimulados por las gonadotropinas, ejercen un efecto *feed-back* en el eje hipotálamo-hipófisis reduciendo la secreción endógena de gonadotropinas y, siendo este *feed-back* más evidente cuando el desarrollo folicular es múltiple (204). Hasta el momento, no se puede precisar si los andrógenos son folículo-rescatadores o simplemente incrementan el número de folículos reclutados. El pico de testosterona sérico alcanzado en este estudio fue mayor que el límite superior en mujeres normales en edad reproductiva (204).

Además, otros dos estudios han publicado una correlación positiva entre los niveles de testosterona séricos y, algunos parámetros de estimulación ovárica en ciclos de FIV, entre ellos un mayor número de ovocitos recuperados (210, 211).

Sin embargo, son precisos nuevos estudios para confirmar todo ello, pues existen trabajos en la literatura que no hallan efectos beneficiosos de la aplicación de testosterona en la respuesta del ovario a la FSH (184). Tal vez, los diferentes criterios de selección y los diferentes protocolos usados (agonistas y antagonistas de GnRH) podrían justificar las diferencias. *Hugues* selecciona pacientes con picos de estradiol <1 200 pg/ml y con un número total de ovocitos recuperados < 5 en el ciclo previo, junto con FSH elevada en el tercer día. Además, las altas dosis de testosterona empleadas (10 mg/día) y durante 15 días previos a la estimulación con FSH, también podrían tener influencia en los hallazgos dispares entre ambos estudios. Con esas mismas dosis y tiempo de testosterona y con los mismos criterios de inclusión de pacientes, *Massin y cols* tampoco hallan efectos

beneficiosos de la testosterona en la respuesta ovárica a la FSH en bajas respondedoras previas (192).

Hay que considerar el potencial efecto deletéreo de esos altos niveles de testosterona si se mantienen durante un periodo de tiempo mayor de 5 días. La dosis diaria, el tiempo y la duración del suplemento con andrógenos pueden ser críticos para una estimulación adecuada de la foliculogénesis, principalmente considerando un estudio en monos *Rhesus* que muestra que la administración crónica de altas dosis de andrógenos (durante 5 días antes y continuando durante el tratamiento de FSH y LH 15 días) es antagonista de la función ovárica estimulada por gonadotropinas en primates (212). Se ha postulado que los efectos androgénicos de acción antagonista pueden ser manifestados a concentraciones elevadas. También, serían dosis-dependiente las interacciones que parecen existir entre FSH y testosterona, tales como la capacidad de la testosterona para interferir en la función ovárica FSH-estimulada, que puede ser enmascarada bajo los altos niveles de FSH (212).

Fabregues y cols en 2009 publican el primer estudio randomizado en pacientes con baja reserva ovárica, definida por la cancelación de un ciclo previo con baja respuesta, estableciendo dos grupos de estudio; uno al que administra un pre-tratamiento con testosterona transdérmica previo a la estimulación con gonadotropinas, y otro al que administra altas dosis de gonadotropinas. En el grupo de tratamiento con testosterona, fue mayor el porcentaje de pacientes que llegó a punción folicular, con duración y cantidad de gonadotropinas menor que en el otro grupo. Este efecto beneficioso de la testosterona se apreció tanto en pacientes con FSH elevada como en pacientes con FSH normal. Sin embargo, en mujeres con FSH elevada, la proporción de pacientes que llegó a punción folicular fue la misma en ambos grupos, lo que sugiere que el potencial beneficio de la testosterona puede ser significativamente modificado en esta subpoblación de pacientes (213).

Durante la inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas (menotropinas), la DHEA es la pre-hormona para alcanzar el 48 % de la testosterona del líquido folicular (214), que es, a su vez, la pre-hormona para la producción de estradiol. La DHEA circulante procede de la zona reticularis adrenal

(50%), de la teca ovárica (20%) y de la conversión periférica de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) (30%), mientras que la DHEAS es casi exclusivamente de origen adrenal (90%). La DHEAS plasmática supone el 48% de la testosterona intrafolicular y el 25 % de DHEA, que es también precursor de la testosterona y la androstendiona (214, 215). Además, tanto DHEA como DHEAS aparecen como importantes para la biosíntesis de estrógenos y andrógenos foliculares.

La DHEA es la mayor fuente de síntesis de andrógenos en la mujer siguiendo su conversión vía androstendiona a testosterona (216) y la DHEA exógena puede servir como una herramienta de reemplazo androgénico en mujeres (216). El 25,8% de los clínicos dedicados a reproducción asistida en 45 países añaden DHEA como adyuvante en los protocolos de tratamiento de mujeres con baja respuesta ovárica (*IVF Worldwide Survey, 2010*), a pesar de la insuficiente evidencia actual para recomendarlo (217).

El suplemento con DHEA mejora la respuesta a la estimulación ovárica con gonadotropinas por aumento en el número de ovocitos reclutados y de embriones, incrementa también la calidad embrionaria y ovocitaria, mejora las tasas de embarazo, tanto espontáneo como por FIV, y acelera el tiempo de concepción (194, 196, 198, 218). Estos resultados se obtuvieron de la comparación de ciclos de FIV antes y después de la administración de 75 mg diarios orales de DHEA durante 18 semanas en pacientes con reserva ovárica disminuida ($\text{FSH} > 10 \text{ mUI/ml}$ o $\text{estradiol} > 75 \text{ pg/ml}$, y obtención de < 4 ovocitos en el ciclo previo y con pobre calidad embrionaria) (196).

Artini y cols hallan un mayor número de ovocitos maduros en folículos seleccionados de pacientes con baja reserva tras la administración de 25 mg de DHEA tres veces al día durante tres meses previos a la estimulación ovárica. Sin embargo, no obtuvieron diferencias en el número de ovocitos recuperados ni en el número de ovocitos fecundados ni en el número de embriones transferidos entre pacientes a las que se administró DHEA y pacientes a las que no. La duración media del ciclo de estimulación sí que fue más corta en el grupo de pacientes a las que se administró DHEA (219).

El primer estudio randomizado con suplementos de DHEA en pobres respondedoras ha mostrado una mejora acumulativa en la tasa de recién nacido vivo en el grupo de DHEA (220).

Un meta-análisis reciente sobre andrógenos adyuvantes (DHEA y testosterona) en mujeres con pobre respuesta ovárica aporta una tasa significativamente mayor de embarazo y recién nacido vivo (221).

La DHEA afecta positivamente a la función ovárica. El mecanismo por el cual ejerce estos efectos es aún desconocido. Se ha sugerido que dichos efectos podrían ser mediados por el incremento de factores de crecimiento insulínicos (IGF-1), debido bien a un aumento en su producción o bien a la producción hepática disminuida de la proteína transportadora de IGF-1 por efecto androgénico (198). Debido al efecto pico de la DHEA a los 4-5 meses, que es el periodo de tiempo similar al del ciclo de reclutamiento folicular completo, se postula también sobre su efecto en dicho reclutamiento folicular, posiblemente mediado vía efecto supresión de la apoptosis (194, 196). Además, la DHEA, basado en la teoría de dos células/dos hormonas, es un sustrato esencial para la esteroidogénesis, por lo que si sus niveles son anormalmente bajos, el sustrato para la producción de androstendiona, testosterona y estradiol quedaría disminuido (196).

Bien los andrógenos aumentados sistemáticamente por la administración de DHEA o bien incrementados localmente por la estimulación de la propia producción androgénica ovárica (por ejemplo, estimulación LH o hCG en combinación con inhibidores de la aromatasa que bloquean la conversión de andrógenos en estrógenos) hacen a los folículos más sensibles a FSH (191).

La DHEA ha demostrado un incremento dosis dependiente en la tasa de ovulación (222). El tratamiento con andrógenos incrementa la cantidad de ARNm del receptor de FSH en folículos preovulatorios sugiriendo que el efecto androgénico podría ser causado por una regulación al alza de la expresión del receptor de FSH (222).

Y, según un estudio piloto, de insuficiente poder estadístico, también existe la posibilidad de que la DHEA pueda reducir las aneuploidías embrionarias (223).

Gleicher y cols publican que la tasa de aborto en pacientes con baja reserva ovárica después del suplemento con 25 mg de DHEA, 3 veces al día durante al menos 2 meses, es significativamente menor en todas las edades, pero más pronunciado por encima de los 35 años de edad. Y este descenso supone que las tasas de aborto no sólo son menores que en la población media de FIV sino que son comparables a las tasas publicadas en población fértil normal (223, 224, 224).

La mayor tasa de aborto en pacientes con baja reserva ovárica está bien documentada (225). La calidad embrionaria y ovocitaria es reflejo de la ploidía. Más embriones euploides conducen a más embarazos. La tasa de aneuploidías incrementa con la edad, llegando hasta el 90% a los 40 años (158, 225, 226, 227). El envejecimiento ovárico prematuro, sin embargo, mantiene las tasas de aneuploidías específicas por edad, siendo las tasas de embarazo e implantación las esperadas según su rango de edad. Así, incluso aunque significativamente afectas de una reserva ovárica prematuramente disminuida, el menor beneficio con el suplemento de DHEA en pacientes por debajo de los 35 años, no sorprende. El estudio de *Gleicher y cols*, al ser retrospectivo, no prueba que la DHEA disminuya las tasas de aborto o aneuploidías, pero ofrece suficiente evidencia para sugerir que la DHEA podría tener ciertos efectos relevantes que requerirían nuevas investigaciones (223, 224).

Al comparar pacientes jóvenes (<35 años) con baja reserva ovárica con pacientes con reserva ovárica normal, se aprecia un descenso en el cultivo de ovocitos y embriones en los casos de baja reserva ovárica, lo que demuestra una tasa de embarazo acumulada reducida (223, 228). Aunque las mujeres infértiles con reserva ovárica normal experimentan menos tasa de aborto que las pacientes con baja reserva ovárica, éstas sufren más abortos que la población general (225, 229).

Es importante resaltar que el suplemento con DHEA aparece como seguro y conlleva mínimos efectos secundarios. Es un andrógeno medio, pero se convierte en testosterona (y estradiol), por lo que pueden aparecer efectos tales como piel grasa, acné vulgar y caída de cabello. La gestación es un estado de elevación de andrógenos/DHEA (230), y las mujeres con síndrome de ovario poliquístico también presentan un estado de altos niveles de andrógenos/DHEA (231) y no dan

a luz a hijas con genitales externos masculinizados, lo que sugiere que bajas dosis de DHEA deben ser seguras.

La preferencia del uso de DHEA sobre otras preparaciones androgénicas podría estar justificada por los resultados de DHEA en niveles más fisiológicos comparados con el suplemento de testosterona, que resulta en niveles de andrógenos suprafisiológicos(232).

El tratamiento con letrozol mejora la respuesta folicular a la estimulación con gonadotropinas, lo que se evidencia con una significativamente más baja dosis de FSH requerida para obtener más folículos maduros (200). Tras la administración de 2,5 mg de letrozol diarios durante los 5 días previos a la estimulación, se aprecia un aumento de los niveles intraováricos de testosterona y androstendiona que se manifiesta en un incremento en el número de folículos maduros (>18mm) y de ovocitos recuperados, y en mayores tasas de implantación (199).

Los datos existentes hasta el momento sugieren un potencial beneficio del suplemento con andrógenos pero no son suficientemente concluyentes para garantizar un cambio inmediato en la práctica clínica (217). La mayor parte de los estudios existentes son pequeños y muestran una importante heterogeneidad clínica y metodológica(217).

Se podría concluir que son precisos nuevos estudios que evalúen de forma adecuada la eficiencia, los efectos secundarios y la seguridad de este suplemento. Además es necesario un acuerdo en cuanto a la dosis y duración del pretratamiento con andrógenos y el conocimiento del estado androgénico previo de las pacientes (217).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

La comunidad científica está de acuerdo en que el factor clave en el éxito de la fecundación mediante ICSI es el ovocito sano. Nuestra hipótesis es que el líquido folicular que rodea al ovocito es fundamental en la salud ovocitaria y que los niveles de hormonas esteroideas (estradiol, progesterona y andrógenos) son buenos indicadores adicionales de maduración ovocitaria además del tamaño folicular o el estradiol sérico empleado en la práctica clínica habitual.

Creemos que en los folículos de los que se obtiene un ovocito que es fecundado con éxito existen concentraciones mayores de estradiol, progesterona y andrógenos que en aquellos folículos con fecundación fallida, y que este beneficio puede ampliarse a una mejor calidad embrionaria y mayores tasas de gestación.

Planteándonos la hipótesis que un microambiente folicular inadecuado puede afectar negativamente al desarrollo folicular y/o ovocitario tratamos de alcanzar los siguientes objetivos:

- Relacionar los niveles hormonales de esteroides en líquido folicular **de cada folículo individual** con la madurez ovocitaria, la capacidad de fecundación, la calidad embrionaria, las tasas de embarazo (implantación) y las tasas de recién nacido vivo.
- Relacionar los niveles hormonales de esteroides en líquido folicular de **cada paciente** con las características del ciclo de estimulación y los resultados globales del ciclo.
- Mejora y optimización de los resultados de fertilidad gracias a la recogida, almacenamiento y estudio del líquido folicular extraído a la vez que la recuperación del ovocito.

- Alcanzar un mejor entendimiento de la biología hormonal folicular implicada en la competencia ovocitaria tras estimulación ovárica.
- Establecer las diferencias de concentraciones hormonales esteroideas en líquido folicular **interfolículo e interpaciente**.

MATERIAL Y MÉTODO:

MATERIAL Y MÉTODO:**SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS PARTICIPANTES. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Se incluyeron en el estudio pacientes con edad comprendida entre 25 y 38 años normorrespondedoras, con esterilidad tubárica, de origen desconocido o de causa masculina. El índice de masa corporal fue inferior a 30 en todos los casos.

Las pacientes con niveles de FSH basal superiores a 11 UI/l y estradiol sérico mayor a 60 pg/ml determinados en el 2 a 5º día del ciclo, sugestivas de posible fallo ovárico, fueron excluidas.

Se excluyeron igualmente del estudio el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP), la endometriosis o cualquier índole de factor ovárico por su posible interferencia en los niveles de hormonas esteroideas.

Todas las pacientes incluidas presentaron indicación médica para fecundación *in vitro* o microinyección espermática.

Como técnica de reproducción asistida se les ofreció la ICSI a todas las pacientes en estudio de esterilidad seguidas en el Servicio de Reproducción del Hospital La Paz desde febrero de 2011 a febrero de 2013 que cumplieron los criterios de inclusión con el objetivo de realizar un estudio clínico prospectivo observacional. Las pacientes candidatas al estudio fueron incluidas de forma consecutiva para evitar sesgos de selección. A todas las pacientes se les entregó el consentimiento informado de ICSI y el consentimiento informado específico del estudio por separado (ANEXOS 1 y 2).

ESTIMULACIÓN OVÁRICA, INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN Y APOYO DE FASE LÚTEA.

Todas las pacientes se sometieron al protocolo largo con agonistas de GnRH. La gonadotropina empleada para la estimulación fue FSH recombinante (rFSH). La supresión hipofisaria se lleva a cabo mediante *Decapeptyl®* (acetato de triptorelina; IPSEN PHARMA S.A., Barcelona (España)) 0,1 mg diario subcutáneo. El tratamiento se inició en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior (día 22 del ciclo), reduciendo la dosis a la mitad con la llegada de la menstruación y continuando su

administración hasta el día de inyección de hCG. La estimulación con gonadotropinas comenzó cuando las concentraciones de estradiol sérico descendieron a cifras < 50 pg/ml y la ecografía transvaginal mostró ausencia de folículos > 10 mm de diámetro que suele ser aproximadamente el día 15 después del inicio del tratamiento. La duración de este tratamiento osciló entre 18 y 25-30 días por ciclo.

La estimulación con rFSH se administró de acuerdo a una base individual de respuesta ovárica, medida por ecografías transvaginales seriadas y mediciones de estradiol sérico. Se inició tras comprobar el frenaje ovárico y se realizó con *GonalF*® (Serono S.A.; Madrid, España) o con *Puregon*® (MERCK SHARP & DOHME, EEUU).

El criterio para la administración de hCG (250 mcg, *Ovitrelle*®; Merck-Serono S.A., Ginebra, Suiza) fue la presencia de 2 o más folículos > 18 mm de diámetro en asociación con niveles séricos de estradiol consistentes. La determinación de los niveles de estradiol se empleó como ayuda en la toma de decisiones (estradiol sérico de 300 pg/ml por cada folículo que alcance un diámetro medio de 17 mm).

La fase lútea se apoyó con progesterona vaginal micronizada (200 mg/12 h) iniciada el día de la punción folicular y continuándola bien hasta la menstruación o bien hasta embarazo en el que se evidenció latido cardíaco, momento en que se disminuyó la dosis a la mitad manteniéndolo hasta la semana 12 de gestación.

Como características del ciclo de estimulación, se evaluaron los días de GnRH y los días de estimulación ovárica, la dosis de rFSH empleada y el pico de estradiol el día de la administración de hCG.

MEDIDA DEL TAMAÑO FOLICULAR Y RECOGIDA DEL OVOCITO:

El crecimiento folicular se monitorizó por ecografía transvaginal y los folículos se midieron considerando el diámetro medio en dos dimensiones.

A las 36 horas de la administración de hCG, se realizó la aspiración folicular ecoguiada de los complejos ovocito-corona-cumulus y del líquido folicular (ilustración 19).

Ilustración 19. PUNCIÓN FOLICULAR ECOGUIADA



El mismo equipo compuesto por cinco personas realizará todas las mediciones y punciones.

Para la punción folicular se requirió, además de un ecógrafo con sonda vaginal (modelo HD3 de Philips, BG Eindhoven Holanda) y de una aguja de punción fijada al transductor por medio de una guía de punción, una bomba de vacío de regulación continua y un bloque térmico. La bomba de vacío (modelo Labotect Aspirator 4014, Gottingen, Alemania) proporciona una presión negativa de 140 mmHg, sin llegar a alcanzarse una presión real en la punta de la aguja superior a 120 mmHg debido a la pérdida de presión por el sistema. Dicha bomba va conectada a un tubo de poliestireno (modelo Falcon, Becton-Dickinson-Maryland, EEUU) de 10 cm, con un diámetro interno de 1,7 cm y una capacidad de 15 ml por medio de un catéter de teflón de 50 cm, adaptado a una cánula que acaba en un tapón de silicona que cierra el tubo. El bloque térmico donde se colocan los tubos de aspiración de forma que el contenido folicular no cambie de temperatura durante la aspiración, estuvo regulado a 37°C.

Cada folículo se aspiró individualmente. El primer y segundo folículo de cada ovario se aspiró y fue recogido. Los folículos seleccionados presentaron un tamaño idóneo y características ecográficas homogéneas (contorno regular, contenido econegativo). Cada folículo fue puncionado con una aguja de luz única de 25-35 mm de longitud y con un diámetro de 1-1,5 mm, vaciándolo de forma lenta hasta colapsarse completamente. Previamente a la punción del siguiente folículo seleccionado del otro ovario se lavó la aguja con medio RPMI 1640 de GIBCO evitando así la posible contaminación.

El líquido folicular se depositó en un tubo cónico estéril Falcon de 15 ml. Dicho líquido se traspasó a placas de petri de Falcon 100 y se identificó la existencia de ovocito, realizándose el cultivo posterior individual de los mismos.

El volumen de líquido aspirado por folículo individual fue anotado y correlacionado con el correspondiente tamaño del folículo como describió *Wittmaack* (141).

Si el líquido contuvo sangre en cantidad importante la muestra fue excluida del estudio. La muestra de líquido folicular fue limpiada por centrifugación, trasladada a un tubo Falcon de 5 ml y ubicada a -70°C para posterior análisis.

ANÁLISIS DE HORMONAS EN LÍQUIDO FOLICULAR:

La concentración de hormonas se cuantificó mediante inmunoanálisis quimioluminiscente con Kits comerciales con coeficiente de variación intraensayo $<15-20\%$.

Se midieron: estradiol (ng/ml), progesterona ($\mu\text{g/ml}$), testosterona (ng/dl) y DHEA-S (mg/dl). Se llevó a cabo un estudio de linealidad para verificar la dilución necesaria y se hizo un estudio de repetibilidad previo para validar los test empleados en su uso en líquido folicular.

Estradiol, testosterona y progesterona se midieron mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia en un Architect i2000 (Abbott Laboratories, Philippines Mandaluyong City). La DHEA-S se midió mediante inmunoensayo por

quimioluminiscencia en un IMMULITE® 2000 immunoassay system (SIEMENS, Erlangen, Germany).

Se utilizó la tecnología de inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes como método de detección tanto de medida como de cuantificación de la concentración de las distintas hormonas.

El sistema ARCHITECT para hormonas es un inmunoanálisis de dos pasos que utiliza tecnología de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas con protocolos de ensayo flexibles, denominados Chemiflex, para la determinación de la presencia de hormonas. En el primer paso se combinan la muestra, el diluyente de ensayo y las micropartículas paramagnéticas recubiertas de un anticuerpo específico para el analito a determinar. La hormona presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas del anticuerpo específico. Después del lavado, en el segundo paso, se añade el conjugado de antihormona marcado con acridino. Las soluciones pre activadora y activadora se añaden a la mezcla de reacción produciéndose la reacción quimioluminiscente, la cual se mide en unidades relativas de luz (URL). Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de hormona presente en la muestra y la URL detectadas por el sistema óptico del ARCHITECT i2000. El sistema IMMULITE funciona de modo similar.

Las diluciones fueron llevadas a cabo antes de la medida de estradiol (1:1 000) y progesterona (1:1 000). La medición de testosterona y DHEA-S no precisaron dilución por su similitud con niveles séricos. Las concentraciones de 17 hidroxiprogesterona, andrógenos totales y estrógenos pueden ser de 200 a 1000 veces mayores en líquido folicular que en plasma (233).

RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA:

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación con 2 a 5 días de abstinencia. Según las características de la muestra se seleccionó la técnica para la capacitación espermática, empleando como método de elección *swim up*, y recurriendo a gradientes de densidad en casos de viscosidad aumentada, cifras superiores a un millón de leucocitos/ml, astenozoospermia moderada o

concentración de espermatozoides inferior a 5 millones/ml y/o ausencia de espermatozoides con movimiento A o B.

OVOCITO Y EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN:

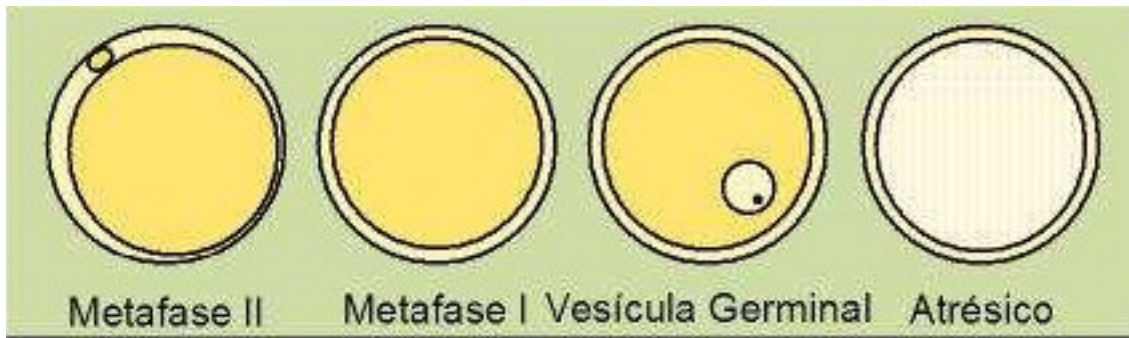
El método de fecundación preestablecido fue la microinyección espermática (ICSI). En algunas pacientes se empleó una técnica mixta (FIV-ICSI) realizando ICSI en las muestras estudiadas.

Los ovocitos se separaron de los cúmulos celulares (cumulus oophorus y células de la corona radiata) que los rodean y se evaluó la maduración meiótica.

Se clasificaron los ovocitos en maduros, inmaduros, degenerados y en vesícula germinal (ilustración 20).

- Los ovocitos maduros nuclearmente son ovocitos en metafase II; ovocitos en estado preovulatorio que se encuentran en el estadio de metafase de la segunda división meiótica y en los que se observa claramente el corpúsculo polar.
- Los ovocitos inmaduros son ovocitos en metafase I; son ovocitos que se encuentran en estadio de metafase de la primera división meiótica. No se ha extruido todavía el primer corpúsculo polar.
- Vesícula germinal: ovocitos oscuros que se encuentran en la profase de la primera división meiótica y en los que se identifica claramente un núcleo en dictiotene llamado vesícula germinal.
- Atrésicos o degenerados: ovocitos deformes, oscuros y sin membrana citoplásmica claramente definida.

Ilustración 20. CLASIFICACIÓN OVOCITARIA



Se seleccionaron los ovocitos maduros (metafase II) por la presencia del primer corpúsculo polar. Los inmaduros (metafase I) o en estadio de vesícula germinal y los degenerados fueron rechazados para ICSI.

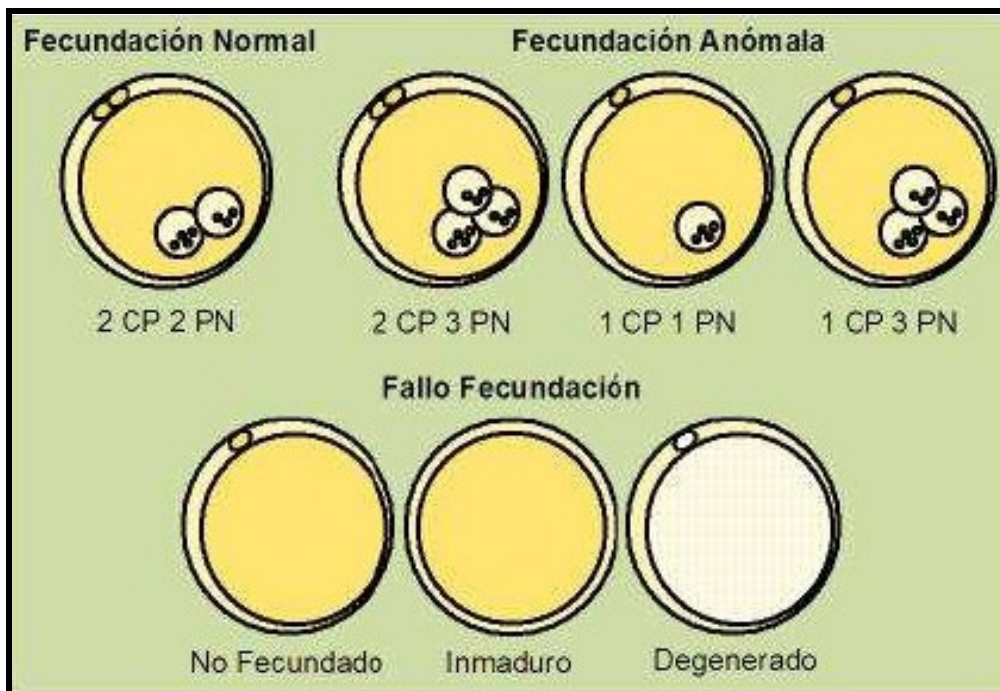
Todos los ovocitos y embriones fueron evaluados por la misma bióloga.

La microinyección intracitoplasmática fue realizada en ovocitos en metafase II usando la técnica de penetración directa.

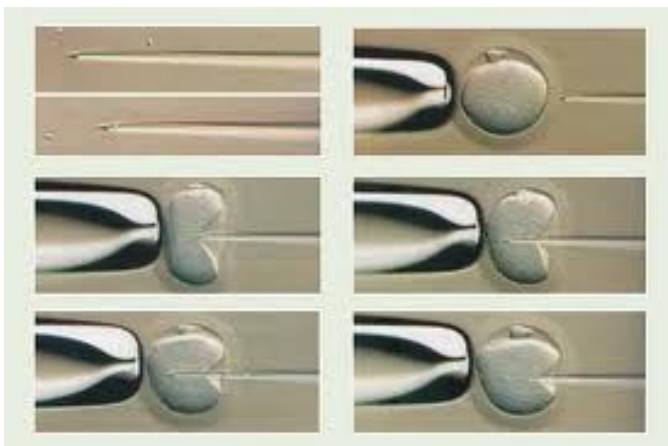
Los resultados de la fecundación se evaluaron a las 19-21 horas tras la ICSI (ilustración 21). La fecundación se consideró normal por la presencia de dos pronúcleos y *dos corpúsculos polares* (1). La degeneración ovocitaria se identificó por el colapso del contenido citoplasmático y la separación de la zona pellúcida. La existencia de uno o tres pronúcleos se valora como fecundación anormal. El fracaso de fecundación se definió por la ausencia de pronúcleos.

El fallo de fecundación y la fecundación anómala se agruparon como fecundación fallida.

Ilustración 21. TIPOS DE FECUNDACIÓN

**TÉCNICA DE MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA:**

Es una técnica de reproducción asistida mediante la que se inyecta un único espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro por micromanipulación (ilustración 22).

Ilustración 22. INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES EN EL INTERIOR DEL ÓVULO


En primer lugar, se localizaron los complejos cúmulo-corona-ovocito bajo microscopio estereoscópico en cabina de flujo laminar con superficie atemperada a 37°C y se manipularon con pipeta Pasteur de cristal estéril. Los complejos, que se distinguen con facilidad en el líquido folicular, se manipularon para obtener los ovocitos y se realizaron varios lavados en medio de cultivo transfiriéndolos posteriormente a placas de incubación en las que permanecieron entre 1 y 2 horas.

La decumulación o eliminación de las células del cúmulo-corona permite observar el grado madurativo de los ovocitos y la posterior realización de la ICSI. La decumulación se realizó dos fases: enzimática y mecánica. Los ovocitos, durante la fase enzimática, se transfieren a hialuronidasa 80 UI/ml, durante 30 segundos máximo. Posteriormente, se lavan rápidamente y se continúa con la decumulación mecánica, haciendo pasar los ovocitos por puntas de pipetas de 150-250 micras. Todo este proceso se realizó en un periodo máximo de 8 minutos intentando no dañar el ovocito ni deformarlo.

Una vez realizada la decumulación, se valoró tanto la maduración nuclear, condicionada por la extrusión del primer corpúsculo polar, como la maduración citoplasmática del ovocito, intentando identificar la presencia de alguna anomalía. Los ovocitos empleados fueron ovocitos en metafase II.

Bajo microscopio invertido con la óptica convencional se valoraron las cualidades morfológicas asumiendo como lo óptimo: la zona pelúcida proporcionada y regular; el corpúsculo polar, único y bien definido; el espacio perivitelino, virtual y regular; y el citoplasma sin estructuras, vacuolas ni vesículas, claro y homogéneo.

En cuanto al procesado de la muestra de semen para ICSI, el objetivo fue conseguir espermatozoides normales, de buena morfología y móviles, aunque sea en un número muy reducido intentando además seleccionar los espermatozoides con desplazamiento rectilíneo. Los espermatozoides se aíslan del líquido seminal, mediante *swim up* o gradientes de densidad. El *swim up* se realiza tras lavado de la muestra recogida, con medio de cultivo RPMI centrifugando 10 minutos a 1900 rpm. Tras la centrifuga, se retira el sobrenadante, reservando el *pellet* y dejando que migren unos 30 a 50 minutos en medio de cultivo *Gamete*, dependiendo de la calidad seminal, hasta su utilización para la microinyección.

CRONOLOGÍA. La microinyección se realizó entre 30 minutos y 6 horas máximo tras la punción folicular. Cuando se realiza entre 4 y 6 horas tras la punción mejora la tasa de fecundación normal al aumentar la maduración citoplasmática de los ovocitos. Los espermatozoides fueron microinyectados inmediatamente después de la inmovilización. Los pronúcleos deben aparecer a partir de las 16 y 20 horas y la primera división mitótica entre las 22 y 27 horas.

METODOLOGÍA. La microinyección espermática consiste en inyectar un solo espermatozoide móvil, de morfología normal, una vez inmovilizado, en un ovocito en metafase II sin signos de degeneración. Para ello, los ovocitos, previamente decumulados y clasificados, se sujetaron con la pipeta de holding por aplicación de una ligera presión negativa a modo de ventosa. El espermatozoide, después de ser inmovilizado, se aspiró con la pipeta de ICSI y se inyectó en el ovocito, evitando la zona del corpúsculo polar, intentando ser lo más cauteloso y preciso posible en la realización de la técnica.

Los ovocitos se colocaron individualmente en microgotas de 5-8 microlitros. El tiempo de exposición de los ovocitos en la placa de microinyección fue de 10 minutos. A partir de 25-30 minutos la estabilidad de los medios disminuye limitando a 30 minutos el máximo de tiempo posible.

Los espermatozoides se colocaron en una gota de medio de cultivo denominado polivinil pirrolidona (PVP) cuyo objetivo es enlentecer los espermatozoides más móviles facilitando su captura.

Hay 2 pasos esenciales en la técnica de ICSI: la inmovilización del espermatozoide y la rotura del oolema.

La inmovilización del espermatozoide es necesaria para una correcta fecundación. Una vez inmovilizado el espermatozoide, se rompió la membrana plasmática de la cola por debajo de la zona intermedia, permitiendo que moléculas de bajo peso molecular entren en la cabeza del espermatozoide y se liberen factores espermáticos de la región ecuatorial, que junto a factores ovocitarios, faciliten la activación del ovocito. Posteriormente, y una vez lavado varias veces con medio de cultivo, el espermatozoide se aspiró en la pipeta de inyección por la cola y se llevó a la microgota donde estaba ubicado el óvulo para proceder a su microinyección.

La rotura del oolema se realizó lo más cercana posible a las 3 horarias, con el corpúsculo polar situado a las 6 o 12 horarias y la zona mitocondrial entre las 7 y las 11, evitando cualquier alteración del huso meiótico. Este paso es imprescindible para la introducción del espermatozoide en el interior del citoplasma y permitir la interacción entre factores ooplasmáticos y espermáticos.

Una vez colocado el ovocito en la pipeta de holding y elegido el sitio de punción, se colocó el espermatozoide en la punta de la pipeta y se procede a la rotura del oolema. Se atravesó la zona pelúcida empujando la membrana plasmática hasta formar un canal citoplasmático que evite la expulsión del espermatozoide. Después, por presión o aspiración, se rompió la membrana plasmática.

Para comprobar que la membrana estaba rota se aspiró una cantidad mínima de citoplasma en cada caso sin traspasar la zona pelúcida (< 6 microlitros). Después se depositó el espermatozoide en una zona distal del punto de inyección, aproximadamente a dos tercios de dicho punto en el ovocito. Se realizó con el menor volumen de medio posible.

CALIDAD EMBRIONARIA:

Se estableció según la clasificación de ASEBIR. Se dividieron los embriones en 4 calidades: A, B, C, D, que se asignaron en día+2 y día+3 en función del número de células. Se evaluó también el porcentaje de fragmentación, la existencia de vacuolas, la multinucleación, la semejanza entre las células, los pronúcleos y la existencia de anillo acitoplasmático en día+3. Según estas características descritas se modificó la asignación a la baja (ilustraciones 12,13 Y 14).

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA:

Se realizó previamente la prueba del catéter en consulta para poder determinar con antelación la dificultad de la transferencia y valorar en esos casos si se hace necesaria una histeroscopia previa para dilatación cervical.

Las pacientes acudieron con repleción vesical, especialmente en casos de útero en anteflexión, con el objetivo de corregir el trayecto de la transferencia y hacerlo

rectilíneo. En casos de útero en retroflexión, es preferible que no haya demasiada repleción vesical, lo suficiente para visualización por ecografía abdominal.

La técnica quirúrgica fue la siguiente:

- Aplicación de espéculo estéril.
- Limpieza del cérvix con gasas empapadas en suero fisiológico estéril.
- En el laboratorio, el embriólogo cargó los embriones en la cánula blanda Labotect.
- Canalización del cérvix cuidadosamente hasta el tercio medio de la cavidad endometrial, donde se inyectaron lentamente los embriones.
- Retirada del catéter lentamente con un giro de muñeca similar al que se hace al destornillar.
- El biólogo comprobó posteriormente que no habían quedado embriones retenidos en el catéter.
- Todo el proceso se realizó con control ecográfico para definir el trayecto uterino y visualizar la zona endometrial en la que efectúa la transferencia.

La paciente estuvo en reposo durante 10-20 minutos tras la transferencia.

CRIOPRESERVACIÓN EMBRIONARIA:

Tras la valoración embrionaria se seleccionaron los embriones en día+3 para transferencia en fresco y se criopreservaron el restos de embriones aptos para futuras transferencias. Los embriones con un número inadecuado de células se dejaron evolucionar a cultivo largo, criopreservando sólo los aptos.

RESULTADOS REPRODUCTIVOS GLOBALES DEL CICLO:

Dentro de los resultados globales del ciclo, se evaluó la calidad ovocitaria global descrita por el biólogo como anotación al final del ciclo. La calidad ovocitaria se clasificó en cuatro grupos: no destacable, buena, mala y muy mala calidad ovocitaria. Fue clasificada según criterios morfológicos nucleares y citoplasmáticos y se determinó como muy buena ante la existencia de ovocitos en metafase II con un citoplasma claro y homogéneo, granulosidad moderada e inexistencia de inclusiones, características idóneas. Se descendió en la clasificación a buena, no destacable y mala calidad ovocitaria a medida que se perdieron dichas cualidades, clasificando como muy mala calidad ovocitaria al ovocito que presentó acumulaciones de retículo liso endoplasmático, granulosidad severa centralizada y vacuolización excesiva. Se clasificó la calidad ovocitaria de la forma habitual en la que suele hacerlo el biólogo en la práctica clínica diaria; como clasificación global de los ovocitos obtenidos en el ciclo.

Se valoraron además el número de complejos puncionados, el número de ovocitos recuperados, de ovocitos maduros y de ovocitos degenerados.

Y se evaluó el número de embriones obtenidos, el número de embriones transferidos y criopreservados y el número de embriones globales de las distintas calidades embrionarias.

TASAS DE EMBARAZO:

Se realizó B-HCG sérica a los 14 días de la transferencia embrionaria. El diagnóstico de embarazo se efectuó mediante la medición de B-HCG sérica y de ecografía transvaginal. En caso de resultados positivos, se siguió a las pacientes durante el primer trimestre, hasta las 12 semanas de gestación, evaluando los posibles abortos y detallando la semana de gestación en la que acontecen. En caso de evolución satisfactoria del embarazo se recogió la tasa de recién nacidos vivos, mediante revisión de la historia clínica y con llamada telefónica posterior a todas las pacientes.

Las tasas de embarazo se clasificaron en:

- Embarazo bioquímico: si la prueba de detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) es positiva.
- Embarazo clínico: cualquier tipo de embarazo excepto aquel diagnosticado sólo por medición de niveles de hCG.
- Embarazo en curso: embarazo de al menos 12 semanas de gestación, medido desde el primer día de la última menstruación.
- Nacido vivo: recién nacido vivo en casa.

ÉTICA Y LEGISLACIÓN VIGENTE:

Como los sujetos de la experimentación son seres humanos, los procedimientos seguidos están de acuerdo con las normas éticas de la "Declaración de Helsinki" y han sido revisados por el comité institucional donde se ha realizado el trabajo de investigación (Hospital Universitario La Paz). Se adjunta el consentimiento informado facilitado y firmado por las pacientes incluidas en el estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se utilizó la media junto con la desviación estándar para variables cuantitativas continuas y para variables cualitativas se emplearon frecuencias absolutas y relativas expresadas en porcentaje.

La correlación entre variables cuantitativas continuas se estudió mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Estudio EEG: se hizo un análisis de la relación de los niveles hormonales y el número de punciones. Se estimaron y compararon las medias de los niveles hormonales por punción con un modelo de ecuación de estimación generalizada, con matriz de trabajo intercambiable. Así, se ajustaron los datos de medidas repetidas con un modelo de Ecuación de Estimación Generalizada (EEG) con

distribución marginal normal, con nexos la identidad y estructura de correlación intercambiable. Con este tipo de modelo, se obtienen estos resultados:

- Las estimaciones de los parámetros que hacen referencia al efecto de cada nivel de la variable independiente sobre la respuesta media.
- Los estadísticos de puntuación para análisis de tipo 3, que evalúan el efecto global de la variable sobre la respuesta.
- Se calculan y comparan las medias por mínimos cuadrados de los efectos fijos.

Estudio Mixto: Se analizó y comparó la variación de los niveles hormonales entre e intra sujetos con un Modelo Mixto Incondicional. Asimismo, se calculó el coeficiente de correlación intraclase para obtener el porcentaje de variabilidad total entre individuos para cada nivel hormonal, y el intervalo de confianza (IC 95%) correspondiente. La variación de dichos niveles hormonales se evaluó mediante parámetros estimados de covarianza.

La significación estadística se estableció para valores de $p < 0,05$, considerándose todas las pruebas estadísticas bilaterales.

El programa informático utilizado para procesar los datos fue SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS:

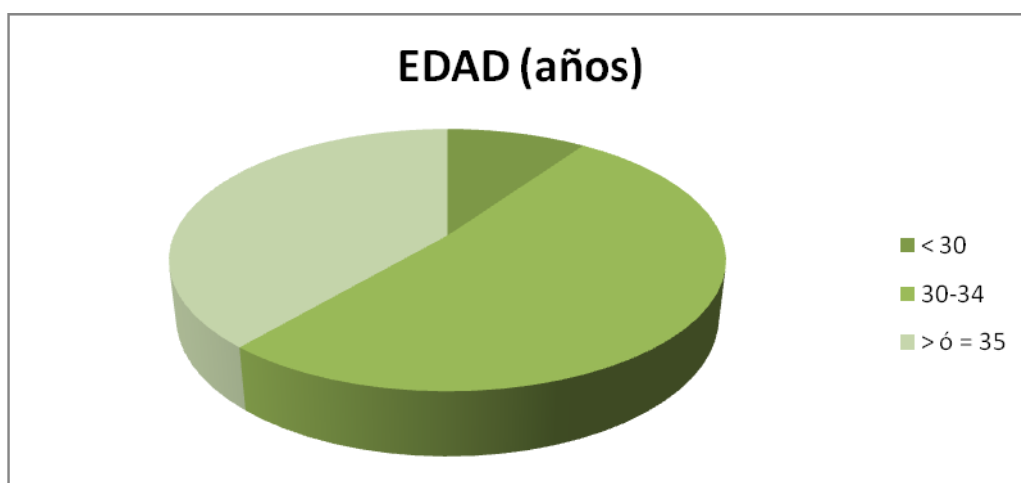
RESULTADOS:

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Se incluyeron 31 pacientes con un total de 73 muestras de líquido folicular. 3 pacientes fueron excluidas del estudio por necesidad de añadir HMG en el ciclo de estimulación ovárica y las muestras intensamente hemáticas fueron también excluidas del estudio. Así, finalmente se obtuvo 1 muestra de líquido folicular de 4 pacientes, 2 muestras de líquido folicular de 16 pacientes, 3 muestras de 6 pacientes y 4 muestras de 5 pacientes.

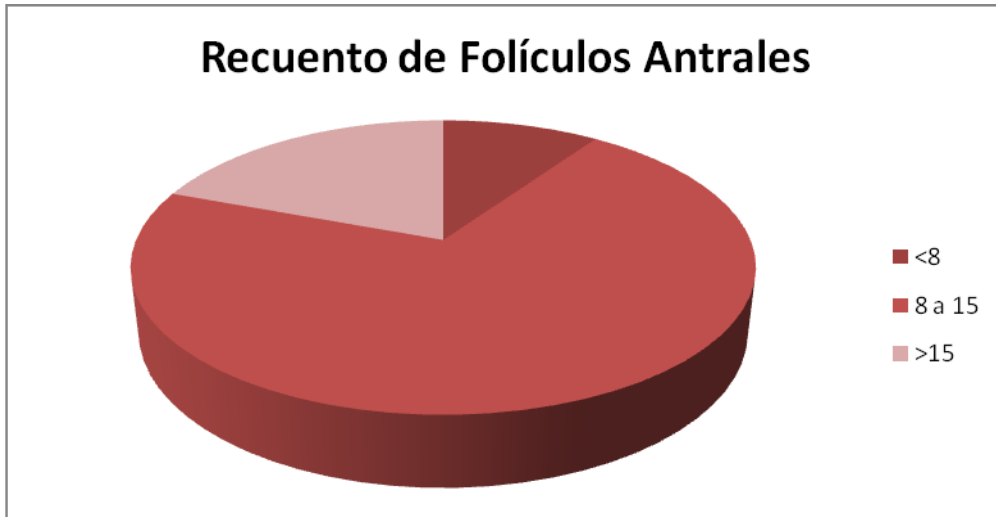
El 9,7% (3/31) tenía menos de 30 años, el 51,6 % (16/31) entre 30 y 34 años y el 38,7% (12/31) tenía una edad mayor o igual a 35 años (ilustración 23). La edad > 38 años fue un criterio de exclusión en el estudio.

Ilustración 23. **DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA POR EDAD**



El 9,7% (3/31) de las pacientes tenía menos de 8 folículos en el recuento de folículos antrales, el 71% (22/31) tenía entre 8 y 15 y el 19,4% (6/31) restante tenía más de 15 antrales en el recuento inicial (ilustración 24).

Ilustración 24. **DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN EL RECUENTO DE FOLÍCULOS ANTRALES**



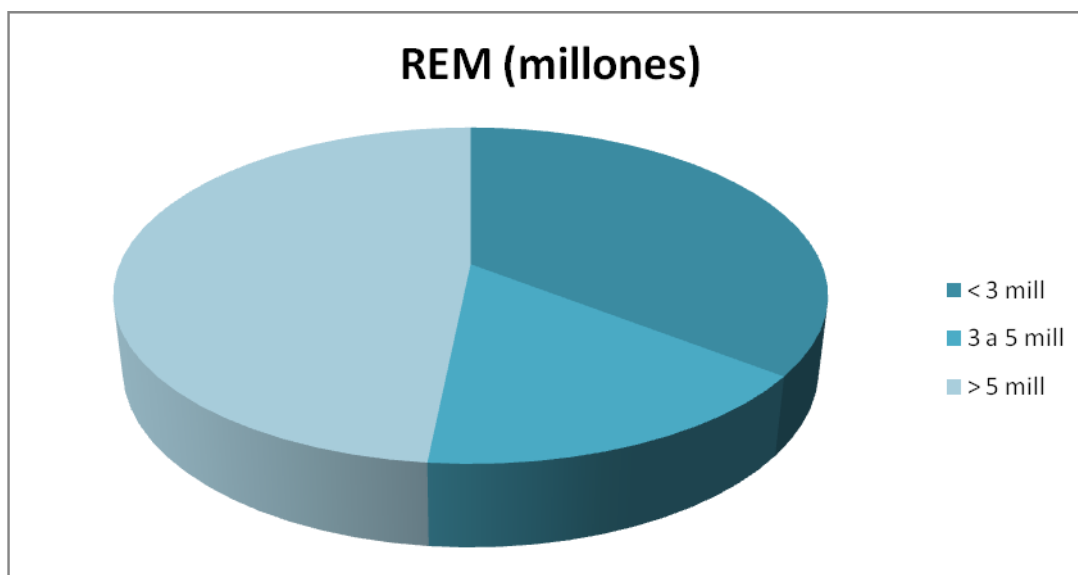
El 22,6%(7/31) de la muestra se clasificó como esterilidad de origen tubárico, el 22,6 %(7/31) como esterilidad de origen desconocido y el 54,8% (17/31) como origen masculino (ilustración 25).

Ilustración 25. **DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN EL TIPO DE ESTERILIDAD**



El 35,5% (11/31) de los varones aportó un recuento de espermatozoides móviles (REM) menor de 3 millones en el seminograma de estudio, el 16,1% (5/31) de 3 a 5 millones y el 48,4% (15/31) mayor de 5 millones (ilustración 26).

Ilustración 26. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN EL RECUENTO DE ESPERMATOZOIDEOS MÓVILES



En cuanto a la reserva ovárica desde el punto de vista cuantitativo, los datos se describen en la tabla 1. La edad media de las pacientes del estudio fue de $33,1 \pm 3,3$ años, los niveles de FSH sérica media fueron de $6,6 \pm 1,8$ UI/L, con un recuento de folículos antrales medio de $12,2 \pm 4,6$ folículos y unas cifras medias de hormona antimulleriana de $2,8 \pm 1,1$ ng/ml (Tabla 1).

Tabla 1. DATOS CUANTITATIVOS DE RESERVA OVÁRICA DE LA MUESTRA

	FSH BASAL (UI/L)	RFA	HAM (ng/ml)	EDAD (años)
Media	6,6	12,2	2,8	33,1
Mediana	6,3	12	2,7	34
Desviación Típica	1,8 (4,2-12)	4,6 (5-24)	1,1 (0,7-5,4)	3,3 (24-38)
Percentil 25	5,3	8	2	31
Percentil 50	6,3	12	2,7	34
Percentil 75	7,2	15	3,4	36

1.2 TRATAMIENTO

Los resultados descriptivos en relación a las características del ciclo de estimulación con agonistas de GnRH y rFSH son reflejados en la tabla 2. La frenación previa media con agonistas de GnRH fue de 21,23 \pm 5,78 días. La estimulación con rFSH se realizó durante una media de 9,90 \pm 1,77 días y empleando unas dosis medias de 1633,26 \pm 455,39 UI de rFSH. El número medio de folículos > 17 mm fue de 8,55 \pm 3,94 con un diámetro medio de 19,05 \pm 1,03 mm y con un volumen medio de 5,02 \pm 1,03 cc.

Tabla 2. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL CICLO DE ESTIMULACIÓN

	Días GnRH (frenación previa)	Dosis total de FSH	Días de estimulación	Número de folículos	Pico de estradiol día HCG	Mililitros de contenido folicular	Diámetro medio folicular mm
Media	21,23	1 633,26	9,90	8,55	1 548,90	5,02	19,05
Mediana	23,00	1 525,00	10,00	8,00	1 300,00	5,50	19,00
Desviación Típica	5,78 (10-30)	455,39 (900- 2 875)	1,77 (7-15)	3,94 (4-20)	744,01 (513- 3 434)	1,03 (3-10)	1,03 (17-22)
Percentil 25	17,00	1 375,00	8,00	5,00	930,00	3,50	18,00
Percentil 50	23,00	1 525,00	10,00	8,00	1 300,00	5,50	19,00
Percentil 75	25,00	1 933,00	11,00	11,00	2 102,00	7,50	20,00

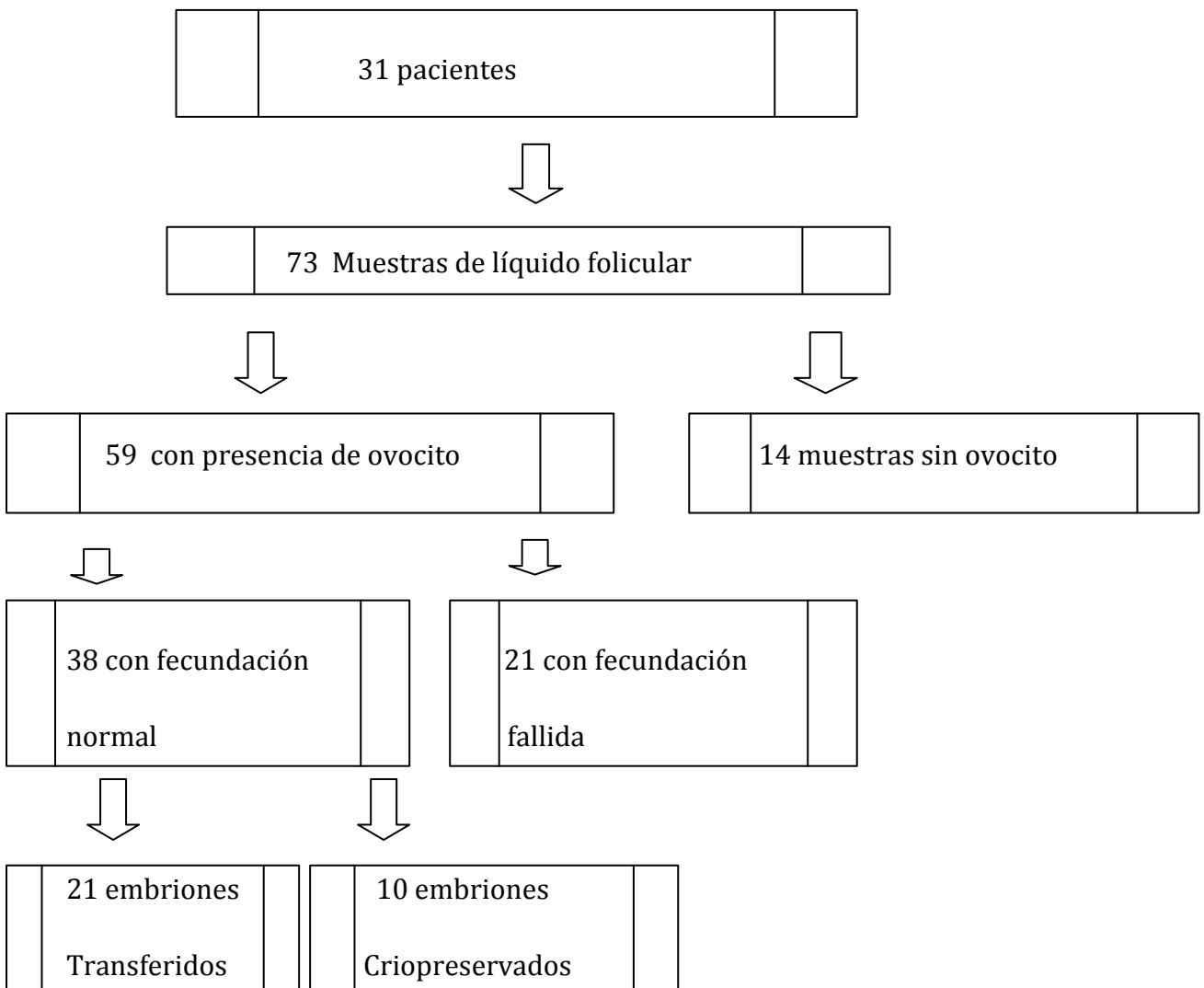
1.3 RESULTADOS DEL TRATAMIENTO.

59 muestras de líquido folicular procedentes de folículos maduros contenían ovocito (81 %: 59/73) y el 19 % restante carecía del mismo (14/73).

El 64,4% (38/59) de los ovocitos experimentaron una fecundación normal y el 35,6% (21/59) restante sufrieron una fecundación fallida (bien fracaso de fecundación o bien fecundación anormal).

De los embriones conseguidos, 21 fueron transferidos y 10 criopreservados. Los 7 embriones restantes, no transferidos ni criopreservados, no evolucionaron al llevarlos a cultivo largo (ilustración 27).

Ilustración 27. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS SEGÚN PRESENCIA O NO DE OVOCITO Y TIPO DE FECUNDACIÓN



Los resultados obtenidos del análisis de los niveles hormonales en líquido folicular se detallan en la tabla 3. El estradiol medio fue de 732 075,2 pg/ml, con una progesterona media de 21 970,9 ng/ml. En cuanto a los andrógenos foliculares, la testosterona media fue de 4,9 ng/ml con un DHEAS medio de 128 mcg/dl. Y los ratios medios de estradiol/progesterona y de estradiol/testosterona fueron de 41,7 y de 167 363,1, respectivamente.

Tabla 3. NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR

	Estradiol pg/ml	Progesterona ng/ml	Testosterona ng/ml	DHEAS mcg/dl	Ratio E/P	Ratio E/T
Media	732 075,2	21 970,9	4,9	128	41,7	167 363,1
Mediana	746 333,0	20 100	4,9	129,6	35,3	155 009,5
Desviación Típica	172 535,8 (275 500- 1 187 500)	9 533,9 (6 800- 57 900)	1,5 (2,3 -8,7)	52,9 (33-235)	22,8 (16,3- 112,1)	70 064,3 (56 671,2- 328 448,3)
Percentil 25	614 000	17 450	4,1	82,5	24,9	122 704,6
Percentil 50	746 333	20 100	4,9	129,6	35,3	155 009,5
Percentil 75	816 000	26 800	5,3	174,5	49,2	204 235,9

Los resultados relativos a la respuesta global del ciclo de estimulación, se describen en la tabla 4. EL número medio de complejos puncionados fue de 9,03, con 8,90 ovocitos totales, de los cuales los ovocitos maduros fueron 7,81 y fecundaron normalmente 5,29 obteniéndose 4,39 embriones totales medios por paciente. Los ovocitos degenerados fueron de 0,26.

Y la calidad embrionaria global de la muestra se distribuyó de la manera expuesta en la tabla 5.

Tabla 4. RESPUESTA GLOBAL POR PACIENTE DEL CICLO DE ESTIMULACIÓN

	Número complejos puncionados	Ovocitos totales	Ovocitos maduros	Ovocitos con fecundación normal	Ovocitos degenerados	Número embriones totales
Media	9,03	8,90	7,81	5,29	0,26	4,39
Mediana	8,00	8,00	8,00	5,00	0,00	4,00
Desviación Típica	4,10 (2-19)	4,18 (1 - 19)	3,66 (1 - 15)	3,43 (0 - 15)	0,51 (0-2)	2,90 (0-13)
Percentil 25	6,00	6,00	5,00	2,00	0,00	2,00
Percentil 50	8,00	8,00	8,00	5,00	0,00	4,00
Percentil 75	12,00	12,00	10,00	8,00	0,00	6,00

Tabla 5. CALIDAD EMBRIONARIA GLOBAL DE LA MUESTRA

	Número de embriones calidad A	Número de embriones calidad B	Número de embriones calidad C	Número de embriones calidad D
Media	1,13	0,94	0,90	1,39
Mediana	1,00	1,00	1,00	1,00
Desviación Típica	1,12 (0-4)	1,18 (0-4)	1,01 (0-4)	1,40 (0-4)
Percentil 25	0,00	0,00	0,00	0,00
Percentil 50	1,00	1,00	1,00	1,00
Percentil 75	2,00	1,00	1,00	2,00

El 35,5% (11/31) de las pacientes consiguieron una gestación. El 36,4% (4/11) terminó con aborto en el primer trimestre y el 63,6 % restante (7/11) logró una gestación evolutiva con niño vivo y sano en casa. La tasa de recién nacido vivo en casa fue de un 22,5 % (7/31).

Los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular se han relacionado con distintas características generales de las pacientes, con diversos aspectos del ciclo de estimulación y con diferentes resultados reproductivos en busca de asociaciones relevantes.

2.1 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LOS PARÁMETROS CUANTITATIVOS DE RESERVA OVÁRICA:

Al relacionar los niveles hormonales en líquido folicular con los parámetros de reserva ovárica cuantitativos (RFA, FSH, HAM) se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre la DHEA-S y la HAM, entre el ratio estradiol/progesterona y la FSH y también entre el ratio estradiol/testosterona y la FSH por una parte y el RFA por otra (ilustraciones 28 ,29 y 30; Tabla 6). Se obtuvo además una asociación estadísticamente significativa límite entre los niveles de testosterona en líquido folicular y el RFA.

La correlación entre las cifras de HAM y DHEA-S fue positiva ($r= 0,342$; $p=0,003$). Los niveles de HAM y de DHEA-S subieron de forma paralela, aumentando o disminuyendo las cifras de HAM a medida que se incrementaron o descendieron las de DHEAS. Las cifras de FSH mantuvieron una correlación negativa con los ratios de estradiol/progesterona y de estradiol/testosterona ($r= - 0,303$; $p=0,009$ y $r= -0,250$; $p=0,032$, respectivamente). El ratio estradiol/testosterona mantuvo además una correlación positiva también con el RFA ($r= 0,250$; $p=0,033$). La correlación entre testosterona y RFA fue de carácter negativo y cercana a la significación estadística ($r=- 0,323$; $p=0,05$; cuanto mayor fue el nivel de testosterona, menor RFA).

Tabla 6. NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y PARÁMETROS CUANTITATIVOS DE RESERVA OVÁRICA

r: correlación de Pearson

NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR		HAM	FSH	RFA
E2 pg/ml LF	r	-0,085	-0,172	-0,090
	Valor p	0,476	0,147	0,451
Progesterona ng/ml	r	-0,122	-0,077	0,148
	Valor p	0,305	0,519	0,213
Testosterona ng/ml	r	-0,005	0,096	-0,323
	Valor p	0,964	0,419	0,05
DHEA-S mcg/dl	r	0,342	0,140	0,120
	Valor p	0,003	0,237	0,311
ratio E/P	r	0,025	-0,303	0,156
	Valor p	0,832	0,009	0,186
ratio E/T	r	-0,072	-0,252	0,250
	Valor p	0,546	0,032	0,033

Ilustración 28. **RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES DE DHEA-S EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LAS CIFRAS SÉRICAS DE HORMONA ANTIMULLERIANA**

AHM: hormona antimulleriana.

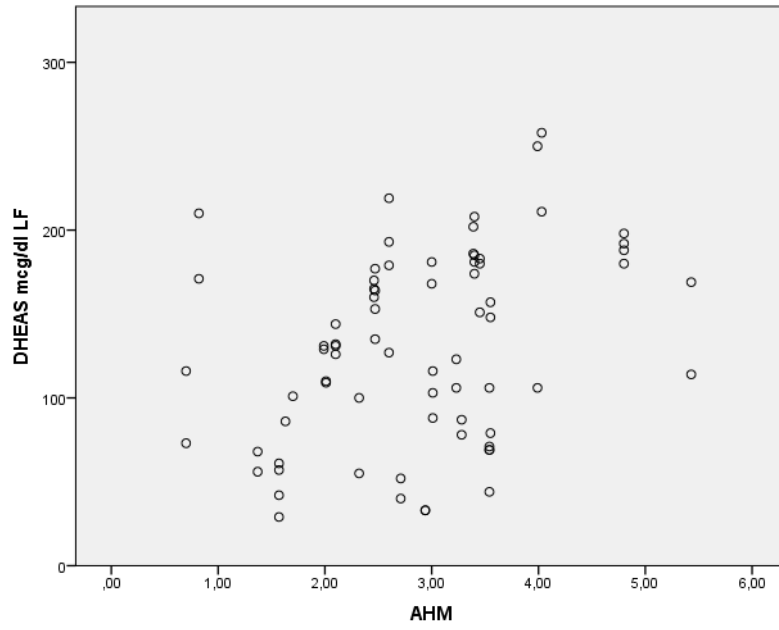
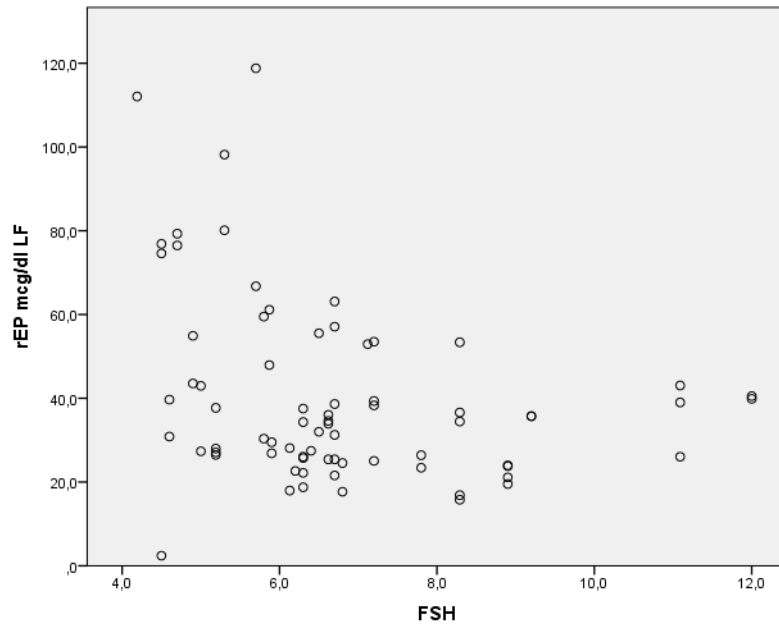


Ilustración 29. **RELACIÓN ENTRE LAS CIFRAS SÉRICAS DE FSH Y LOS RATIOS DE ESTRADIOL/PROGESTERONA Y DE ESTRADIOL/TESTOSTERONA EN LÍQUIDO FOLICULAR**

A:



B:

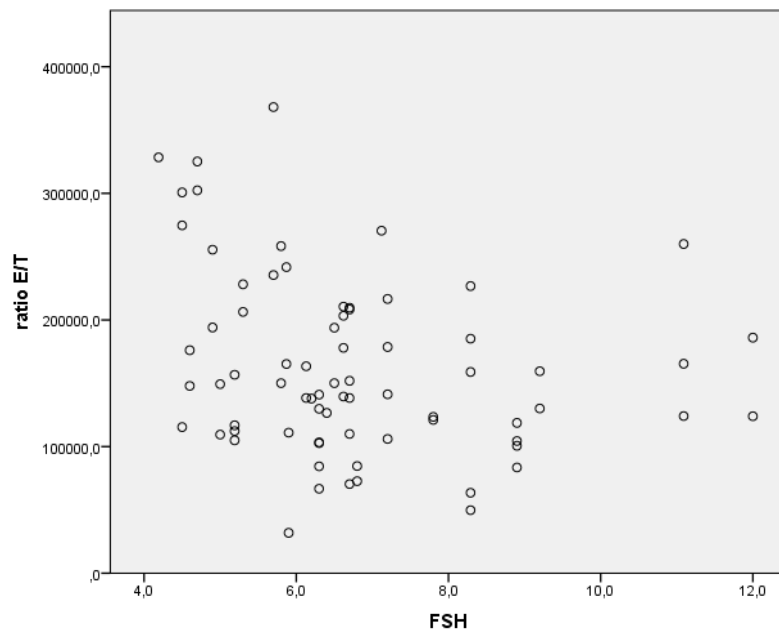
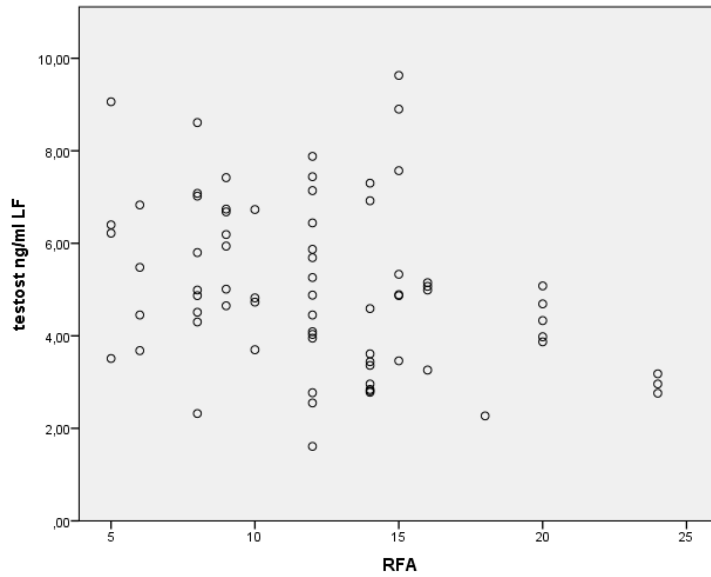


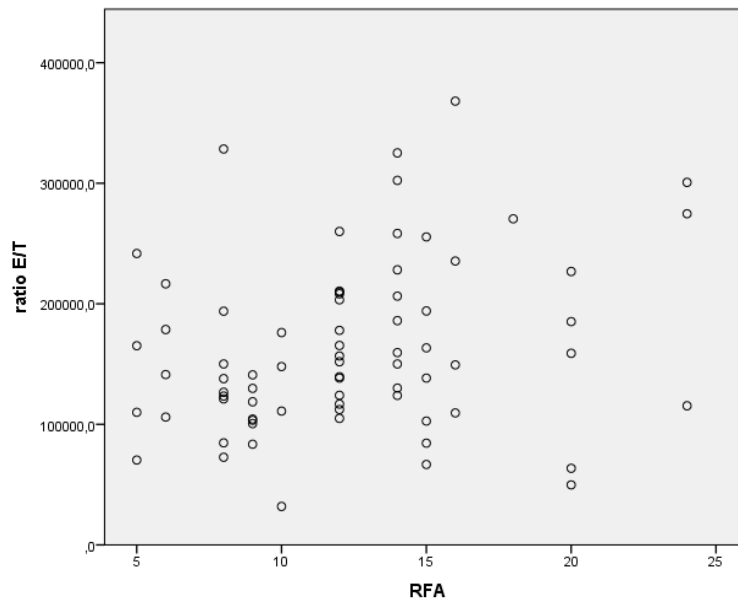
Ilustración 30. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES DE TESTOSTERONA Y EL RATIO ESTRADIOL/TESTOSTERONA EN LÍQUIDO FOLICULAR Y EL RECUENTO DE FOLÍCULOS ANTRALES

RFA: Recuento de folículos antrales.

A:



B:



2.2 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LOS RESULTADOS GLOBALES DEL CICLO (tabla 7)

Al evaluar los niveles hormonales en líquido folicular y relacionarlos con el resultado global del ciclo, se obtuvo una correlación negativa estadísticamente significativa entre las cifras de testosterona y el número de complejos puncionados y una correlación positiva entre el ratio estradiol/testosterona y dicho número de complejos ($r = -0,360$; $p = 0,002$ y $r = 0,332$; $p = 0,004$, respectivamente) (ilustración 31 A, B). Así, las cifras de testosterona folicular fueron superiores en pacientes con menor número de complejos puncionados. En la misma línea, el ratio estradiol/testosterona aumentó a medida que lo hizo el número de complejos puncionados. Una correlación negativa se estableció también de forma significativa entre la testosterona y el número de embriones de calidad D, siendo la correlación con el ratio estradiol/testosterona positiva también en relación al número de embriones de calidad D (ilustración 31 C,D,E y F). De este modo, cuanto mayor fue el número de embriones de calidad D, menores fueron las cifras de testosterona folicular y mayor el ratio estradiol/testosterona ($r = -0,233$; $p = 0,047$ y $r = 0,264$; $p = 0,024$, respectivamente).

Sin alcanzar la significación estadística, los datos mostraron una asociación negativa entre el número de complejos puncionados y las cifras de estradiol y DHEA-S además de la testosterona citada y una asociación positiva con la progesterona, al igual que con los ratios. Además, cuanto mayor fueron los niveles de estradiol, progesterona y testosterona, menor fue el número tanto de ovocitos fecundados como de embriones totales y de embriones de calidad A y C. En cuanto a las cifras de DHEA-S, cuanto mayor fueron sus niveles, menor número de complejos puncionados, menor número de ovocitos degenerados y menor número de embriones de calidad B. Con el resto de parámetros el DHEAS estableció una asociación positiva. En relación al número de embriones de calidad B, se apreció una asociación positiva con las cifras de andrógenos (testosterona y DHEA-S), siendo esta relación de carácter negativo en el caso del estradiol, la progesterona y los ratios tanto de estradiol/progesterona como de estradiol/testosterona.

Tabla 7. NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y RESULTADOS GLOBALES DEL CICLO

r: correlación de Pearson

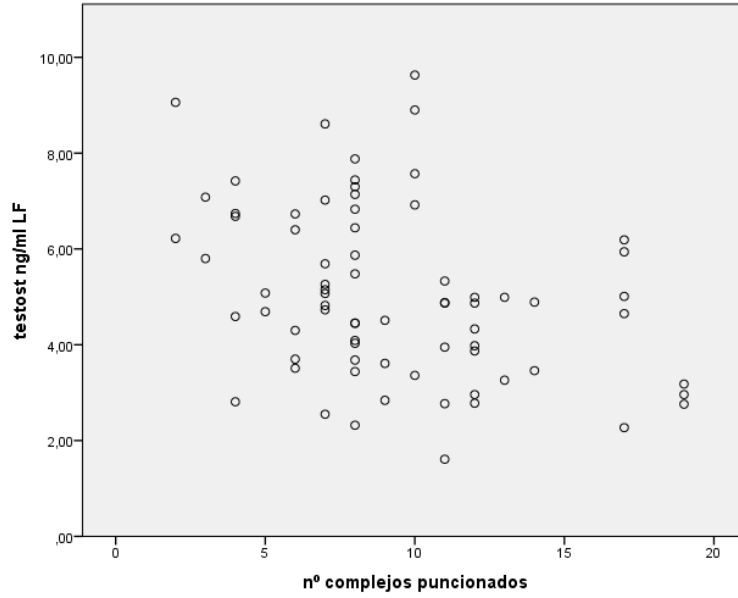
rE/P: ratio estradiol/progesterona

rE/T: ratio estradiol/testosterona

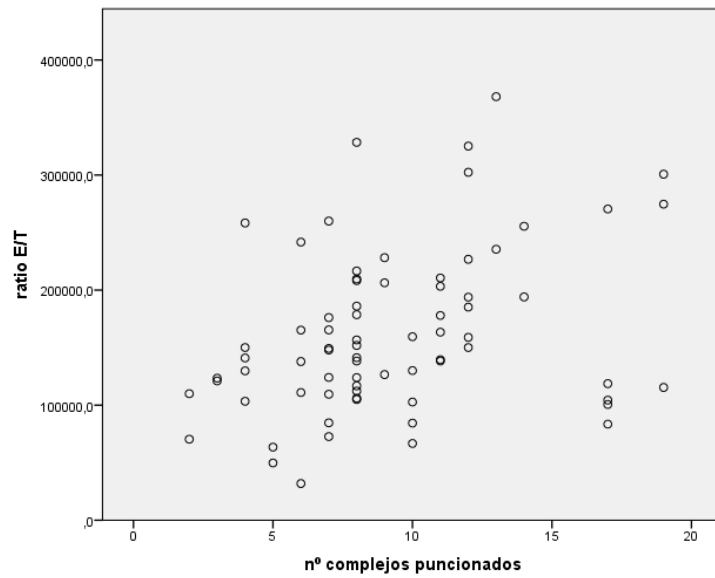
		Estradiol	Progesterona	Testosterona	DHEAS	rE/P	rE/T
Número de complejos puncionados	R	-0,007	0,151	-0,360	-0,003	0,189	0,332
	Valor p	0,955	0,201	0,002	0,979	0,109	0,004
Número de ovocitos fecundados	r	-0,084	-0,019	-0,185	0,037	0,084	0,136
	Valor p	0,482	0,871	0,117	0,755	0,481	0,250
Número de ovocitos degenerados	r	-0,073	0,036	0,154	-0,229	-0,207	-0,141
	Valor p	0,537	0,764	0,194	0,052	0,079	0,236
Número de embriones totales	r	-0,079	-0,067	-0,146	0,116	0,046	0,057
	Valor p	0,504	0,576	0,227	0,330	0,697	0,633
Número de embriones totales calidad A	r	-0,054	-0,079	-0,073	0,141	0,151	0,044
	Valor p	0,652	0,505	0,541	0,236	0,202	0,709
Número de embriones totales calidad B	r	-0,122	-0,013	0,079	0,162	-0,222	-0,180
	Valor p	0,303	0,910	0,508	0,171	0,059	0,128
Número de embriones totales calidad C	r	-0,224	-0,120	-0,101	-0,124	-0,073	-0,078
	Valor p	0,056	0,310	0,394	0,295	0,541	0,510
Número de embriones totales calidad D	r	0,118	0,024	-0,233	0,132	0,204	0,264
	Valor p	0,319	0,842	0,047	0,266	0,084	0,024

Ilustración 31. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LOS RESULTADOS GLOBALES DEL CICLO

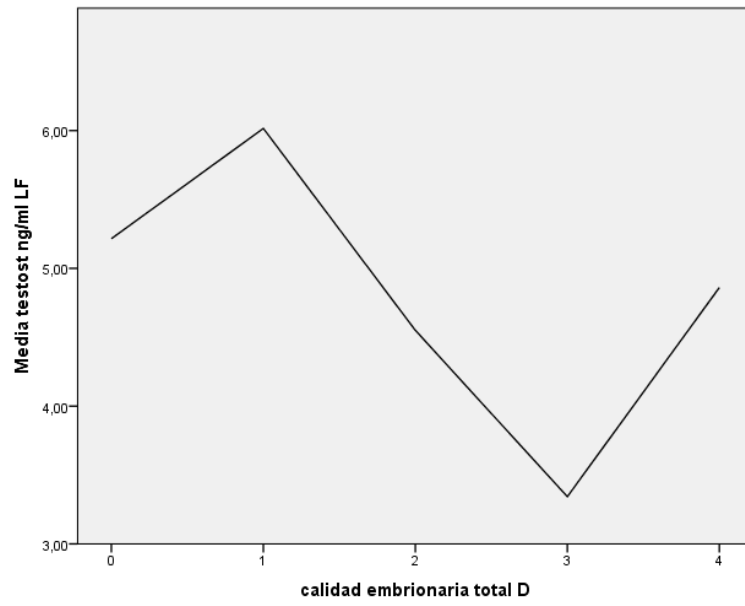
A:



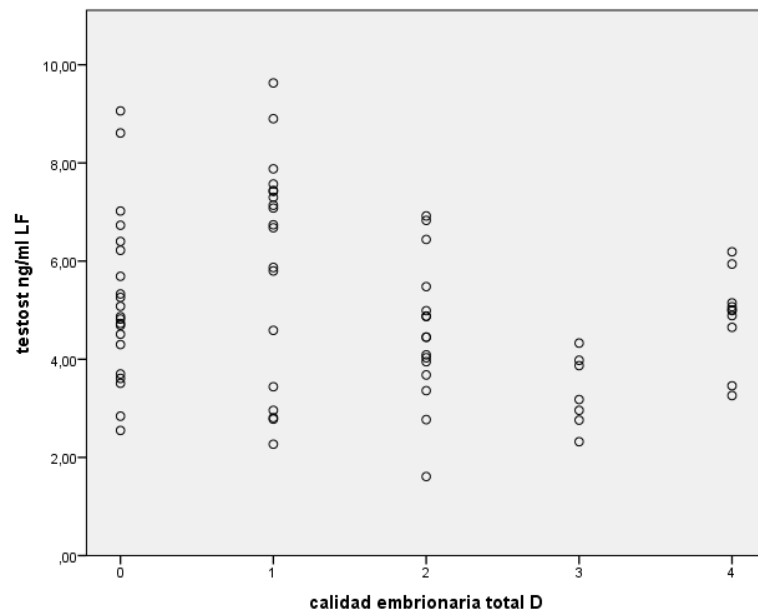
B:



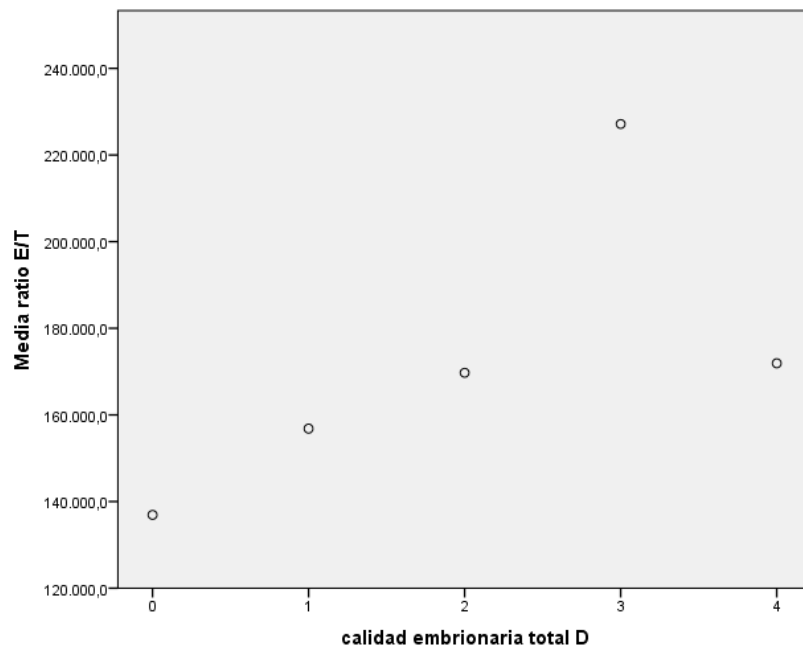
C:



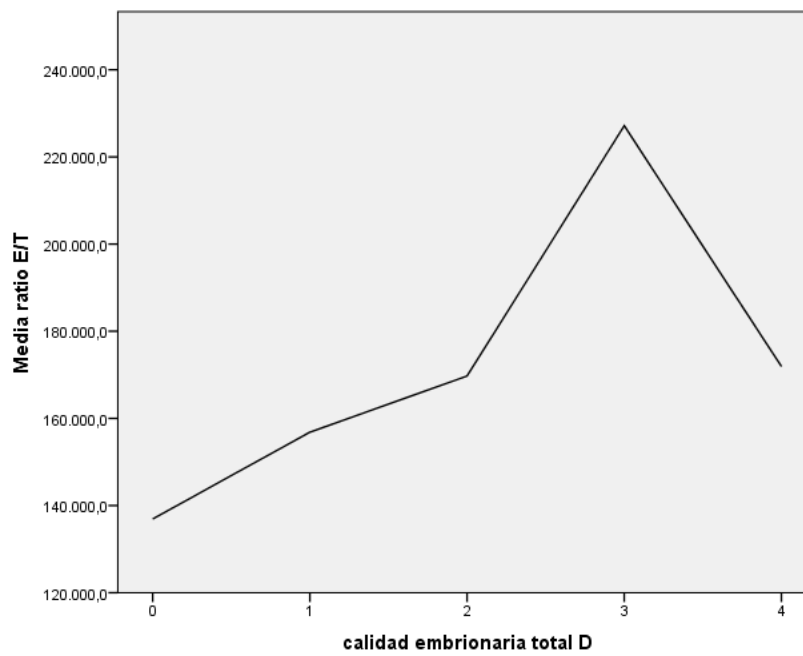
D:



E:



F:



2.3 RELACIÓN ENTRE LOS VALORES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA VARIABLE CANTIDAD DE OVOCITOS MADUROS.

La asociación entre la cantidad de ovocitos maduros y los niveles hormonales de testosterona y el ratio estradiol/testosterona fue estadísticamente significativa ($p=0,008$ y $p = 0,03$ respectivamente) (tabla 8). En el caso de la testosterona, se estableció como un estimador de carácter negativo por lo que cuanto mayor fue en número de ovocitos maduros por paciente, menores fueron sus cifras de testosterona folicular. Y en cuanto al ratio estradiol/testosterona, fue un estimador de carácter positivo siendo mayor el ratio cuanto mayor fue la cantidad de ovocitos maduros.

Tabla 8. **HORMONAS EN LÍQUIDO FOLICULAR Y NÚMERO DE OVOCITOS MADUROS.**

Análisis de estimadores del parámetro Ecuación de Estimación Generalizada				
Cantidad de Ovocitos Maduros				
Parámetro	Estimador	95% Límites de confianza		Valor p
Estradiol	-131,999	-15 210	14 946,03	0,986 3
Progesterona	762,195 5	-683,998	2 208,389	0,301 6
Testosterona	-0,161 2	-0,281 8	-0,040 6	0,008 8
DHEAS	-0,452 1	-5,436 0	4,531 8	0,858 9
Ratio estradiol/progesterona	0,8191	-0,697 7	2,335 9	0,289 9
Ratio estradiol/testosterona	6 054,854	348,429 9	11 761,28	0,037 6

2.4 CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES DE TESTOSTERONA Y DHEA-S EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LAS CIFRAS DE LH SÉRICA:

La LH sérica y la testosterona en líquido folicular se asociaron de modo negativo; disminuyendo los niveles de LH sérica a medida que aumentaron los de testosterona folicular, sin llegar a alcanzar la significación estadística (tabla 9). En el caso de la DHEA-S en cambio, se asoció positivamente con las cifras de LH sérica sin alcanzar tampoco la significación estadística.

Tabla 9. **LH SÉRICA Y ANDRÓGENOS FOLICULARES**

N =73		LH SÉRICA
Testosterona	Correlación de Pearson	- 0,011
	Valor p	0,930
DHEAS	Correlación de Pearson	0,097
	Valor p	0,413

2.5 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HORMONAS FOLICULARES Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL CICLO DE ESTIMULACIÓN (tabla 10):

En los datos de la muestra se apreció un descenso en las cifras de DHEAS a medida que aumentaron los días de frenaje con agonistas de GnRH ($p=0,0003$). En el caso del estradiol, la progesterona y la testosterona folicular la asociación fue positiva, aunque no se alcanzó la significación estadística.

En cuanto a la dosis de rFSH total, se observó una asociación positiva con las cifras de estradiol, testosterona y DHEA-S y una asociación negativa con los niveles de progesterona, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas.

Cuanto más días de rFSH, mayores fueron los niveles tanto de testosterona como de DHEA-S en las pacientes estudiadas ($p=0,03$; $p=0,03$). La asociación con el estradiol y la progesterona fue negativa, sin llegar a la significación estadística.

Y en relación al pico de estradiol el día de la hCG, se dio también una asociación negativa con la testosterona y el DHEA-S ($p=0,02$; $p=0,004$) y positiva con el estradiol y la progesterona folicular.

Tabla 10. **RELACIÓN ENTRE NIVELES HORMONALES Y DIVERSAS CARACTERÍSTICAS DEL CICLO**

Análisis de estimadores del parámetro Ecuación de Estimación Generalizada				
Parámetro	Estimador	95% confianza	Límites de	Valor p
Días de GnRH				
Estradiol	2 278,90	-6 105,18	10 662,99	0,59
Progesterona	308,59	-472,53	1 089,72	0,43
Testosterona	0,002	-0,091	0,095	0,96
DHEA-S	-4,45	-6,84	-2,05	0,000 3
Dosis de rFSH				
Estradiol	33,86	-106,02	173,74	0,63
Progesterona	-4,03	-15,42	7,35	0,48
Testosterona	0,000 6	-0,000 2	0,001	0,15
DHEA-S	0,003	-0,02	0,03	0,83
Días de rFSH				
Estradiol	-22 371,8	-52 403,3	7 659,61	0,14
Progesterona	-334,95	-2 600,64	1 930,72	0,77
Testosterona	0,37	0,01	0,52	0,03
DHEA-S	9,35	0,85	17,84	0,03
Pico de estradiol el día de HCG				
Estradiol	6,18	-80,01	92,38	0,88
Progesterona	2,25	-3,31	7,82	0,42
Testosterona	-0,000 7	-0,001	-0,000 1	0,02
DHEA-S	-0,03	-0,05	-0,009	0,004

2.6 CORRELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR ENTRE SÍ SEGÚN LA PRESENCIA O NO DE OVOCITO Y EL TIPO DE FECUNDACIÓN (tabla 11):

En los casos de líquidos foliculares sin ovocito, se observó una correlación positiva significativa entre la testosterona y el estradiol ($r= 0,552$; $p = 0,041$) y entre la testosterona y la DHEA-S ($r= 0,644$; $p= 0,013$). Así, a medida que aumentaron las cifras de testosterona folicular se incrementaron las de estradiol por una parte y las DHEA-S por otra (ilustración 32).

En los líquidos foliculares con presencia de ovocito que presentaron una fecundación normal, se obtuvo una asociación positiva estadísticamente significativa entre la testosterona y la progesterona folicular ($r=0,794$; $p= 0,000 1$). Cuanto mayores cifras de progesterona en estos líquidos foliculares, mayor nivel de testosterona (ilustración 33).

Y, por último, en los líquidos foliculares con ovocito pero que presentaron una fecundación fallida también se dió una asociación positiva estadísticamente significativa entre las cifras de progesterona y testosterona folicular ($r=0,829$; $p = 0,000 1$) (ilustración 34).

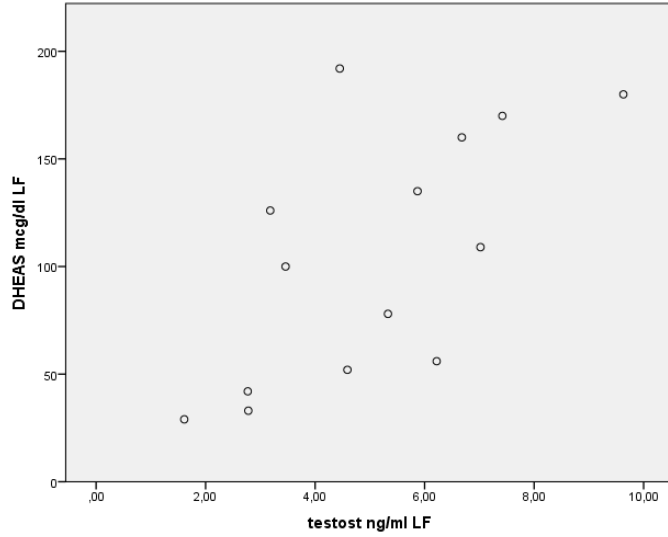
Tabla 11. **CORRELACIÓN HORMONAL FOLICULAR SEGÚN LA PRESENCIA DE OVOCITO Y EL TIPO DE FECUNDACIÓN**

r: correlación de Pearson

GRUPO	Parámetro		Estradiol	Progesterona	testosterona	DHEAS
Sin ovocito N=14	Estradiol	r	1	-0,394	0,552	0,348
		Valor p		0,164	0,041	0,223
	Progesterona	r	-0,394	1	-0,038	0,215
		Valor p	0,164		0,897	0,460
Testosterona	r	0,552	-0,038	1	0,644	
	Valor p	0,041	0,897		0,013	
DHEA-S	r	0,348	0,215	0,644	1	
	Valor p	0,223	0,460	0,013		
Ovocito fecundado N=38	Estradiol	r	1	0,000	0,094	-0,170
		Valor p		0,998	0,573	0,308
	Progesterona	r	0,000	1	0,794	-0,039
		Valor p	0,998		0,000 1	0,814
Testosterona	r	0,094	0,794	1	0,209	
	Valor p	0,573	0,000 1		0,207	
DHEA-S	r	-0,170	-0,039	0,209	1	
	Valor p	0,308	0,814	0,207		
Ovocito fecundación fallida N=21	Estradiol	r	1	0,224	0,065	0,247
		Valor p		0,330	0,781	0,280
	Progesterona	r	0,224	1	0,829	0,326
		Valor p	0,330		0,000 1	0,150
Testosterona	r	0,065	0,829	1	0,364	
	Valor p	0,781	0,000 1		0,105	
DHEA-S	r	0,247	0,326	0,354	1	
	Valor p	0,280	0,150	0,105		

Ilustración 32. CORRELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR ENTRE SÍ EN AUSENCIA DE OVOCITO

A:



B:

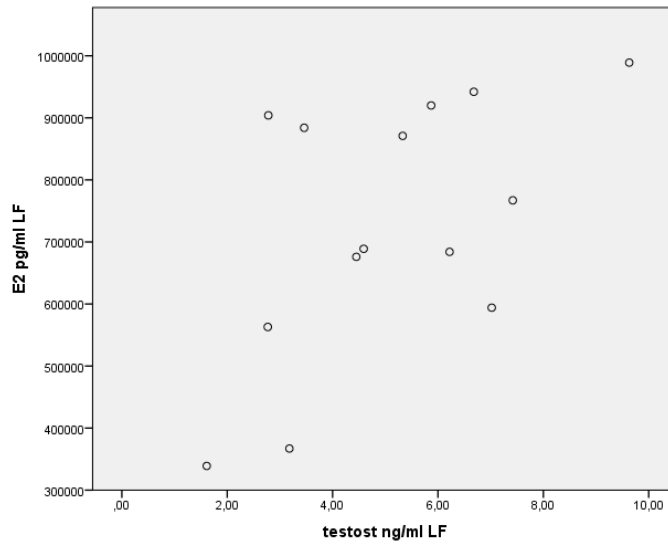


Ilustración 33. CORRELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA Y LA TESTOSTERONA FOLICULAR EN CASOS DE OVOCITO CON FECUNDACIÓN NORMAL

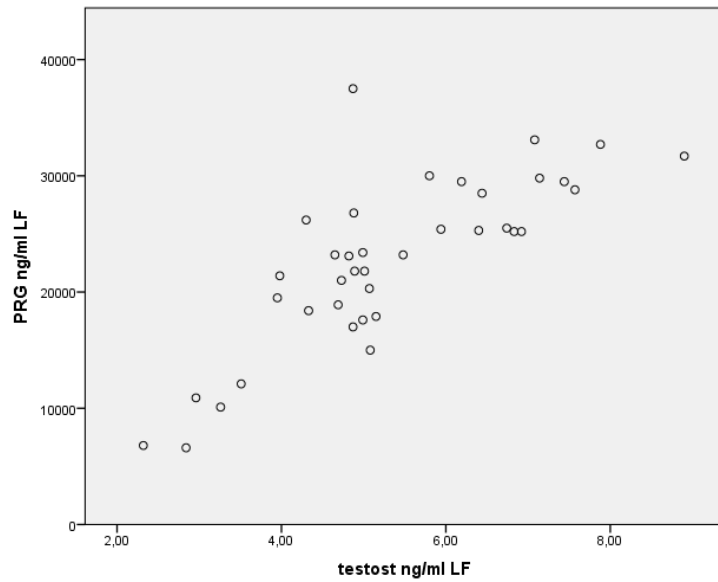
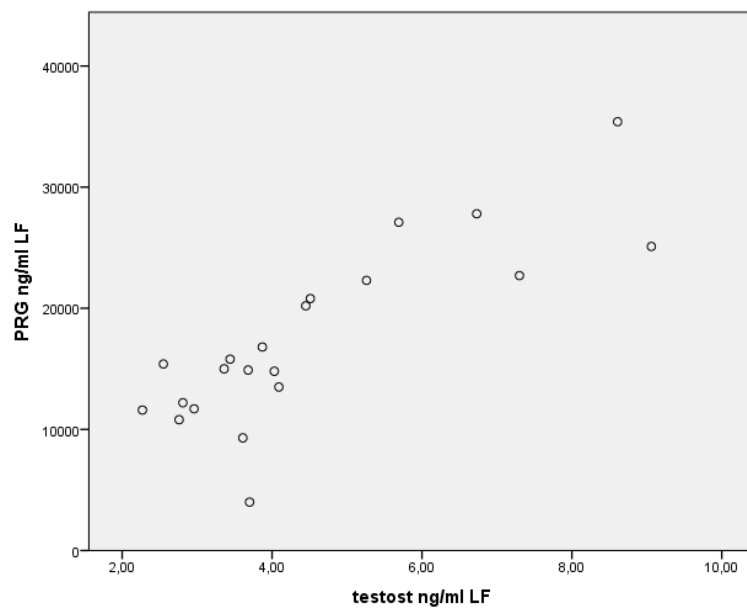


Ilustración 34. CORRELACIÓN ENTRE LA PROGESTERONA Y LA TESTOSTERONA FOLICULAR EN CASOS DE OVOCITO CON FECUNDACIÓN FALLIDA



2.7 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA PRESENCIA O AUSENCIA DE OVOCITO EN EL LÍQUIDO FOLICULAR ASPIRADO:

Las cifras de estradiol, testosterona, DHEA-S y los ratios estradiol/progesterona y estradiol/testosterona fueron mayores en líquido folicular con presencia de ovocito que en folículos sin ovocitos. Las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Los valores se exponen en la tabla 12.

Tabla 12. NIVELES HORMONALES PROCEDENTES DE FOLÍCULOS CON Y SIN OVOCITO

NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR	CON OVOCITO	SIN OVOCITO	Valor p
Estradiol (pg/ml)	740 202,1 (676 934,7-803 469,4)	720 676,0 (607 606,5 - 833 745,5)	0,75
Progesterona (ng/ml)	20 986,16 (18 849,18-23 123,14)	32 195,53 (14 496,74-49 894,32)	0,22
Testosterona (ng/ml)	5,01 (4,47-5,55)	4,65 (3,73-5,58)	0,37
DHEA-S (mcg/dl)	129,73 (111,59-147,87)	123,02 (102,36-143,68)	0,21
Ratio estradiol/progesterona	42,39(34,53-50,25)	35,22 (25,49-44,96)	0,22
Ratio estradiol/testosterona	166 166,9 (141 698,9-190 634,9)	163 775,8 (130 516,6-197 034,9)	0,89

2.8 RELACIÓN ENTRE DIVERSAS CARACTERÍSTICAS DEL CICLO Y EL TIPO DE FECUNDACIÓN:

No se obtuvo ninguna asociación relevante entre las características del ciclo de estimulación expuestas en la tabla 13 y el tipo de fecundación (normal o fallida).

Tabla 13. CARACTERÍSTICAS DEL CICLO Y TIPO DE FECUNDACIÓN

	FECUNDACIÓN NORMAL	FECUNDACIÓN FALLIDA	Valor p
Edad	33,00 (31,82 - 34,18)	33,27 (32,11-34,43)	0,15
FSH basal (UI/L)	6,69 (6,06 - 7,32)	6,71 (6,08-7,35)	0,26
Días FSH r	9,93 (9,32-10,53)	9,87 (9,22-10,57)	0,50
Pico estradiol (pg/ml)	1 555,00 (1 298,71-1 811,28)	1 527,63 (1 247,73-1 807,53)	0,71
Nº ovocitos reclutados	8,96 (7,51-10,41)	8,96 (7,51-10,41)	0,61
Volumen folicular ml	4,80 (3,70-5,70)	3,90 (3,00-4,30)	0,40
Tamaño folicular mm	18,95 (18,52-19,38)	18,99 (18,50 - 19,48)	0,85
Dosis total FSH	1 638,28 (1 476,93-1 799,62)	1 637,29 (1 473,38-1 801,20)	0,97

2.9 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y EL TIPO DE FECUNDACIÓN:

Los niveles de estradiol, progesterona, testosterona y DHEA-S fueron superiores en casos de fecundación normal que en casos de fecundación fallida (tabla 14). La asociación alcanzó la significación estadística en el caso de la progesterona ($p = 0,003$).

Tabla 14. DIFERENCIAS EN HORMONAS FOLICULARES SEGÚN FECUNDACIÓN NORMAL O FALLIDA

NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR	FECUNDACIÓN NORMAL	FECUNDACIÓN FALLIDA	Valor p
Estradiol (pg/ml)	764 723,9 (680 918,8-848 529,0)	693 372,8 (625 186,4-761 559,3)	0,15
Progesterona (ng/ml)	22 554,29 (19 790,04-25 318,54)	17 448,70 (14 711,92-20 185,47)	0,003
Testosterona (ng/ml)	5,32 (4,74-5,90)	4,49 (3,70-5,27)	0,07
DHEA-S (mcg/dl)	136,92 (117,01-156,83)	120,55 (100,36-140,74)	0,10
Ratio estradiol/progesterona	40,72(30,97-50,47)	45,41 (37,13-53,68)	0,35
Ratio estradiol/testosterona	157 851,5 (130 375,0-185 327,9)	179 843,9 (146 250,8-213 437,0)	0,24

2.10 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA CALIDAD OVOCITARIA GLOBAL DEL CICLO:

Al comparar los distintos niveles hormonales foliculares con las diferentes calidades ovocitarias globales, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de progesterona entre calidad ovocitaria no destacable y buena calidad ovocitaria ($p=0,006$) y entre buena y muy mala calidad ovocitaria ($p=0,04$). Se obtuvieron diferencias límite estadísticamente significativas en las cifras de DHEA-S respecto a calidad ovocitaria no destacable y mala calidad ovocitaria ($p= 0,05$). Y en el ratio estradiol/progesterona hubo diferencias estadísticamente significativas entre buena y mala calidad ovocitaria ($p= 0,006$) (tabla 15).

Tabla 15. NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y CALIDAD OVOCITARIA GLOBAL DEL CICLO

NIVELES HORMONALES EN LIQUIDO FOLICULAR	Calidad ovocitaria No destacable	Calidad ovocitaria Buena	Calidad ovocitaria Mala	Calidad Ovocitaria Muy mala
Estradiol (pg/ml)	682 647,8 (489 996,4- 875 299,3)	776 411,2 (726 797,7- 826 024,7)	753 434,2 (701 156,3- 805 712,0)	714 320,2 (530 553,3- 898 087,1)
Progesterona (ng/ml)	20 362,48 (16 655,02- 24 069,94)	28 185,59 (24 007,35- 32 363,82)	22 892,90 (16 139,14- 29 646,66)	22 554,04 (19 136,31- 25 971,77)
Testosterona (ng/ml)	5,28(4,17-6,40)	5,99 (4,41- 7,58)	4,45 (3,80- 5,11)	5,02 (4,39- 5,66)
DHEA-S (mcg/dl)	157,24 (115,01- 199,47)	129,72 (81,24- 178,21)	111,72 (91,30- 132,15)	146,09 (91,13- 201,05)
Ratio estradiol/progesterona	37,67 (21,52 - 53,83)	30,59 (23,74- 37,45)	47,19 (37,32- 57,06)	35,32 (21,65- 48,99)
Ratio estradiol/testosterona	142 464,5 (86 403,17- 198 525,9)	141 603,5 (106 639,4- 176 567,6)	186 607,9 (157 642 - 215 573,7)	155 056,2 (96 664,46- 213 447,9)

2.11 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA CALIDAD EMBRIONARIA AGRUPADA EN SUPERIOR (CALIDAD EMBRIONARIA A + B) E INFERIOR (CALIDAD EMBRIONARIA C + D):

Los embriones de calidad embrionaria superior se obtuvieron de ovocitos inmersos en un líquido folicular con mayores niveles de estradiol sin llegar a alcanzar la significación estadística. Las cifras de progesterona, testosterona y de DHEA-S fueron similares en ambos grupos de calidad embrionaria (tabla 16).

Tabla 16. RELACIÓN ENTRE LAS HORMONAS EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA CALIDAD EMBRIONARIA

	CALIDAD EMBRIONARIA SUPERIOR (A+B)	CALIDAD EMBRIONARIA INFERIOR (C+D)	VALOR P
Estradiol (pg/ml)	778 666,2 (683 960,0-873 372,4)	683 134,6 (593 648,1-772 621,0)	0,06
Progesterona (ng/ml)	21 720,46 (18 589,85-24 851,06)	22 462,89 (18 257,84-26 667,94)	0,70
Testosterona (ng/ml)	5,15 (4,50-5,80)	4,87 (4,18-5,56)	0,29
DHEA-S (mcg/dl)	141,46 (120,56-162,36)	140,94 (115,19-166,68)	0,95
Ratio estradiol/progesterona	40,98 (31,90-50,06)	37,71 (22,69-52,74)	0,66
Ratio estradiol/testosterona	163 673,7 (137 855,1-189 492)	156 704,4 (118 361,9-195 047,0)	0,64

2.12 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES FOLICULARES Y LA CALIDAD EMBRIONARIA:

La relación entre los niveles de hormonas en líquido folicular y la calidad embrionaria desglosada en sus cuatro modalidades (A,B,C,D) se describe en la tabla 17.

En las cifras de estradiol, existieron diferencias estadísticamente significativas entre las calidades embrionarias B y C y entre las calidades C y D ($p=0,01$; $p=0,03$).

En el caso de los ratios, se obtuvieron diferencias significativas entre las calidades embrionarias A y C en el ratio estradiol/progesterona ($p= 0,003$) y entre las calidades B y C en el caso del ratio estradiol/testosterona ($p=0,001$).

Tabla 17. **RELACIÓN ENTRE LAS HORMONAS EN LÍQUIDO FOLICULAR Y LA CALIDAD EMBRIONARIA DE LOS EMBRIONES TRANSFERIDOS O CRIOPRESERVADOS (N=31)**

A:

	Calidad embrionaria tipo A	Calidad embrionaria tipo B	Calidad embrionaria tipo C	Calidad embrionaria tipo D
Pico estradiol el día de hCG	1 694,00 (1 284,91- 2 103,08)	1 575,27 (1 166,18- 1 984,36)	1 449,80 (843,02- 2 056,57)	1 458,50 (904,59-2 012,40)
Estradiol (pg/ml)	762 117,1 (642 716,0- 881 518,2)	792 802,0 (608 395,5- 977 208,4)	606 750,8 (496 450- 717 051,5)	747 939,6 (647 626,8 - 848 252,4)
Progesterona (ng/ml)	20 714,64 (16 177,58- 25 251,7)	22 708,06 (19 203,70- 26 212,42)	23 916,22 (21 002,83- 26 829,60)	21 409,78 (15 620,51- 27 199,55)
Testosterona (ng/ml)	5,09 (4,07- 6,11)	5,12 (4,21- 6,04)	4,73 (3,96- 5,50)	5,04 (4,17-5,92)
DHEA-S (mcg/dl)	137,91 (111,59- 164,23)	146,66 (124,47- 168,84)	145,74 (114,99- 176,48)	136,81 (114,54- 159,07)
Ratio estradiol/progesterona	45,37 (31,95- 58,79)	35,93 (28,61- 43,26)	27,17 (23,11- 31,23)	46,55 (23,56- 69,54)
Ratio estradiol/testosterona	162 456,0 (132 377,6- 192 534,4)	166 316,1 (134 779,7- 197 852,5)	141 047,4 (118 567,4- 163 527,5)	170 670,0 (121 326,6- 220 013,4)

B: ESTRADIOL

Calidad embrionaria		Estimador	Valor p	Limites de	Confianza
A	B	-30 684,9	0,803 9	(-272 944	211 573,7)
A	C	155 366,3	0,065 0	(-9 679,99	320 412,6)
A	D	14 177,47	0,851 7	(-134 482	162 836,6)
B	C	186 051,2	0,0192	(30 338,09	341 764,3)
B	D	44 862,37	0,666 5	(-159 173	248 898,0)
C	D	-141 189	0,038 5	(-274 924	-7 454,04)

C: PROGESTERONA

Calidad embrionaria		Estimador	Valor p	Limites de	Confianza
A	B	-1 993,42	0,471 2	-7 416,41	3 429,572
A	C	-3 201,57	0,189 7	-7 986,12	1 582,975
A	D	-695,137	0,808 4	-6 312,68	4 922,411
B	C	-1 208,16	0,496 5	-4 690,31	2 274,001
B	D	1 298,282	0,661 5	-4 513,80	7 110,365
C	D	2 506,437	0,363 2	-2 896,16	7 909,038

D: TESTOSTERONA

Calidad embrionaria		Estimador	Valor p	Limites de	Confianza
A	B	-0,036 1	0,960 1	-1,450 1	1,377 9
A	C	0,359 6	0,561 3	-0,853 7	1,572 9
A	D	0,044 1	0,922 6	-0,845 8	0,934 0
B	C	0,395 6	0,361 2	-0,453 6	1,244 8
B	D	0,080 2	0,881 1	-0,970 4	1,130 8
C	D	-0,315 5	0,533 9	-1,309 4	0,678 5

E: DHEAS

Calidad embrionaria		Estimador	Valor p	Limites de	Confianza
A	B	-8,750 2	0,509 0	-34,719 9	17,2 19 5
A	C	-7,829 3	0,556 3	-33,911 6	18,252 9
A	D	1,000	0,889 2	-14,376 2	16,576 2
B	C	0,920 8	0,951 6	-28,841 0	30,682 7
B	D	9,850 2	0,347 4	-10,697 9	30,398 3
C	D	8,929 3	0,349 1	-9,762 8	27,621 5

F: RATIO ESTRADIOL/PROGESTERONA

Calidad embrionaria		Estimador	Valor p	Limites de	Confianza
A	B	9,437 0	0,174 7	-4,191 3	23,065 3
A	C	18,201 2	0,003 7	5,925 2	30,477 1
A	D	-1,180 4	0,923 6	-25,314 4	2,953 6
B	C	8,764 2	0,000 9	3,578 5	13,949 9
B	D	-10,617 4	0,363 0	-33,492 4	12,257 6
C	D	-19,381 6	0,077 4	-40,893 2	2,130 0

G: RATIO ESTRADIOL/TESTOSTERONA

Calidad embrionaria		Estimador	Valor p	Limites de	Confianza
A	B	-3 860,15	0,823 4	-37 753,2	30 032,86
A	C	21 408,54	0,100 6	-4 149,97	46 967,06
A	D	-8 214,03	0,717 9	-52 777,8	36 349,70
B	C	25 268,70	0,013 3	5 266,209	45 271,18
B	D	-4 353,88	0,850 4	-49 588,3	40 880,59
C	D	-29 622,6	0,137 4	-68 703,3	9 458,162

2.13 NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR DE FOLÍCULOS CON OVOCITOS QUE FECUNDAN DANDO COMO RESULTADO UN EMBRIÓN QUE SE TRANSFIERE O NO O BIEN SE CRIOPRESERVA O NO (tabla 18):

Los embriones seleccionados para transferencia en fresco procedieron de ovocitos inmersos en líquido folicular con mayores cifras tanto de estradiol como de progesterona, testosterona y DHEA-S y con menores ratios de estradiol/progesterona y de estradiol/testosterona foliculares. Estas diferencias no llegaron a ser significativas estadísticamente. En el caso de los embriones elegidos para criopreservación, se obtuvieron resultados en la misma línea. Los embriones criopreservados procedieron de líquidos foliculares con mayores niveles de estradiol, progesterona, testosterona y DHEA-S. Entre estos datos sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las cifras tanto de progesterona entre embriones criopreservados y no criopreservados ($p=0,0001$) como de testosterona ($p=0,0001$). En los ratios tanto de estradiol/progesterona como de estradiol/testosterona también se dio la significación estadística al compararlos entre embriones criopreservados y no ($p=0,02$ y $p=0,0001$). Entre los no transferidos y no criopreservados se incluyeron los embriones que no evolucionaron.

Tabla 18. DIFERENCIAS EN LOS NIVELES HORMONALES ENTRE EMBRIONES TRANSFERIDOS O NO Y CRIOPRESERVADOS O NO.

	Embrión Transferido	Embrión No transferido	Valor p	Embrión criopreservado	Embrión no criopreservado	Valor p
Estradiol (pg/ml)	777 143,11 (707 626,31- 846 659,91)	649 178,21 (467 155,61- 831 200,81)	0,19	791 747,2 (557 377,1- 1 026 117)	688 000,0 (585 443,1- 790 556,9)	0,42
Progesterona (ng/ml)	23 172,89 (19 689,10- 26 656,68)	18 660,22 (12 345,83- 24 974,61)	0,13	22 931,19 (20 207,49- 25 654,90)	9 200,00 (5 873,83- 12 526,17)	0,0001
Testosterona (ng/ml)	5,42 (4,70- 6,15)	4,27 (2,28- 6,25)	0,20	5,25 (4,62-5,89)	2,29 (2,26- 2,32)	0,0001
DHEA-S (mcg/dl)	134,37 (112,70- 156,04)	121,37 (82,80- 159,94)	0,52	155,93 (118,11- 193,76)	107,50 (56,91- 138,08)	0,13
Ratio E/P	39,20 (29,75- 48,65)	56,43 (28,49- 84,37)	0,19	33,85 (24,59- 43,11)	82,49 (41,52- 123,46)	0,02
Ratio E/T	153 319,1 (129 661,6- 176 976,7)	201 461,0 (126 525,6- 276 396,4)	0,18	149 550,6 (111 761,4- 187 339,7)	299 466,4 (259 300,4- 339 632,5)	0,0001

2.14 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y EL RESULTADO DE GESTACIÓN O NO CON EMBRIONES TRANSFERIDOS O CRIOPRESERVADOS (tabla 19)

Los niveles de estradiol fueron superiores en las pacientes que consiguieron una gestación ($p=0,02$). Los ratios de estradiol/progesterona y de estradiol/testosterona fueron también superiores en estas pacientes, aunque sin llegar a resultados estadísticamente significativos en estos casos.

Tabla 19. **DIFERENCIAS EN NIVELES HORMONALES EN CASOS DE GESTACIÓN Y NO GESTACIÓN**

	TOTAL EMBRIONES N=21+10			EMBRIONES TRANSFERIDOS N=21		
	Gestación GLOBAL (TRANSFERIDOS Y CRIOPRESERVADOS)	NO gestación	Valor p	Gestación	No gestación	Valor p
Estradiol (pg/ml)	824 772,6 (719 477,7- 930 067,5)	688 267,8 (625 130,0- 751 405,5)	0,02	752 533,1 (669 562,5- 835 503,6)	696 850,4 (554 138,4- 839 562,3)	0,44
Progesterona (ng/ml)	22 680,00 (18 307,44- 27 052,57)	23 425,28 (18 483,26- 28 367,29)	0,82	22 947,27 (20 159,32- 25 735,22)	17 643,90 (10 917,34- 24 370,46)	0,10
Testosterona (ng/ml)	5,08 (4,11-6,05)	4,88 (4,23- 5,52)	0,72	5,32 (4,75-5,90)	4,25 (2,32- 6,19)	0,27
DHEA-S (mcg/dl)	145,49 (120,09- 170,89)	119,41 (95,46- 143,35)	0,14	139,68 (118,49- 160,88)	126,13 (87,50- 164,76)	0,49
Ratio estradiol/ progesterona	49,62 (33,15-66,09)	36,69 (30,89- 42,49)	0,14	37,34 (29,51- 45,18)	57,12 (28,46- 85,78)	0,15
Ratio estradiol/ testosterona	181 550,1 (139 882,4- 223 217,9)	157 608,4 (130 997,7- 184 219,1)	0,34	152 539,9 (130 687,3- 174 392,4)	206 185,6 (131 711,8- 280 659,3)	0,11

2.15 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR Y EL TIPO DE GESTACIÓN CONSEGUIDA:

Al comparar las cifras hormonales según el resultado final de la gestación (aborto versus niño vivo en casa) las diferencias no fueron significativas desde el punto de vista estadístico pero se obtuvieron cifras superiores de estradiol, testosterona y DHEA-S entre los casos de gestación evolutiva con respecto a los casos de aborto (tabla 20). Los ratios tanto de estradiol/progesterona como de estradiol/testosterona fueron también superiores en estas pacientes con niño vivo.

Tabla 20. **DIFERENCIAS HORMONALES ENTRE LOS CASOS DE ABORTO Y GESTACIÓN EVOLUTIVA**

NIVELES HORMONALES EN LÍQUIDO FOLICULAR	Gestación. ABORTO	Gestación EVOLUTIVA. NIÑO VIVO EN CASA.	Valor P
Estradiol (pg/ml)	803 266,8 (602 014,4- 1 004 519)	839 625,2 (727 556,2- 951 694,2)	0,75
Progesterona (ng/ml)	21 283,38 (18 683,46-23 883,31)	20 950,62 (13 332,67-28 568,56)	0,93
Testosterona (ng/ml)	4,84 (4,39-5,29)	5,09 (3,60-6,59)	0,75
DHEA-S (mcg/dl)	137,90 (87,24-188,56)	149,61 (122,82-176,40)	0,68
Ratio estradiol/progesterona	39,86 (27,19-52,54)	57,72 (32,75-82,68)	0,21
Ratio estradiol/testosterona	172 321,6 (125 776,3-218 867,0)	195 075,0 (133 713,0-256 437,0)	0,56

2.16 DIFERENCIAS HORMONALES INTRA-SUJETO:

Se evaluó la existencia de diferencias en los niveles hormonales entre folículos para valorar la correlación intra-sujeto. Para ningún nivel hormonal se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre folículos (tabla 21).

2.16.1 VALORACIÓN DEL ESTRADIOL INTRA-SUJETO

Las diferencias en los niveles de estradiol folicular entre los diferentes folículos de una paciente no fueron estadísticamente significativa ($p= 0,79$) (ilustración 35.A).

2.16.2 VALORACIÓN DE LA PROGESTERONA INTRA-SUJETO

Las diferencias en los niveles de progesterona folicular entre los diferentes folículos de una paciente no fueron estadísticamente significativa ($p= 0,82$) (ilustración 35.B)

2.16.3 VALORACIÓN DE LA TESTOSTERONA INTRA-SUJETO

Las diferencias en los niveles de estradiol folicular entre los diferentes folículos de una paciente no fueron estadísticamente significativa ($p= 0,28$) (ilustración 35.C).

2.16.4 VALORACIÓN DE LA DHEAS INTRA-SUJETO

Las diferencias en los niveles de DHEA-S folicular entre los diferentes folículos de una paciente no fueron estadísticamente significativa ($p= 0,33$) (ilustración 35.D).

Tabla 21. **DIFERENCIAS EN LOS NIVELES HORMONALES INTRA-SUJETO**

A: ESTRADIOL (ilustración 35.A):

ESTRADIOL	Estimador \pm Error estándar (alpha 0,05)	Valor p
Primer folículo	713 677 \pm 4 384	
Segundo folículo	751 277 \pm 33 943	P=0,79
Tercer folículo	778 144 \pm 57 837	
Cuarto folículo	732 657 \pm 94 426	

B: PROGESTERONA (ilustración 35.B):

PROGESTERONA	Estimador \pm Error estándar (alpha 0,05)	Valor p
Primer folículo	20 329 \pm 1 460	
Segundo folículo	21 062 \pm 1 319	P= 0,82
Tercer folículo	22 265 \pm 2 331	
Cuarto folículo	20 139 \pm 3 284	

C: TESTOSTERONA (ilustración 35.C):

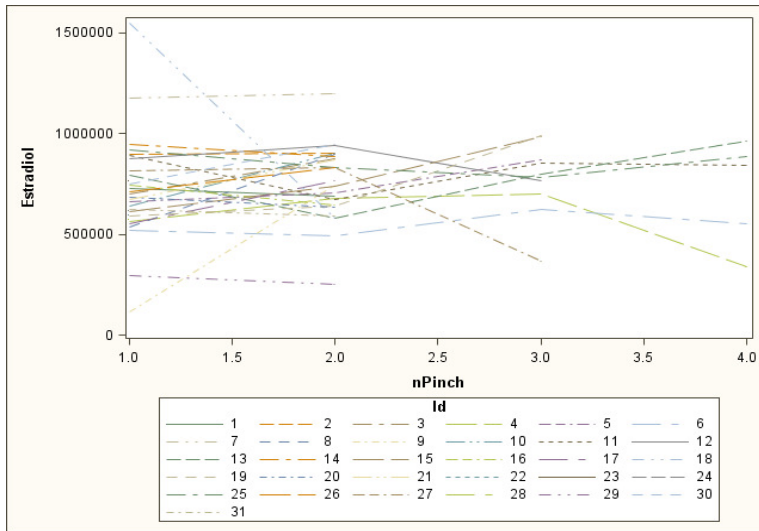
TESTOSTERONA	Estimador \pm Error estándar (alpha 0,05)	Valor p
Primer folículo	4,65 \pm 0,29	
Segundo folículo	5,22 \pm 0,31	P= 0, 28
Tercer folículo	5,31 \pm 0,44	
Cuarto folículo	4,90 \pm 0,82	

D: DHEA-S (ilustración 35.D):

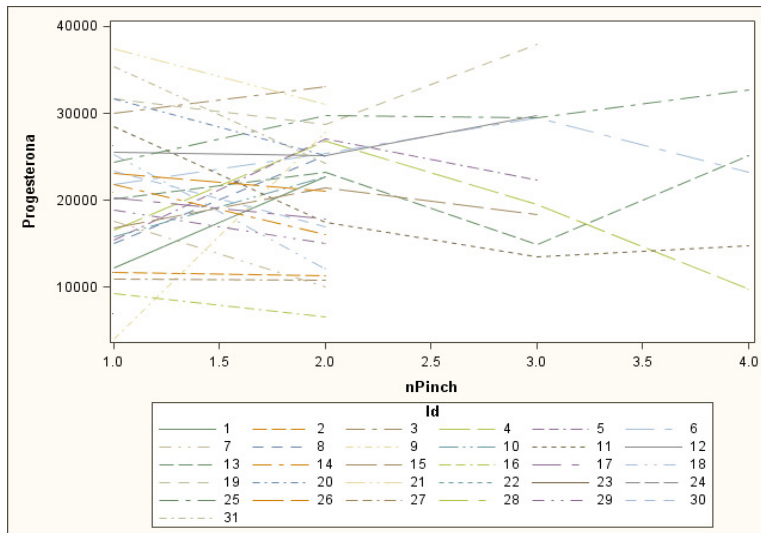
DHEA-S	Estimador \pm Error estándar (alpha 0,05)	Valor p
Primer folículo	122,87 \pm 9,52	
Segundo folículo	135,15 \pm 10,69	P=0,33
Tercer folículo	138,83 \pm 11,88	
Cuarto folículo	127,40 \pm 12,27	

ILUSTRACIÓN 35. VALORACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS INTRA-SUJETO

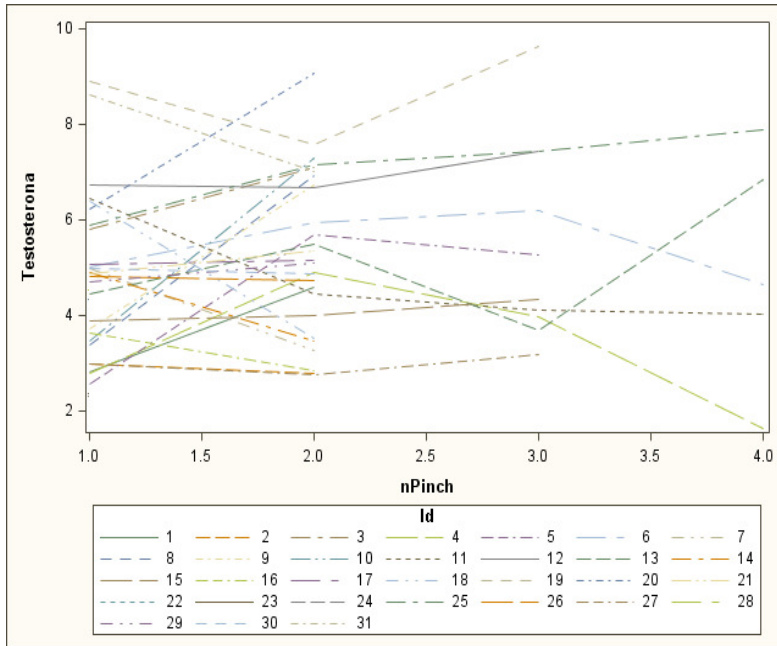
A: DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE ESTRADIOL FOLICULAR ENTRE LOS DIFERENTES FOLÍCULOS DE UNA PACIENTE (p= 0,79).



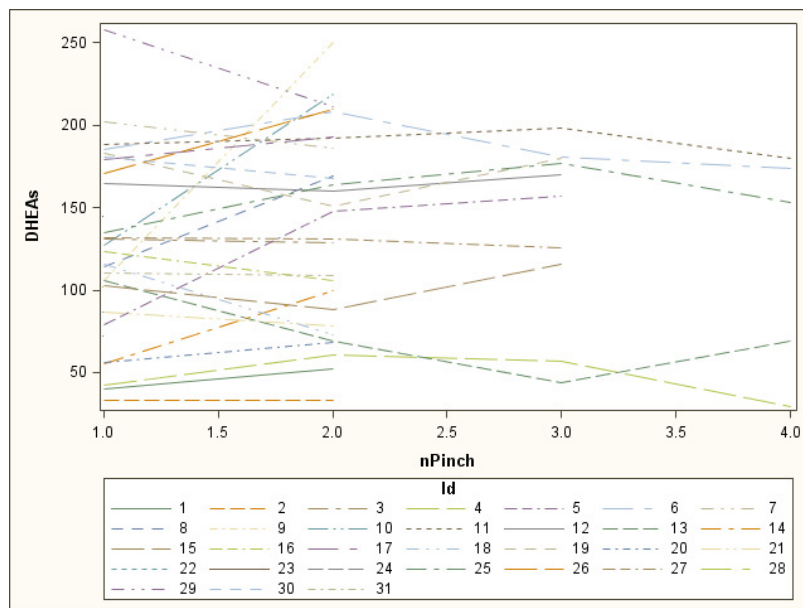
B: DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE PROGESTERONA FOLICULAR ENTRE LOS DIFERENTES FOLÍCULOS DE UNA PACIENTE (p= 0,82).



C: DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE TESTOSTERONA FOLICULAR ENTRE LOS DIFERENTES FOLÍCULOS DE UNA PACIENTE (p= 0,28).



D: DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE DHEA-S FOLICULAR ENTRE LOS DIFERENTES FOLÍCULOS DE UNA PACIENTE (p= 0,33).



2.17. DIFERENCIAS HORMONALES INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS (ilustraciones 36-39).

2.17.1. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS (ilustración 36).

La variación intra-sujeto fue aproximadamente el doble que la variación entre sujetos ($p=0,05$).

Coefficiente de correlación intra-clase: El 28% de la variabilidad total del estradiol fue debida a la diferencia entre sujetos.

El intervalo al 95% de confianza que representa la magnitud de variación entre sujetos es IC 95% = $[-3,373\ 834\ 239\ 999\ 99E+20, 3,373\ 834\ 240\ 000\ 01E+20]$

2.17.2. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS (ilustración 37).

La variación intra-sujeto fue aproximadamente la misma que la variación entre sujetos ($p=0,006$).

Coefficiente de correlación intra-clase: El 51% de la variabilidad total de la progesterona fue debida a la diferencia entre sujetos.

El intervalo al 95% de confianza que representa la magnitud de variación de la progesterona entre sujetos fue IC 95% = $[-2\ 023\ 699\ 996\ 689\ 320, 2\ 023\ 699\ 996\ 730\ 740]$.

2.17.3. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS (ilustración 38).

La variación intra-sujeto fue ligeramente menor que la variación entre sujetos ($p=0,002$).

Coefficiente de correlación intra-clase: El 54,78% de la variabilidad total de la testosterona fue debida a la diferencia entre sujetos.

El intervalo al 95% de confianza que representa la magnitud de variación de la progesterona entre sujetos fue IC 95% = $[-1,09, 11]$.

2.17.4. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE DHEA-S INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS (ilustración 39).

La variación intra-sujeto fue aproximadamente un tercio la variación entre sujetos (p=0,000 3).

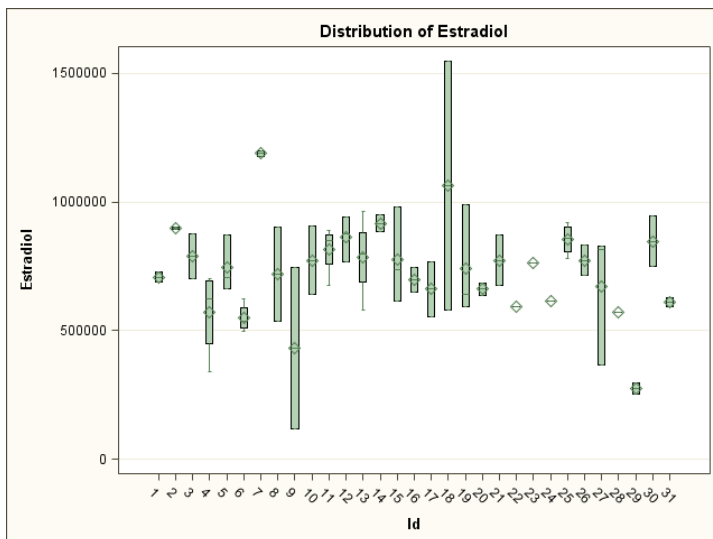
Coefficiente de correlación intra-clase: El 77,95% de la variabilidad total de la testosterona fue debida a la diferencia entre sujetos.

El intervalo al 95% de confianza que representa la magnitud de variación de la progesterona entre sujetos fue: IC 95%= [-12 104 968,41 , 12 105 225,71].

Ilustración 36. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS

DISTRIBUCIÓN DE ESTRADIOL POR SUJETO:

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS COVARIANZA	Estimador ± error estándar	Valor p
Entre sujetos	1,31 ± 8,18	0,05
Intra sujeto	3,37 ± 7,40	



DISTRIBUCIÓN DE LOS ERRORES

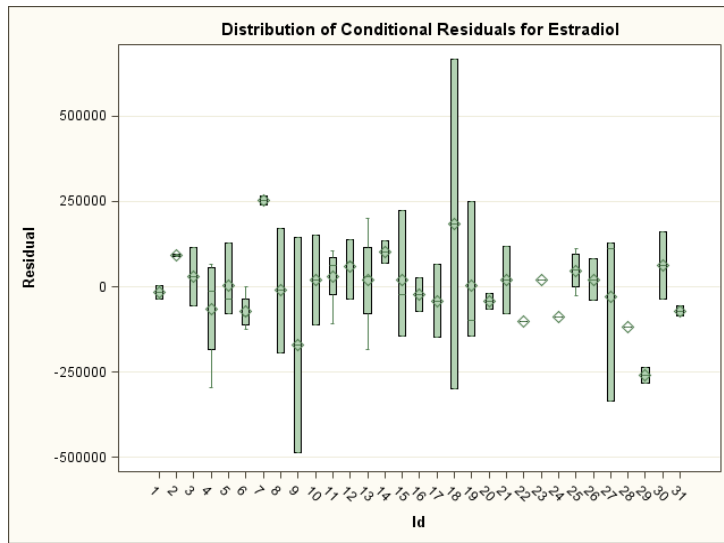
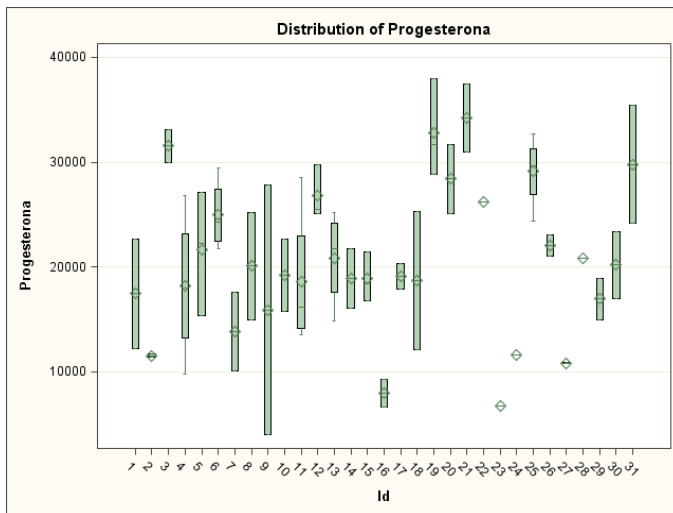


Ilustración 37.

VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE PROGESTERONA INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS

DISTRIBUCIÓN DE PROGESTERONA POR SUJETO:

ESTIMACIÓN PARÁMETROS COVARIANZA	DE	Estimador \pm error estándar	Valor p
Entre sujetos		32 132 538 \pm 12 798 083	0,006
Intra sujeto		30 931 756 \pm 6 904 590	



DISTRIBUCIÓN DE LOS ERRORES:

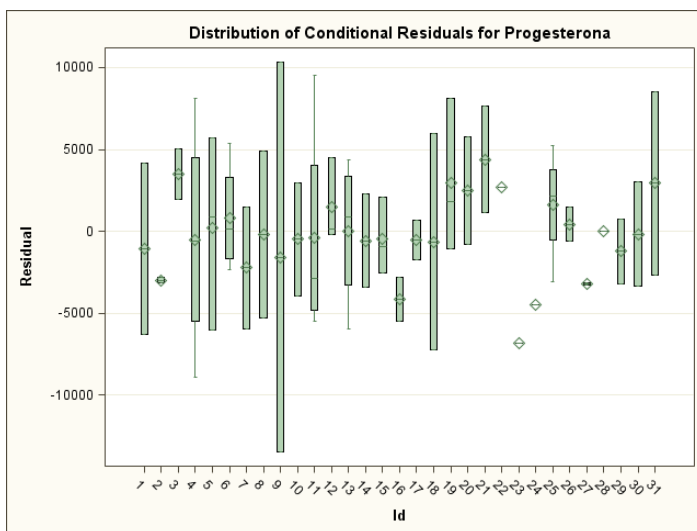
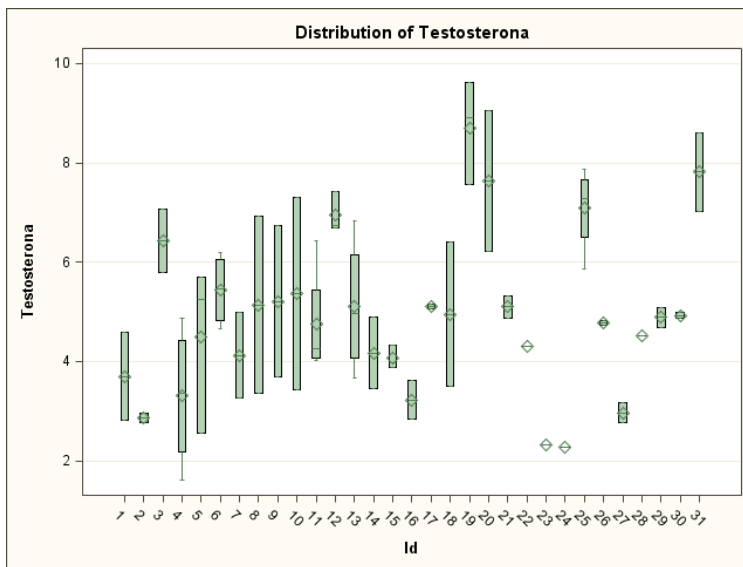


Ilustración 38. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS

DISTRIBUCIÓN DE TESTOSTERONA POR SUJETO:

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS COVARIANZA	Estimador \pm error estándar	Valor p
Entre sujetos	1,75 \pm 0,63	0,002
Intra sujeto	1,44 \pm 0,31	



DISTRIBUCIÓN DE LOS ERRORES

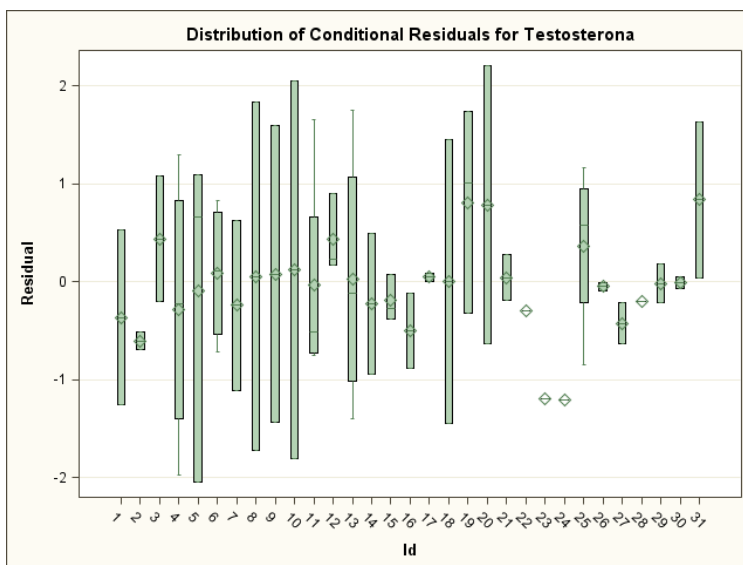
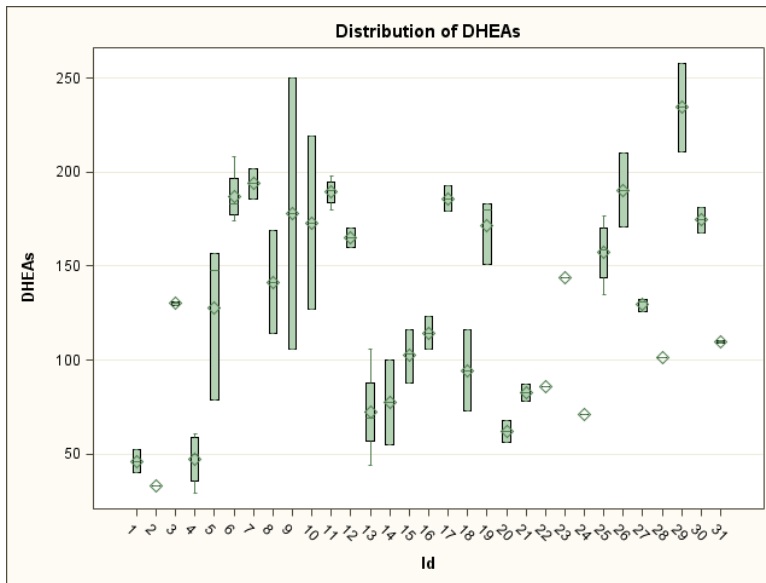


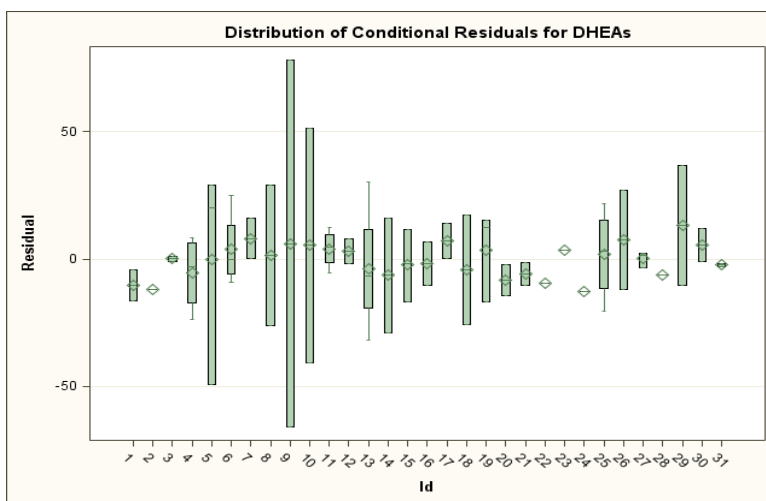
Ilustración 39. VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE DHEA-S INTRA-SUJETO Y ENTRE SUJETOS

DISTRIBUCIÓN DE DHEA-S POR SUJETO:

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE COVARIANZA	DE	Estimador \pm error estándar	Valor p
Entre sujetos		2 485,17 \pm 728,07	0,000 3
Intra sujeto		703,00 \pm 152,68	



DISTRIBUCIÓN DE LOS ERRORES:



DISCUSIÓN:

DISCUSIÓN:

La finalidad principal del estudio es valorar la relación de los niveles hormonales en líquido folicular con los distintos resultados reproductivos. Para ello ha sido fundamental la realización del mismo en las condiciones más basales posibles, intentando evitar al máximo las posibles interferencias en los niveles hormonales.

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:

Las causas de esterilidad con componente ovárico de cualquier índole (entre ellas el síndrome de ovarios poliquísticos o la endometriosis) fueron excluidas del estudio por su posible implicación en los niveles de hormonas esteroideas. Algunos trabajos han demostrado que las concentraciones de hormonas esteroideas en líquido folicular son diferentes en enfermedades hormono-dependientes tales como la endometriosis o el síndrome de ovarios poliquísticos (234, 235).

Las pacientes incluidas en el estudio fueron mujeres con una buena reserva ovárica cuantitativa como indican los parámetros medios de FSH basal, recuento de folículos antrales, cifras de hormona antimulleriana sérica y edad. Ello ha posibilitado estudiar las características cualitativas más fiablemente.

TRATAMIENTO:

El protocolo de estimulación empleado, ciclo largo con agonistas de GnRH, sin el empleo de hMG ni LH, permite conocer la respuesta androgénica pura de las pacientes tras la estimulación con sólo rFSH. Siguiendo el patrón del estudio, se ha usado este protocolo, clásicamente empleado en pacientes normorrespondedoras. El protocolo largo con agonistas de GnRH ha sido el más profundamente empleado en técnicas de reproducción asistida y supone la administración de gonadotropinas bajo la supresión hipofisaria con agonistas de GnRH (también llamado protocolo largo de regulación a la baja o *down-regulation*). Se trata de un protocolo simple que además permite la flexibilidad temporal para la recuperación ovocitaria. El empleo de un mismo protocolo en todas las pacientes y el uso exclusivamente de rFSH permiten valorar con la menor interferencia posible el contenido hormonal folicular.

Se emplearon protocolos suaves de estimulación ovárica como muestran la dosis total de rFSH administrada ($1633 \pm 455,39$ UI) y los días de estimulación hasta la administración de la HCG ($9,90 \pm 10,00$ días). El número de complejos puncionados al final del ciclo ($9,03 \pm 4,10$) también estuvo en la línea de esta estimulación suave. En la actualidad han cobrado peso los protocolos de estimulación suave que buscan la mayor semejanza con el ciclo ovárico fisiológico y embriones de buena calidad sobre un mayor número de embriones (236, 237).

Existe la posibilidad de diferencias en los niveles hormonales por las distintas dosis de estimulación empleadas, pero los criterios para punción folicular fueron claramente establecidos y los mismos para todas las pacientes, haciéndose necesario la individualización de la dosis según cada caso para optimizar sus resultados.

Con la hiperestimulación ovárica controlada, se rompen los mecanismos de control naturales y se reclutan múltiples folículos antes de la selección del folículo dominante y del fenómeno de atresia folicular. Después, a medida que progresa el ciclo de estimulación se produce la selección folicular, pero de varios folículos simultáneamente y son éstos, los de tamaño y características ecográficas idóneas, los que se seleccionaron para su punción en primer lugar y su inclusión en el estudio. Con este proceso de estimulación, los niveles de estradiol sérico aumentan notablemente lo que puede conllevar problemas de receptividad endometrial cuando las cifras se hacen excesivas (4). Los protocolos de estimulación suave permiten alcanzar cifras más comedidas que podrían evitar alteraciones a nivel endometrial.

La técnica de laboratorio empleada en los ovocitos reclutados fue la ICSI. Al limitar el estudio a ICSI se puede investigar la relación entre los niveles de hormonas foliculares y los resultados de fecundación específicos de cada ovocito siguiendo su evolución posterior por control de la maduración nuclear.

El análisis de la madurez ovocitaria fue efectuado inmediatamente después de la recuperación y sólo los ovocitos maduros fueron seleccionados para tratamiento mediante ICSI. La capacidad de un ovocito de ser fecundado puede estar limitada en los fallos de la FIV convencional por la posible implicación del factor masculino.

En casos de ICSI, algunos estudios previos han mostrado que los resultados de fecundación, incluso de embarazo, no dependen de parámetros en muestras de semen tales como concentración, motilidad, morfología, incidencia de espermatozoides con condensación de cromatina anormal, incidencia de espermatozoides con fragmentación de DNA o incidencia de espermatozoides apoptóticos. Todo ello probablemente por la estricta selección de un número reducido de espermatozoides. Lo que implica que en ICSI, el factor crítico para los resultados de fecundación es el ovocito (238, 239, 240, 241, 242). Así el empleo de ICSI en este estudio como técnica, permite postular que los resultados de fecundación obtenidos son principalmente dependientes de la calidad ovocitaria, y consecuentemente, se podría investigar la relación entre las hormonas intrafoliculares y los resultados de fecundación.

Al limitar el estudio a ICSI se salva otro problema relevante para la estimación de la calidad ovocitaria en relación a la composición del líquido folicular que es la valoración de la maduración nuclear ovocitaria en un periodo corto de tiempo desde la recuperación ovocitaria y que generalmente sólo suele realizarse en los casos de ICSI. En los casos de FIV suele efectuarse al día siguiente y el ovocito maduro puede haber completado la maduración nuclear cuando se cultiva (14). Gran parte de los estudios publicados han quedado limitados por la incertidumbre de si las muestras de líquido folicular estudiadas eran originarias de folículos que contenían un ovocito maduro en el momento de la aspiración folicular porque la madurez ovocitaria no fue medida en el día de la recuperación ovocitaria(14). Este problema pues ha quedado resuelto mediante el análisis del líquido folicular que acompaña al ovocito en el proceso de ICSI en el que el *cumulus oophorus* y la *corona radiata* se extraen en un corto periodo de tiempo desde la recuperación, permitiendo evaluar el estado de madurez ovocitaria inmediatamente.

Pero el éxito de la reproducción asistida depende no sólo de la calidad de los gametos sino también de la técnica. Para limitarlo al máximo a la calidad ovocitaria, todas las ICSI fueron realizadas por la misma bióloga siguiendo el mismo procedimiento. Durante el estudio no se realizaron cambios en las técnicas ni medios de cultivo ni en el equipamiento.

Se incluyeron el primer y segundo folículo aspirado de cada ovario como muestras de líquido folicular de cada paciente. Los folículos seleccionados presentaron un tamaño entre 17 y 22 mm y presentaron características ecográficas homogéneas siendo valorados como los mejores. Con ello se intentó evitar la pérdida de un posible ovocito que pudiera haber quedado en el sistema con la recuperación de líquido del primer folículo puncionado. Si bien es cierto que de esta manera existe la posibilidad de que un ovocito correspondiente al primer folículo sea clasificado como del segundo en caso de que éste no tuviera ovocito, el efecto de ese ovocito queda reflejado en los resultados globales de la paciente perdiéndose si lo hubiéramos hecho de otra manera. No de todas las pacientes se obtuvieron las 4 muestras; las muestras intensamente hemáticas fueron excluidas. De cualquier forma, en aproximadamente la mitad de las pacientes (16/31) se hallaron 2 muestras foliculares y la mayor parte de los líquidos foliculares contuvieron ovocito (59/73).

Un estudio ideal debería aspirar cada folículo de modo individual. Sin embargo, aquí aparece una limitación importante en la práctica clínica, y es el requerimiento de múltiples punciones vaginales a cada paciente. El procedimiento de separación y aspiración folicular único es comprometido pues se requieren múltiples punciones vaginales que incrementan el riesgo de sangrado vaginal y el tiempo de anestesia junto con un mayor malestar de la paciente. Sin embargo, el lavado de la aguja con medio de cultivo después de la punción folicular de cada ovario se llevó a cabo para asegurar que el ovocito es efectivamente recuperado de al menos uno de los folículos aspirados.

Las hormonas estudiadas y los ratios evaluados han sido seleccionados, basándose en la literatura existente publicada, por su clara o posible asociación con los resultados reproductivos (14, 19, 23, 63). La testosterona y la DHEA-S son dos elementos claves en la determinación sérica rutinaria en los estudios endocrinológicos en la mujer.

El potencial incremento de variabilidad de los coeficientes de variación en las pruebas de algunas de las hormonas medidas en líquido folicular puede considerarse como una limitación del estudio. Probablemente, en parte esta variabilidad sea debida a los altos niveles de hormonas en líquido folicular que

requieren diluciones seriadas, introduciendo una amplia variabilidad, de modo que se obtienen mayores coeficientes de variación que en los niveles séricos. Este incremento de variabilidad debería teóricamente atenuar los resultados haciendo menos probable detectar una diferencia (63). De forma interesante, se hallan diferencias significativas a pesar de ello. Se llevó a cabo un estudio de linealidad para verificar la dilución necesaria y se hizo un estudio de repetibilidad previo para validar los test empleados en su uso en líquido folicular.

Existe discrepancia acerca de si la concentración en líquido folicular de una determinada sustancia está en relación a la calidad del folículo como posible reflejo de la calidad del ovocito que hay dentro, o en relación a las características clínicas de la paciente (edad, tabaco y tipo de estimulación ovárica)(20). Así, *Van Blerkom y cols* encuentran que folículos de tamaño similar de una misma paciente presentan significativas diferencias en contenido de oxígeno disuelto asociado con resultados diferentes en la fragmentación celular (243). Los resultados de *Lamb y cols* sugieren que el medio folicular local puede jugar un papel clave en las diferencias observadas en las capacidades de desarrollo (63).

Por ello, en nuestro trabajo se han seleccionado a las pacientes en un rango de edad determinado y se ha aplicado el mismo protocolo de estimulación ovárica en un intento de hacer más homogénea la muestra y limitar al máximo los sesgos de selección que pudieran aparecer en la inclusión de las pacientes.

El volumen de cada folículo del estudio fue aspirado y correlacionado con el tamaño folicular basándose en las premisas publicadas por *Wittmaack*, tal como hacen la mayor parte de los artículos en este campo (42, 141, 142, 145). Atendiendo al criterio de tamaño folicular, el diámetro folicular medio puncionado fue de $19,05 \pm 1,03$ mm lo que se corresponde con folículos maduros (138). El volumen medio de contenido folicular fue de $5,02 \pm 1,03$ cc. *Wittmaack*, en su estudio retrospectivo en el que incluyó un alto número de pacientes, obtuvo resultados reproductivos óptimos con volúmenes de líquido folicular > 1 ml, que corresponde con folículos > 12 mm de tamaño, y menores de 7 ml (24 mm) estando la mayor tasa de recuperación ovocitaria con volúmenes aspirados de 3 a 4 ml (141). En el volumen medio de 5,02 cc del estudio hay que considerar el efecto de la existencia de pequeña cantidad de sangre en las muestras y los

folículos sin presencia de ovocito. Asumiendo que el tamaño folicular es un marcador ampliamente utilizado de maduración ovocitaria, los folículos seleccionados para su punción y posterior recogida y análisis de líquido folicular comprendieron un tamaño entre 17 y 22 mm, asumidos como óptimos. La tasa de dos pronúcleos es mayor para ovocitos en metafase II que proceden de folículos de más de 18 mm (138). El tamaño del folículo no sólo hace relación a la madurez ovocitaria sino también a la concentración de hormonas esteroideas. Algunos autores defienden que el nivel absoluto de esteroides depende, no de la madurez ovocitaria, sino exclusivamente del tamaño folicular (37). Al limitar los folículos puncionados a un tamaño cerrado se hace posible la comparación entre los distintos folículos.

El tamaño folicular y el estradiol sérico son los dos parámetros usados durante el seguimiento del ciclo de estimulación como marcadores orientativos de madurez ovocitaria (9, 10, 12, 137). En nuestro estudio, el tamaño folicular fue el parámetro clave empleado y el estradiol sérico fue solitado de rutina el día de la administración de hCG, e interpretado como apoyo para la decisión de punción folicular. La media de estradiol encontrada ($1548,90 \pm 744,01$) en los datos está en relación con el número de ovocitos maduros que se obtienen con posterioridad ($7,81 \pm 3,66$) asumiendo que cada ovocito maduro produce unos 200-300 pg de estradiol.

RESULTADOS DEL TRATAMIENTO:

Al analizar los líquidos de los folículos puncionados incluidos se dieron dos posibilidades: ovocitos maduros o ausencia de ovocitos. No hubo ningún caso de ovocito inmaduro, o en vesícula germinal o atrésico entre los folículos de los que se recogió el líquido folicular para el estudio de su composición. Sí que se evaluaron en los resultados globales de las pacientes.

A la hora de valorar los aspectos cuantitativos de reserva ovárica, las cifras de DHEA-S y los ratios de estradiol/progesterona y de estradiol/testosterona fueron los que se relacionaron con dichos parámetros. La HAM fue mayor en pacientes con cifras más altas de DHEA-S. En pacientes con baja reserva, la administración de DHEA mejora los resultados reproductivos en términos de aumento del número de

embriones y del número de ovocitos, por lo que cabría pensar en una mejora folicular con el aumento de los niveles séricos y foliculares de DHEA y DHEA-S. En cuanto a los ratios, bajos ratios se asociaron con cifras más altas de FSH basal. Así, los niveles más altos de FSH, se asociaron o bien con bajas cifras de estradiol folicular o bien con altas cifras de progesterona o testosterona en líquido folicular. Y en el caso del ratio estradiol/testosterona, el RFA fue superior en pacientes con ratio alto, lo que podría deberse bien a altos niveles de estradiol o bien a bajos niveles de testosterona manteniéndose en la línea del resultado anterior en relación a la FSH sérica. Todo ello podría traducirse en que las cifras altas de testosterona se relacionarían con menos recuento folicular y con mayores cifras de FSH sérica. Además, de forma límite estadísticamente, la testosterona folicular se asoció también con el RFA negativamente. Todos estos resultados no tienen una aplicación práctica en la clínica, pero están en relación con los resultados posteriores obtenidos en el ciclo de estimulación en el que el número de complejos es menor en casos de niveles de testosterona altos. Hay que tener presente que todos estos resultados se obtuvieron en pacientes normorrespondedoras por lo que son valorables simplemente en términos de una tendencia.

Al analizar los resultados globales del ciclo, se observó que las cifras altas de testosterona folicular se correlacionaron significativamente con un menor número de complejos puncionados, con un menor número de ovocitos maduros y también con un menor número de embriones de calidad D. En estos casos se dio una correlación positiva con el ratio estradiol/testosterona asumible muy probablemente por las bajas cifras de testosterona. Al observar los datos obtenidos, se aprecia una tendencia al alza en las cifras de testosterona, no sólo cuanto menor es el número de complejos puncionados sino también cuanto menor es el número de ovocitos fecundados y menor es el número de embriones totales. Estos resultados orientan así a una implicación clara de la testosterona no en los aspectos cuantitativos sino en los cualitativos ovocitarios y embrionarios.

La LH sérica no mostró una correlación relevante ni con las cifras de testosterona folicular ni con las de DHEAS, por lo que no se comprueba la relación entre las cifras de LH sérica y la de andrógenos a nivel folicular.

En cuanto a las características del ciclo de estimulación, las cifras de DHEA-S son las que se vieron descendidas por los días de frenación con agonistas de GnRH. Y en relación a los días de administración de rFSH, a medida que aumentó el número de días aumentaron las cifras de andrógenos foliculares (testosterona, DHEA-S) demostrándose la relación entre la FSH y los andrógenos. Como se ha mencionado, la FSH induce la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa e induce la actividad aromatasa en dichas células posibilitando el paso de andrógenos a estrógenos. Y, por último, las cifras de estradiol sérico el día de la administración de hCG subieron a medida que disminuyeron las de andrógenos foliculares, en línea una vez más con la asociación de carácter negativo en los resultados del estudio entre los parámetros cuantitativos y los andrógenos, especialmente la testosterona.

Existen múltiples estudios que abordan el tema hormonal y su relación con los distintos resultados de la reproducción asistida, pero ninguno abarca los diferentes escalones de la respuesta al ciclo de estimulación, desde su fecundación normal o fallida hasta la gestación considerando la calidad ovocitaria y embrionaria y analizando no sólo los resultados de los líquidos foliculares incluidos, sino también los resultados globales de la paciente. En este campo resulta difícil definir con exactitud en qué términos se define la calidad ovocitaria y que términos son los fundamentales a la hora de valorar su aplicabilidad en la práctica clínica. Se plantea así si un patrón anormal de líquido folicular siempre se refleja por una característica ovocitaria o embrionaria fácilmente detectable (tal como fallo en la fecundación por regularidad y velocidad de fragmentación embrionaria), o ciertos valores representan hechos independientes predictivos de otros problemas indetectables de desarrollo embrionario pre y post-implantación (14). De cualquier modo, en el resultado final de éxito marcado como gestación sí que se detectaría la posible implicación hormonal.

Al analizar los líquidos foliculares, existe la posibilidad de que alberguen o no un ovocito y, en caso de presencia de ovocito, puede tener una fecundación normal o fallida. Ante estas posibilidades, cabe cuestionarse si existen diferencias hormonales entre las distintas situaciones y si la relación entre las distintas hormonas entre sí es igual o no en cada una de estas opciones.

En casos de ausencia ovocitaria, el estradiol y la testosterona presentaron una fuerte correlación positiva, observándose además una correlación igualmente positiva entre la testosterona y la DHEA-S. Ambas correlaciones concuerdan con la afirmación de que la DHEA folicular contribuye a la esteroidogénesis en los folículos preovulatorios. La correlación existente entre la testosterona y el estradiol en casos de ausencia de ovocito fue también descrita por *Xuesong Wen y cols* (19).

En los casos con presencia de ovocito, tanto con fecundación normal como con fecundación fallida, *Xuesong Wen y cols* obtuvieron la misma correlación hormonal en las dos situaciones entre el estradiol y la progesterona (19). En nuestro estudio, no obtenemos esos resultados. Nuestros datos mostraron la misma correlación en ambos casos, fecundación normal o fallida, pero entre la progesterona y la testosterona. *Xuesong Wen y cols*, hallaron una correlación positiva entre la progesterona y la testosterona sólo en casos de fecundación fallida (19). El hecho de que se obtengan los mismos resultados en casos de fecundación normal y fallida podría implicar que la correlación obtenida entre la progesterona y la testosterona es una correlación positiva existente en ovocitos maduros pues son éstos los que se seleccionaron para la fecundación y fueron maduros todos los ovocitos de la muestras estudiados de modo individual.

Al valorar las diferencias en los niveles hormonales en líquido folicular entre los casos de presencia o ausencia de ovocito, se obtuvieron mayores cifras de estradiol, testosterona y DHEA-S en presencia de ovocito. Las cifras de progesterona obtenidas fueron superiores, sin embargo, en ausencia de ovocito. Se ha descrito la existencia de un posible umbral a partir del cual la exposición a progesterona ocasionaría efectos deletéreos en el líquido folicular. Una exposición óptima tendría efectos positivos en la calidad ovocitaria y una exposición excesiva desencadenaría efectos perjudiciales (55). *Xuesong Wen y cols* hallaron menores concentraciones tanto de estradiol, como de progesterona y de testosterona en casos de presencia de ovocito, resultados opuestos a los nuestros (19). En ambos estudios, son resultados orientativos, descripción de una tendencia sin alcanzar la significación estadística.

Como se ha expuesto, la maduración ovocitaria consta de un componente nuclear, más fácilmente identificable, y de un componente citoplasmático que conlleva mayor dificultad a la hora de valorarlo. Se puede asumir que los defectos relacionados con la madurez citoplasmática pueden ser responsables de fallos en la fecundación y posterior desarrollo del embrión, bien con anormalidades cromosómicas o bien con alteraciones en su morfología (244)(105) . Así, con la evaluación de la fecundación y la calidad embrionaria, a posteriori, se podría asumir la maduración citoplasmática. Una fecundación normal y una buena calidad embrionaria serían la consecuencia de una óptima competencia ovocitaria, tanto nuclear como citoplasmática. La respuesta a la estimulación ovárica podría considerarse como una secuencia de obstáculos en la que, para ir avanzando, es necesario pasar por la etapa anterior. Un proceso adecuado de foliculogénesis, culmina con un ovocito competente que tendrá una fecundación normal y que dará lugar a un desarrollo embrionario precoz óptimo.

1. COMPETENCIA OVOCITARIA Y FECUNDACIÓN.

El estudio de la fecundación sería el primer escalón en la valoración de los resultados clínicos. Se clasificó en dos grupos, fecundación normal y fecundación fallida, como las dos opciones válidas desde el punto de vista práctico. Como se ha expuesto, los defectos relacionados con la madurez citoplasmática ovocitaria se han relacionado con fallos en la fecundación (89), por lo que la valoración de la misma podría considerarse como reflejo de la maduración citoplasmática ovocitaria. Son ovocitos en metafase II, nuclearmente maduros, los candidatos para ICSI y en la normalidad de la fecundación se refleja el componente citoplasmático de la madurez ovocitaria.

En las pacientes incluidas en el estudio, los casos de fecundación normal procedían de ovocitos inmersos en líquido folicular con cifras superiores de estradiol, progesterona y andrógenos (testosterona y DHEA-S) que los casos de fecundación fallida. La FSH favorece la aromatización de andrógenos en estrógenos por lo que cabría pensar que líquidos foliculares con cifras mayores de andrógenos tendrán también mayor cifra de estrógenos, habiendo más sustrato del que obtenerse.

En los casos de ovocitos con fecundación normal del estudio, como se ha expuesto anteriormente, la progesterona y la testosterona folicular mostraron una correlación positiva entre sí.

De forma estadísticamente significativa, son los niveles de progesterona los que han marcado la diferencia entre una fecundación normal y una fallida, siendo superiores en casos de fecundación normal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por *Lamb y cols* en los que cifras más altas de progesterona son halladas en los casos de fecundación normal frente a fecundación fallida (63). *Lamb y cols* obtienen también entre sus casos con fecundación normal mayores niveles de estradiol, llegando al límite de la significación estadística, pero sin embargo, obtiene menores cifras de testosterona al compararlos con casos de fecundación fallida (63). En nuestros resultados, la diferencia en las mayores cifras de testosterona a favor de la fecundación normal llega a ser cercana a la significación estadística ($p=0,07$). En el trabajo de *Lamb y cols* cuentan con suficientes casos de ovocitos degenerados para establecer una comparación entre casos de fecundación normal y casos con ovocitos degenerados y hallan diferencias estadísticamente significativas entre el estradiol y la testosterona folicular, siendo superiores los niveles de ambos cuando la fecundación es normal.

Entre los líquidos foliculares analizados no se obtuvo ningún caso de ovocito degenerado y, en el cómputo global de los resultados de las pacientes incluidas, los casos de ovocitos degenerados fueron muy escasos, por lo que no se pudo realizar la comparativa entre ovocitos degenerados y fecundación normal.

La asociación entre los altos niveles de progesterona y la fecundación normal se establece también en otros artículos (23).

Los cifras superiores de progesterona halladas en los casos de fecundación normal, concuerdan también con uno de los primeros artículos publicados en este campo, el de *Reinthaller* en 1987, quien halla además mayores cifras de estradiol entre los casos de fecundación normal mostrando diferencias estadísticamente significativas en ambos casos (34). Las principales discrepancias han ido surgiendo desde entonces en el marco de los andrógenos. *Reinthaller y cols* hallaron de forma significativa cifras menores de testosterona en ovocitos con fecundación normal.

Si bien, el tipo de estimulación empleado en esas pacientes fue con hMG, por lo que los datos no son comparables de forma estricta.

Son varios los autores que relacionan los altos niveles de estradiol y de progesterona con fecundación normal (24, 29, 35, 38, 39).

Algunos estudios asocian niveles elevados de testosterona con baja calidad ovocitaria concretando esta aseveración en una tendencia a menores tasas de éxito tras la fecundación. Estos datos son completamente contrarios a los hallados en nuestro trabajo, en los que las cifras elevadas de testosterona se hallan en casos de fecundación normal (36).

Xuesong Wen y cols obtienen resultados contrapuestos a los nuestros. Sin alcanzar la significación estadística, sus datos muestran una tendencia a menores cifras tanto de estradiol, como de testosterona y de progesterona cuando la fecundación se produce normalmente (19).

2. CALIDAD EMBRIONARIA.

La relación entre la calidad embrionaria y los niveles hormonales en líquido folicular, y especialmente los niveles de andrógenos, no ha sido muy estudiada.

Hasta 2009 no se estudiaron variables relativas a embriones en correlación con los componentes del líquido folicular (20).

Los embriones de buena calidad, es esperable que procedan de ovocitos de buena calidad. De hecho, se acepta que la calidad ovocitaria es la que dicta en una proporción importante el desarrollo embrionario (4). Al comparar las cifras hormonales foliculares con la calidad ovocitaria global descrita por el biólogo y clasificada en cuatro modalidades (no destacable, buena, mala y muy mala calidad ovocitaria) se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de progesterona entre buena y muy mala calidad ovocitaria y entre buena y no destacable calidad ovocitaria. Las cifras de progesterona fueron superiores en pacientes con ovocitos de buena calidad. En la misma línea y muy probablemente a expensas de mayores cifras de progesterona en ovocitos de buena calidad, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con un ratio estradiol/progesterona menor en pacientes con ovocitos de buena calidad con respecto a ovocitos de mala calidad. Al

no existir un sistema de gradación claramente establecido, se clasificaron las calidades ovocitarias de la forma habitual en la que suele hacerlo el biólogo en la práctica clínica diaria; como comentario global incluido en las observaciones al final del informe.

Las cifras de estradiol fueron superiores en líquidos foliculares que contenían ovocitos que desencadenaron embriones de calidad B frente a los de calidad C y a los de calidad D. Sin embargo, la asociación fue en diferentes sentidos. En el caso de embriones de calidad B y calidad C la asociación fue positiva y entre los embriones de calidad C y calidad D la asociación fue de carácter negativo. Las cifras de estradiol significativamente más bajas se obtuvieron en embriones de calidad C. Entre las pacientes incluidas, los embriones obtenidos fueron de calidad A y de calidad D mayoritariamente. El ratio estradiol/progesterona fue superior en los embriones de calidad A frente a los de calidad C y el ratio estradiol/testosterona fue mayor en los de calidad B frente a los de calidad C, muy posiblemente determinado por los mayores niveles de estradiol en estos casos frente a los embriones de calidad C. Con todo ello, se podría extrapolar la asociación entre las altas cifras de estradiol y embriones de calidad de A y B frente a aquellos de calidad C principalmente.

Uno de los objetivos de los ciclos de estimulación ovárica es poder llevar a cabo una selección de embriones a transferir (7). Si atendemos a esta selección de embriones para transferencia o criopreservación y no estrictamente al criterio morfológico de calidad embrionaria, se obtuvieron resultados con tendencia a mayores niveles hormonales, tanto en embriones transferidos como en criopreservados, de estradiol, progesterona, testosterona y DHEA-S. La significación estadística se marcó en la progesterona y en la testosterona de los embriones criopreservados donde las cifras fueron significativamente mayores con respecto a los no seleccionados para criopreservación.

Asimakopoulos y cols no hallan asociación entre los niveles hormonales de estradiol ni de progesterona foliculares y la calidad embrionaria (64).

3. GESTACIÓN.

La tasa de embarazo obtenida por transferencia embrionaria ha sido ligeramente superior a la media en ICSI (35,5% versus 33%) (1, 245).

En cuanto a las tasas de gestación y su relación con los niveles hormonales en líquido folicular, que es el más importante de todos los parámetros y el fin último de la reproducción asistida, *Mendoza y cols* describen una asociación estadísticamente significativa con el estradiol folicular (14). De forma concordante con nuestros resultados, al estudiar las tasas de gestación global, se obtuvieron mayores cifras de estradiol en líquido folicular en casos de gestación. Estos hallazgos han sido también confirmados por otros autores (34, 35, 38, 40, 44, 46, 150). *Mendoza y cols* sólo valoraron estradiol y progesterona folicular y obtuvo una asociación positiva entre las cifras de estradiol y la gestación tanto global por paciente como de embriones transferidos. En nuestros datos las cifras de estradiol son superiores en casos de gestación tanto al estudiar embriones globales (transferidos y criopreservados) como al estudiarlos por separado, pero sólo alcanzan la significación estadística en el análisis de gestación global por paciente.

El ratio estradiol/testosterona alto se ha asociado con gestación posterior (129, 143). Ello puede deberse a cifras altas de estradiol frente a bajas de testosterona o bien a cifras altas tanto de estradiol como de testosterona con niveles superiores de estradiol. En nuestros resultados, las cifras tanto de estradiol como de testosterona fueron superiores en casos de gestación tanto al considerar embriones totales como embriones transferidos y criopreservados aunque sin alcanzar la significación estadística en el caso de la testosterona.

Una vez conseguido el embarazo, según los resultados obtenidos, no hubo diferencias importantes entre los niveles hormonales en líquido folicular según el tipo de gestación. Así, las diferencias son más evidentes a la hora de conseguir o no embarazo que en la evolución del mismo.

El ambiente folicular es clave para el buen desarrollo ovocitario y embrionario. Analizando todo el proceso como una secuencia de obstáculos, en la primera etapa hay que considerar las cifras altas de progesterona y, en menor medida de testosterona, como cruciales para determinar una buena calidad ovocitaria; son imprescindibles para una normal fecundación, paso previo ineludible para el éxito

en reproducción asistida. En la etapa siguiente de calidad embrionaria y embarazo, de entre los ovocitos que han permanecido inmersos en un medio folicular rico en progesterona y testosterona, son los embriones con mayores niveles de estradiol los que obtienen mejores resultados reproductivos.

Atendiendo a la base de la esteroidogénesis, la progesterona es el precursor de los andrógenos y éstos son el sustrato esencial para la producción de los estrógenos. Así, las cifras de estradiol en líquido folicular proceden de altos niveles de andrógenos precursores y éstos a su vez de cifras altas de progesterona. Así, como han sugerido otros autores, los andrógenos se podrían introducir como un elemento más en la teoría de dos células-dos gonadotropinas en la síntesis de estradiol folicular (192). En humanos, los receptores de andrógenos se distribuyen más fuertemente en folículos preovulatorios que en folículos antrales y preantrales como ocurre en primates (184).

Parece lógico pensar que los casos con altas cifras de estradiol posean también altos niveles de andrógenos. Cuanto mayor sea el sustrato, mayor será el producto.

En pacientes con baja reserva y baja respuesta ovárica, la administración de andrógenos favorece la inducción de receptores de FSH y mejora los niveles de estradiol y la respuesta folicular a la estimulación con gonadotropinas. Con la administración de testosterona exógena se observa en algunos trabajos una repercusión más acentuada en los momentos iniciales de la maduración folicular, aumentando el recuento de folículos antrales y un mayor número de ovocitos recuperados (211, 212). En otros, al aumentar la dosis o la duración de la administración no se observa mejoría alguna. En todos los casos, la testosterona se administró previa al inicio de la estimulación. En nuestro estudio, se valora más la calidad y el efecto androgénico en el estadio final de la estimulación, en el folículo ovulatorio, y en pacientes normorrespondedoras. Y, según nuestros hallazgos, los andrógenos foliculares seguirían la premisa de intentar como objetivo sustituir el número de ovocitos por el de embriones de buena calidad (237).

Podría ser que las pacientes normorrespondedoras tuvieran mayores niveles androgénicos basales que las pacientes con baja reserva y que ello se tradujera en el microambiente final ovocitario. *De los Santos y cols* hallan concentraciones similares de andrógenos y LH en folículos preovulatorios de pacientes con baja

reserva y pacientes con reserva ovárica conservada, sin observar diferencias en la maduración ovocitaria por evaluación del huso meiótico de ambos grupos (246). Obtienen sin embargo niveles intrafoliculares mayores de progesterona y FSH en pacientes con baja reserva (246). Más estudios son precisos para evaluar los niveles androgénicos según la reserva ovárica.

En cuanto a la DHEA y DHEA-S, resultan claves para la síntesis de andrógenos y a su vez de estradiol folicular. En la administración de DHEA a pacientes con baja reserva se ha observado, no sólo la mejora en la respuesta a la estimulación ovárica repercutiendo en el número de ovocitos reclutados y de embriones, sino que se ha apreciado una mejora en la calidad ovocitaria y embrionaria y en las tasas de embarazo (194, 196, 198, 218). Un metanálisis reciente relaciona los andrógenos adyuvantes (testosterona y DHEA) con mayor tasa de embarazo y recién nacido vivo (221). Hay que considerar la posibilidad de detección cruzada de DHEA y DHEA-S en los resultados presentados de DHEA-S. La composición del líquido folicular es producto tanto de la composición del plasma sanguíneo como de la secreción de las células de la teca y de la granulosa (123). La medición de DHEA-S podría considerarse como un marcador indirecto de DHEA. Entre los resultados presentados, La DHEA-S no ha presentado un papel relevante en los hallazgos.

En la práctica diaria de algunas clínicas se solicitan los andrógenos séricos en el estudio basal para conocer qué protocolo de estimulación sería el más idóneo en cuanto a los fármacos a elegir, valorar si hay que añadir o no LH a la estimulación y conocer aquellas pacientes que podrían beneficiarse de los suplementos androgénicos.

En pacientes con baja reserva se intenta devolver los niveles hormonales de una paciente normorrespondedora. En este estudio sentamos la base para conocer la acción de los andrógenos y con ello buscar ese efecto en pacientes con baja reserva en las que se intenta restablecer la situación más fisiológicamente posible. Son precisos más estudios que comparen niveles hormonales foliculares en pacientes con baja reserva y niveles hormonales en líquido folicular en pacientes normorrespondedoras.

Otra de las cuestiones a resolver en este campo es si la concentración intrafolicular de una hormona dada es predominantemente una variable intra-sujeto relativa a la calidad de cada folículo en los ovarios de la paciente durante la estimulación hormonal, o bien es una variable inter-individual potencialmente asociada con el estado de fecundación de cada mujer.

Entre los resultados presentados, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas para ningún nivel hormonal entre los distintos folículos puncionados de una misma paciente. Sí que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar la variabilidad intra-sujeto y entre sujetos en los niveles de progesterona, testosterona y DHEA-S y cercanas a la significación estadística ($p= 0,05$) en las cifras de estradiol.

Las distintas hormonas estudiadas se comportaron de manera diferente en su variabilidad intra-sujeto y entre sujetos. En el caso de la progesterona y de la testosterona, la variabilidad intra-sujeto y entre sujetos fue similar. Sin embargo en la DHEA-S, la variabilidad fue mayor entre sujetos y en el caso del estradiol fue superior intra-sujeto. Las cifras de progesterona y de testosterona, más implicadas en la fecundación, mostraron una variabilidad similar entre e intra-pacientes. Y, los niveles de estradiol, más implicados en determinar la calidad embrionaria y el éxito con la gestación, presentaron una mayor variabilidad entre los folículos de una misma paciente. Por ello, se podría plantear que son las cifras de estradiol las que podrían plantearse como herramientas de selección en cada paciente.

Un número mayor de punciones por paciente y un mismo número de las mismas sería preciso para establecer de forma clara las diferencias intra-sujeto y entre sujetos y muy probablemente, según los resultados obtenidos, no todas las hormonas se comporten de igual manera.

CONCLUSIONES:

CONCLUSIONES:

- Las cifras altas de testosterona folicular se correlacionaron con un menor número de complejos puncionados, con un menor número de ovocitos maduros y también con un menor número de embriones de calidad D. Así, los niveles de testosterona parecen ser más determinantes en los aspectos cualitativos que en los cuantitativos.
- En los folículos con presencia de ovocito maduro, los niveles de progesterona y de testosterona folicular mantuvieron una correlación positiva.
- En casos de fecundación normal, las cifras de progesterona folicular fueron superiores que en casos de fecundación fallida.
- Las pacientes con ovocitos de buena calidad en la clasificación global del ciclo presentaron cifras de progesterona folicular superiores a las que presentaron ovocitos de muy mala calidad ovocitaria y de calidad ovocitaria no destacable.
- Al evaluar la calidad embrionaria y su relación con los niveles hormonales foliculares se obtuvieron cifras de estradiol superiores en folículos de los que procedían embriones de calidad B frente a los de calidad C, con un mayor ratio estradiol/progesterona en casos de embriones de calidad A frente a los de calidad C y con un ratio estradiol/testosterona folicular superior en embriones de calidad B frente a los de calidad C.
- Los embriones seleccionados para criopreservación procedieron de folículos con cifras de progesterona y de testosterona folicular mayores que los no criopreservados. Los ratios estradiol/progesterona y estradiol/testosterona fueron paralelamente menores en casos de embriones criopreservados.

- Los niveles de estradiol folicular fueron superiores en folículos de los que procedía un ovocito que fecundó y dio lugar a un embrión que consiguió gestación.
- La variabilidad en los niveles de progesterona y de testosterona folicular fue similar intra-sujeto y entre sujetos. Sin embargo, la variabilidad en los niveles de DHEA-S folicular fue mayor entre sujetos y la variabilidad en las cifras de estradiol fue superior intra-sujeto.
- El análisis de la composición hormonal folicular podría considerarse en un futuro como una nueva herramienta en la selección de embriones a transferir.

REFERENCIAS:

1. DE LOS SANTOS, M. J., et al. Hormonal and Molecular Characterization of Follicular Fluid, Cumulus Cells and Oocytes from Pre-Ovulatory Follicles in Stimulated and Unstimulated Cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20120326, Mar 26, 2012. ISSN 1460-2350; 0268-1161.
2. Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ. Efficacy of Natural Cycle IVF: A Review of the Literature. *Hum Reprod Update*. 2002 Mar-Apr;8(2):129-39, 2002.
3. TEMPLETON, A.; and MORRIS, J. K. Reducing the Risk of Multiple Births by Transfer of Two Embryos After in Vitro Fertilization. *The New England Journal of Medicine*, Aug 27, 1998, vol. 339, no. 9. pp. 573-577. ISSN 0028-4793; 0028-4793.
4. PALERMO, G. D., et al. Development and Current Applications of Assisted Fertilization. *Fertility and Sterility*, Feb, 2012, vol. 97, no. 2. pp. 248-259. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
5. Maggiulli R, Neri QV, Monahan D, Hu J, Takeuchi T, Rosenwaks Z, Palermo GD. What to do when ICSI Fails. *Syst Biol Reprod Med*. 2010 Oct;56(5):376-87., 2010.
6. KASER, D. J., et al. Developmental Potential of Embryos from Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles Containing Fragmented Oocytes. *Fertility and Sterility*, 20111207, Feb, 2012, vol. 97, no. 2. pp. 338-343. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
7. Checa MA, Muñoz R, Robles A, Carreras R. Optimización De Protocolos De Estimulación Ovárica Para Conseguir Una Mejora De La Calidad Oocitaria. . *Cuadernos De Medicina Reproductiva*. 2007; 3;13: 33-41., 2007.
8. MACKLON, N. S., et al. The Science Behind 25 Years of Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization. *Endocrine Reviews*, 20060124, Apr, 2006, vol. 27, no. 2. pp. 170-207. ISSN 0163-769X; 0163-769X.
9. MCARDLE, C., et al. The Diagnosis of Ovarian Hyperstimulation (OHS): The Impact of Ultrasound. *Fertility and Sterility*, Apr, 1983, vol. 39, no. 4. pp. 464-467. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
10. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Impact of Estradiol and Inhibin A Concentrations on Pregnancy Rate in in-Vitro Oocyte Maturation. *Hum Reprod* 2000, 15:1685-1690.
11. KARAM, K. S.; TAYMOR, M. L. and BERGER, M. J. Estrogen Monitoring and the Prevention of Ovarian Overstimulation during Gonadotropin Therapy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Apr 1, 1973, vol. 115, no. 7. pp. 972-977. ISSN 0002-9378; 0002-9378.
12. SCKENKER JG, Weinstein D. Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Current Surrey. *Fertil Steril* 1978, 30:255-268., 1978.
13. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte Morphology does Not Affect Fertilization Rate, Embryo Quality and Implantation Rate After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod* 1998;13:3431-3., 1998.

14. MENDOZA, C., et al. Follicular Fluid Markers of Oocyte Developmental Potential. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Apr, 2002, vol. 17, no. 4. pp. 1017-1022. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
15. PELLICER, A., et al. Intraovarian Markers of Follicular and Oocyte Maturation. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer : IVF*, Aug, 1987, vol. 4, no. 4. pp. 205-217. ISSN 0740-7769; 0740-7769.
16. Gómez E, Tarín JJ, Pellicer A. Oocytes Maturation in Humans: The Role of Gonadotrophins and Growth Factors. *Fertil Steril* 1993, 60:40-46.
17. JOHNSON MH, Everitt BJ. Adult Ovarian Function. *In Essential Reproduction. Edited by: Johnson MH, Everitt BJ. Oxford: Blackwell Science; 2000,5:74-75.*
18. Wen X, Tozer AJ, Li D, Docherty SM, Al-Sharwaf T, Iles RK. Human Granulosa-Lutein Cell in Vitro Production of Progesterone, Inhibin-A, Inhibin-B and Activin-A are Dependent on Follicular Size and Not the Presence of the Oocyte. *Fertil Steril* 2008, 89:1406-1413.
19. Wen X, Li D, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK. Estradiol, Progesterone, Testosterone Profiles in Human Follicular Fluid and Cultured Granulosa Cells from Luteinized Pre-Ovulatory Follicles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Oct 11;8:117.
20. REVELLI, A., et al. Follicular Fluid Content and Oocyte Quality: From Single Biochemical Markers to Metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 20090504, May 4, 2009, vol. 7. pp. 40. ISSN 1477-7827; 1477-7827.
21. WANG, T. H., et al. Insulin-Like Growth Factor-II (IGF-II), IGF-Binding Protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in Follicular Fluid are Associated with Oocyte Maturation and Embryo Development. *Fertility and Sterility*, Nov, 2006, vol. 86, no. 5. pp. 1392-1401. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
22. JIMENA, P., et al. Insulin and Insulin-Like Growth Factor I in Follicular Fluid After Induction of Ovulation in Women Undergoing in Vitro Fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, Nov, 1992, vol. 96, no. 2. pp. 641-647. ISSN 0022-4251; 0022-4251.
23. MENDOZA, C., et al. Relationship between Fertilization Results After Intracytoplasmic Sperm Injection, and Intrafollicular Steroid, Pituitary Hormone and Cytokine Concentrations. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Mar, 1999, vol. 14, no. 3. pp. 628-635. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
24. BILLI, H., et al. Cytokines in the Human Ovary: Presence in Follicular Fluid and Correlation with Leukotriene B4. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Feb, 1998, vol. 15, no. 2. pp. 93-98. ISSN 1058-0468; 1058-0468.
25. Cerkiene Z, Eidukaite A, Usoniene A. Follicular Fluid Levels of Interleukin-10 and Interferon-Gamma do Not Predict Outcome of Assisted Reproductive Technologies. *Am J Reprod Immunol.* 2008 Feb;59(2):118-26., 2008.
26. BARROSO, G., et al. Vascular Endothelial Growth Factor, Nitric Oxide, and Leptin Follicular Fluid Levels Correlate Negatively with Embryo Quality in IVF Patients. *Fertility and Sterility*, Dec, 1999, vol. 72, no. 6. pp. 1024-1026. ISSN 0015-0282; 0015-0282.

27. CHA, K. Y., et al. Correlation of the Bioactivity of Luteinizing Hormone in Follicular Fluid with Oocyte Maturity in the Spontaneous Cycle. *Fertility and Sterility*, Mar, 1986, vol. 45, no. 3. pp. 338-341. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
28. Ellsworth LR, Balmaceda JP, Schenken RS, Silverman AY, Prihoda TJ, Asch RH. Human Chorionic Gonadotrophin and Steroid Concentrations in Human Follicular Fluid in Relation to Follicular Size and Oocyte Maturity in Stimulated Ovarian Cycles. *Acta Eur Fertil* 1984, 15:343-346.
29. SUCHANEK, E., et al. Prostaglandin F2 Alpha, Progesterone and Estradiol Concentrations in Human Follicular Fluid and their Relation to Success of in Vitro Fertilization. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, Aug, 1988, vol. 28, no. 4. pp. 331-339. ISSN 0301-2115; 0301-2115.
30. LANZONE, A., et al. Growth Hormone Enhances Estradiol Production Follicle-Stimulating Hormone-Induced in the Early Stage of the Follicular Maturation. *Fertility and Sterility*, Dec, 1996, vol. 66, no. 6. pp. 948-953. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
31. LEWICKA, S., et al. Cortisol and Cortisone in Human Follicular Fluid and Serum and the Outcome of IVF Treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Aug, 2003, vol. 18, no. 8. pp. 1613-1617. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
32. Carson RS, Trounson AO, Findlay JK. Successful Fertilization of Human Oocytes in Vitro: Concentration of Estradiol-17B, Progesterone and Androstendione in Antral Fluid of Donor Follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:798-800, 1982.
33. BOTERO-RUIZ, W., et al. The Relationship between Follicular Fluid Steroid Concentration and Successful Fertilization of Human Oocytes in Vitro. *Fertility and Sterility*, Jun, 1984, vol. 41, no. 6. pp. 820-826. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
34. REINTHALLER, A., et al. Relationship between the Steroid and Prolactin Concentration in Follicular Fluid and the Maturation and Fertilization of Human Oocytes. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer : IVF*, Aug, 1987, vol. 4, no. 4. pp. 228-231. ISSN 0740-7769; 0740-7769.
35. Uehara S, Naganuma T, Tsuiki A, Kyono K, Hoshiai H, Suzuki M. Relationship between Follicular Fluid Steroid Concentrations and in Vitro Fertilization. *Obstet Gynecol* 1985;66:19-23., 1985.
36. Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK. Follicular Fluid Levels of Inhibin A, Inhibin B and Activin A Levels Reflect Changes Infollicle Size but are Not Independent Markers of Oocyte Ability to Fertilize. *Fertil Steril* 2006, 8:1723-1729.
37. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, Genazzani AR. Relationship between Human Oocyte Maturity, Fertilization and Follicular Fluid Growth Factors. *Hum Reprod* 1994, 9:902-906.
38. Kreiner D, Liu HC, Itskovitz J, Veeck L, Rosenwaks Z. Follicular Fluid Oestradiol and Progesterone are Markers of Preovulatory Oocyte Quality. *Fertil Steril* 1987, 48:991-994.

39. TESARIK, J.; and MENDOZA, C. Direct Non-Genomic Effects of Follicular Steroids on Maturing Human Oocytes: Oestrogen Versus Androgen Antagonism. *Human Reproduction Update*, Mar-Apr, 1997, vol. 3, no. 2. pp. 95-100. ISSN 1355-4786; 1355-4786.
40. FUKUDA, M., et al. Healthy and Atretic Follicles: Vaginosonographic Detection and Follicular Fluid Hormone Profiles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jul, 1995, vol. 10, no. 7. pp. 1633-1637. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
41. TARLATZIS, B. C., et al. Growth Hormone, Oestradiol, Progesterone and Testosterone Concentrations in Follicular Fluid After Ovarian Stimulation with various Regimes for Assisted Reproduction. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 1993, vol. 8, no. 10. pp. 1612-1616. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
42. TEISSIER, M. P., et al. Comparison of Follicle Steroidogenesis from Normal and Polycystic Ovaries in Women Undergoing IVF: Relationship between Steroid Concentrations, Follicle Size, Oocyte Quality and Fecundability. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Dec, 2000, vol. 15, no. 12. pp. 2471-2477. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
43. Subramanian MG, Sacco AG, Moghissi KS, Magyar DM, Hayes MF, Lawson DM, Gala RR. Human Follicular Fluid: Prolactin is Biologically Active and Ovum Fertilization Correlates with Estradiol Concentration. *J in Vitro Fert Embryo Transf.* 1988 Jun;5(3):129-33.
44. LEE, M. S., et al. Relationship of Human Oocyte Maturity, Fertilization, and Cleavage to Follicular Fluid Prolactin and Steroids. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer : IVF*, Jun, 1987, vol. 4, no. 3. pp. 168-172. ISSN 0740-7769; 0740-7769.
45. BERGER MJ, Taymor ML. The Role of Luteinizing Hormone in Human Follicular Maturation and Function. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 111: 708-12, 1971.
46. MESSINIS, I. E.; and TEMPLETON, A. A. Relationship between Intrafollicular Levels of Prolactin and Sex Steroids and in-Vitro Fertilization of Human Oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 1987, vol. 2, no. 7. pp. 607-609. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
47. ROSENBUSCH, B. E. Frequency and Patterns of Premature Sperm Chromosome Condensation in Oocytes Failing to Fertilize After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, May, 2000, vol. 17, no. 5. pp. 253-259. ISSN 1058-0468; 1058-0468.
48. VANLUCHENE, E., et al. Follicular Fluid Steroid Levels in Relation to Oocyte Maturity and in Vitro Fertilization. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Jan, 1991, vol. 38, no. 1. pp. 83-87. ISSN 0960-0760; 0960-0760.
49. ENIEN, W. M., et al. Human Chorionic Gonadotrophin and Steroid Concentrations in Follicular Fluid: The Relationship to Oocyte Maturity and Fertilization Rates in Stimulated and Natural in-Vitro Fertilization Cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Nov, 1995, vol. 10, no. 11. pp. 2840-2844. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
50. Basuray R, Rawlins RG, Radwanska E, Henig I, Sachdeva S, Tummon I, Binor Z, Dmowski WP. High progesterone/estradiol Ratio in Follicular Fluid at Oocyte Aspiration for in Vitro Fertilization as a Predictor of Possible Pregnancy. *Fertil Steril.* 1988 Jun;49(6):1007-11.

51. KOBAYASHI, T., et al. Androstenedione and Progesterone Concentrations in Preovulatory Follicular Fluid Correlate with Successful Fertilization and Cleavage of Human Oocytes in Vitro. *Fertility and Sterility*, Aug, 1991, vol. 56, no. 2. pp. 301-305. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
52. BEN-RAFAEL, Z., et al. Relationships between Polypronuclear Fertilization and Follicular Fluid Hormones in Gonadotropin-Treated Women. *Fertility and Sterility*, Feb, 1987, vol. 47, no. 2. pp. 284-288. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
53. Xia P. Intracytoplasmic Sperm Injection: Correlation of Oocyte Grade Base on Polar Body, Perivitelline Space and Cytoplasmic Inclusions with Fertilization Rate and Embryo Quality. *Hum Reprod* 1997;12 (8): 1750-1755., 1997.
54. ANDERSEN, C. Y. Characteristics of Human Follicular Fluid Associated with Successful Conception After in Vitro Fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Nov, 1993, vol. 77, no. 5. pp. 1227-1234. ISSN 0021-972X; 0021-972X.
55. De Placido G, Alviggi C, Perino A, Strina I, Lisi F, Fasolino A, De Palo R, Ranieri A, Colacurci N, Mollo A. Recombinant Human LH Supplementation Versus Recombinant Human FSH (rFSH) Step-Up Protocol during Controlled Ovarian Stimulation in Normogonadotrophic Women with Initial Inadequate Ovarian Response to rFSH. A Multicentre, Prospective, Randomized Controlled Trial. *Hum Reprod*. 2005 Feb;20(2):390-6.
56. Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe GP, Picconeri MG, Campbell A. Use of Recombinant LH in a Group of Unselected IVF Patients. *Reprod Biomed Online*. 2002 Sep-Oct;5(2):104-8.
57. JIMENA, P., et al. Adrenal Hormones in Human Follicular Fluid. *Acta Endocrinologica*, Nov, 1992, vol. 127, no. 5. pp. 403-406. ISSN 0001-5598; 0001-5598.
58. Bonser J, Walker J, Purohit A, Reed MJ, Potter BV, Willis DS, Franks S, Mason HD. Human Granulosa Cells are a Site of Sulphatase Activity and are Able to Utilize Dehydroepiandrosterone Sulphate as a Precursor for Oestradiol Production. *J Endocrinol*. 2000 Dec;167(3):465-71., 2000.
59. LI, L., et al. Dehydroepiandrosterone in Follicular Fluid is Produced Locally, and Levels Correlate Negatively with in Vitro Fertilization Outcomes. *Fertility and Sterility*, 20101203, Apr, 2011, vol. 95, no. 5. pp. 1830-1832. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
60. PARSONS, T. D., et al. Dhea Supplementation and Cognition in Postmenopausal Women. *The International Journal of Neuroscience*, Feb, 2006, vol. 116, no. 2. pp. 141-155. ISSN 0020-7454; 0020-7454.
61. MICHAEL, A. E., et al. Direct Inhibition of Ovarian Steroidogenesis by Cortisol and the Modulatory Role of 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Clinical Endocrinology*, Jun, 1993, vol. 38, no. 6. pp. 641-644. ISSN 0300-0664; 0300-0664.
62. MAMAS, L.; and MAMAS, E. Dehydroepiandrosterone Supplementation in Assisted Reproduction: Rationale and Results. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, Aug, 2009, vol. 21, no. 4. pp. 306-308. ISSN 1473-656X; 1040-872X.

63. LAMB, J. D., et al. Follicular Fluid Steroid Hormone Levels are Associated with Fertilization Outcome After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertility and Sterility*, 20090709, Aug, 2010, vol. 94, no. 3. pp. 952-957. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
64. Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. The Levels of Steroid Hormones and Cytokines in Individual Follicles are Not Associated with the Fertilization Outcome After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertil Steril*. 2008 Jul;90(1):60-4. Epub 2007 Nov 5.
65. VERIT, F. F., et al. Follicular Steroid Hormone Levels are Associated with Fertilization Outcome After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertility and Sterility*, 20101208, Feb, 2011, vol. 95, no. 2. pp. e10; author reply e11. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
66. RYAN KJ, Smith OW. Biogenesis of Estrogens by the Human Ovary I. Conversion of Acetate-1-C-14 to Estrone and Estradiol. *J Biol Chem* 1961, 236:705-709.
67. RYAN, K. J.; and SMITH, O. W. Biogenesis of Estrogens by the Human Ovary. II. Conversion of Progesterone-4-C-14 to Estrone and Estradiol. *The Journal of Biological Chemistry*, Mar, 1961, vol. 236. pp. 710-714. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
68. RYAN, K. J.; and SMITH, O. W. Biogenesis of Steroid Hormones in the Human Ovary. *Recent Progress in Hormone Research*, 1965, vol. 21. pp. 367-409. ISSN 0079-9963; 0079-9963.
69. Falck B. Site of Production of Oestrogen on Rate Ovary as Studied in Micro-Transplants. *Acta Physiol Scand* 1959, 474(Suppl 163):1-101.
70. HILLIER, S. G.; WHITELAW, P. F. and SMYTH, C. D. Follicular Oestrogen Synthesis: The 'Two-Cell, Two-Gonadotrophin' Model Revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Apr, 1994, vol. 100, no. 1-2. pp. 51-54. ISSN 0303-7207; 0303-7207.
71. JOHNSON MH, Everitt BJ. Adult Ovarian Function. in Essential Reproduction. . Edited by: Johnson MH, Everitt BJ. Oxford: Blackwell Science; , 5 2000:74-75.
72. Armstrong DT, Goff AK, Dorrington JH. Regulation of Follicular Estrogen Biosynthesis. in Ovarian Follicular Development and Function. Edited by: Midgley AR and Sadler WA. New York: Raven Press; 1979:169-182.
73. JUDD LH, Yen SSC. Serum Androstenedione and Testosterone Levels during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973; 38:475.
74. JEPPESEN, J. V., et al. LH-Receptor Gene Expression in Human Granulosa and Cumulus Cells from Antral and Preovulatory Follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20120601, Aug, 2012, vol. 97, no. 8. pp. E1524-31. ISSN 1945-7197; 0021-972X.
75. FILICORI, M.; COGNIGNI, G. E. and CIAMPAGLIA, W. Effects of LH on Oocyte Yield and Developmental Competence. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jun, 2003, vol. 18, no. 6. pp. 1357-8; author reply 1358-60. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
76. FILICORI, M., et al. Stimulation and Growth of Antral Ovarian Follicles by Selective LH Activity Administration in Women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Mar, 2002, vol. 87, no. 3. pp. 1156-1161. ISSN 0021-972X; 0021-972X.

77. Young KA, Chaffin CL, Molskness TA, Stouffer RL. Controlled Ovulation of the Dominant Follicle: A Critical Role for LH in the Late Follicular Phase of the Menstrual Cycle. *Hum Reprod* 2003; 18: 2257.
78. Catalá MG, Izquierdo D, Rodríguez-Prado M, Hammami S, Paramio MT. Effect of Oocyte Quality on Blastocyst Development After in Vitro Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) in a Sheep Model. *Fertil Steril*. 2012 Apr;97(4):1004-8., 2012.
79. SANTOS, M. A.; KUIJK, E. W. and MACKLON, N. S. The Impact of Ovarian Stimulation for IVF on the Developing Embryo. *Reproduction (Cambridge, England)*, Jan, 2010, vol. 139, no. 1. pp. 23-34. ISSN 1741-7899; 1470-1626.
80. Pellicer A, Tarin JJ, Miró F, Sampaio M, De los Santos MJ, Remohi J. The use of Gonadotrophin Releasing-Hormone Analogues (GnRHa), in in-Vitro Fertilization: Some Clinical and Experimental Investigations of a Direct Effect on the Human Ovary. *Hum Reprod*. 1992 Jun;7 Suppl 1:39-47, 1992.
81. SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B. and THOMPSON, J. G. Effects of in-Vivo and in-Vitro Environments on the Metabolism of the Cumulus-Oocyte Complex and its Influence on Oocyte Developmental Capacity. *Human Reproduction Update*, Jan-Feb, 2003, vol. 9, no. 1. pp. 35-48. ISSN 1355-4786; 1355-4786.
82. Nogueira D, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Ron-El R, Smitz J. Oocyte Maturity and Preimplantation Development in Relation to Follicle Diameter in Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Or Antagonist Treatments. *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):578-83., 2006.
83. MANN, J. S.; LOWTHER, K. M. and MEHLMANN, L. M. Reorganization of the Endoplasmic Reticulum and Development of Ca²⁺ Release Mechanisms during Meiotic Maturation of Human Oocytes. *Biology of Reproduction*, 20100707, Oct, 2010, vol. 83, no. 4. pp. 578-583. ISSN 1529-7268; 0006-3363.
84. EVANS, J. P.; and ROBINSON, D. N. The Spatial and Mechanical Challenges of Female Meiosis. *Molecular Reproduction and Development*, 20110719, Oct-Nov, 2011, vol. 78, no. 10-11. pp. 769-777. ISSN 1098-2795; 1040-452X.
85. ALVAREZ SEDO, C., et al. The Nuclear Mitotic Apparatus (NuMA) Protein: Localization and Dynamics in Human Oocytes, Fertilization and Early Embryos. *Molecular Human Reproduction*, 20110205, Jun, 2011, vol. 17, no. 6. pp. 392-398. ISSN 1460-2407; 1360-9947.
86. EPPIG, J. J., et al. Oocyte Control of Granulosa Cell Development: How and Why. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Nov, 1997, vol. 12, no. 11 Suppl. pp. 127-132. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
87. EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K. and PENDOLA, F. L. The Mammalian Oocyte Orchestrates the Rate of Ovarian Follicular Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20020226, Mar 5, 2002, vol. 99, no. 5. pp. 2890-2894. ISSN 0027-8424; 0027-8424.
88. ALBERTINI, D. F.; SANFINS, A. and COMBELLES, C. M. Origins and Manifestations of Oocyte Maturation Competencies. *Reproductive Biomedicine Online*, Jun, 2003, vol. 6, no. 4. pp. 410-415. ISSN 1472-6483; 1472-6483.

89. ARDOY M, Calderón G. Criterios De Valoración Morfológicos De Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocitos Humanos. *Ed: ASEBIR. 2007; 9-17 y 26-39.*, 2007.
90. Canipari R. Oocyte-Granulosa Cell Interactions. *Hum Reprod Update 2000; 6 (3):279-89.*, 2000.
91. MAKABE, S.; NAGURO, T.and STALLONE, T. Oocyte-Follicle Cell Interactions during Ovarian Follicle Development, as seen by High Resolution Scanning and Transmission Electron Microscopy in Humans. *Microscopy Research and Technique*, Jun, 2006, vol. 69, no. 6. pp. 436-449. ISSN 1059-910X; 1059-910X.
92. HEIKINHEIMO, O.; and GIBBONS, W. E. The Molecular Mechanisms of Oocyte Maturation and Early Embryonic Development are Unveiling New Insights into Reproductive Medicine. *Molecular Human Reproduction*, Aug, 1998, vol. 4, no. 8. pp. 745-756. ISSN 1360-9947; 1360-9947.
93. LONERGAN, P., et al. Effect of Follicle Size on Bovine Oocyte Quality and Developmental Competence Following Maturation, Fertilization, and Culture in Vitro. *Molecular Reproduction and Development*, Jan, 1994, vol. 37, no. 1. pp. 48-53. ISSN 1040-452X; 1040-452X.
94. Ectors FJ, Vanderzwalmen P, Van Hoeck J, Nijs M, Verhaegen G, Delvigne A et al. Relationship of Human Follicular Diameter with Oocyte Fertilization and Development After in-Vitro Fertilization Or Intracytoplasmic Sperm Injection. . *Hum Reprod 1997; 12: 2002-5.*, 1997.
95. ASSOU, S., et al. The Human Cumulus--Oocyte Complex Gene-Expression Profile. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20060329, Jul, 2006, vol. 21, no. 7. pp. 1705-1719. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
96. Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C et al. The Unique Transcriptome through Day 3 of Human Preimplantation Development. *Hum Mol Genet 2004;13:1461-70.*, 2004.
97. Goudet G, Belin F, Bézard J, Gérard N. Maturation-Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinasa (MAPK) Expression in Relation to Oocyte Competence for in-Vitro Maturation in the Mare. *Mol Hum Reprod 1998;4:563-70.*, 1998.
98. SATHANANTHAN, A. H., et al. From Oogonia to Mature Oocytes: Inactivation of the Maternal Centrosome in Humans. *Microscopy Research and Technique*, Jun, 2006, vol. 69, no. 6. pp. 396-407. ISSN 1059-910X; 1059-910X.
99. KIM, N. H., et al. Microtubule and Microfilament Organization in Maturing Human Oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Aug, 1998, vol. 13, no. 8. pp. 2217-2222. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
100. EBNER, T.; MOSER, M.and TEWS, G. Is Oocyte Morphology Prognostic of Embryo Developmental Potential After ICSI?. *Reproductive Biomedicine Online*, Apr, 2006, vol. 12, no. 4. pp. 507-512. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
101. BALABAN, B.; YAKIN, K.and URMAN, B. Randomized Comparison of Two Different Blastocyst Grading Systems. *Fertility and Sterility*, Mar, 2006, vol. 85, no. 3. pp. 559-563. ISSN 1556-5653; 0015-0282.

102. MERIANO, J. S., et al. Tracking of Oocyte Dysmorphisms for ICSI Patients may Prove Relevant to the Outcome in Subsequent Patient Cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 2001, vol. 16, no. 10. pp. 2118-2123. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
103. VAN BLERKOM, J.; and HENRY, G. Oocyte Dysmorphism and Aneuploidy in Meiotically Mature Human Oocytes After Ovarian Stimulation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Mar, 1992, vol. 7, no. 3. pp. 379-390. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
104. NASR-ESFAHANI, M. H., et al. Effects of Failed Oocyte Activation and Sperm Protamine Deficiency on Fertilization Post-ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, Apr, 2007, vol. 14, no. 4. pp. 422-429. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
105. SCHMIADY, H.; TANDLER-SCHNEIDER, A. and KENTENICH, H. Premature Chromosome Condensation of the Sperm Nucleus After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 1996, vol. 11, no. 10. pp. 2239-2245. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
106. REYNIER, P., et al. Mitochondrial DNA Content Affects the Fertilizability of Human Oocytes. *Molecular Human Reproduction*, May, 2001, vol. 7, no. 5. pp. 425-429. ISSN 1360-9947; 1360-9947.
107. BATTAGLIA, D. E., et al. Influence of Maternal Age on Meiotic Spindle Assembly in Oocytes from Naturally Cycling Women. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 1996, vol. 11, no. 10. pp. 2217-2222. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
108. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, Mitochondria and Redox Potential in Ageing Oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004;8:45-58, 2004.
109. RUBIO, C., et al. FISH Screening of Aneuploidies in Preimplantation Embryos to Improve IVF Outcome. *Reproductive Biomedicine Online*, Oct, 2005, vol. 11, no. 4. pp. 497-506. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
110. DE SANTIS, L., et al. Polar Body Morphology and Spindle Imaging as Predictors of Oocyte Quality. *Reproductive Biomedicine Online*, Jul, 2005, vol. 11, no. 1. pp. 36-42. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
111. RAMA RAJU, G. A., et al. Meiotic Spindle and Zona Pellucida Characteristics as Predictors of Embryonic Development: A Preliminary Study using PolScope Imaging. *Reproductive Biomedicine Online*, Feb, 2007, vol. 14, no. 2. pp. 166-174. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
112. KILANI, S., et al. Are there Non-Invasive Markers in Human Oocytes that can Predict Pregnancy Outcome?. *Reproductive Biomedicine Online*, May, 2009, vol. 18, no. 5. pp. 674-680. ISSN 1472-6491; 1472-6483.
113. VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. and ALEXANDER, S. A Microscopic and Biochemical Study of Fragmentation Phenotypes in Stage-Appropriate Human Embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Apr, 2001, vol. 16, no. 4. pp. 719-729. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
114. Alikani M, Schimmel T, Willadsen SM. Cytoplasmic Fragmentation in Activated Eggs Occurs in the Cytokinetic Phase of the Cell Cycle, in Lieu of Normal Cytokinesis, and in Response to Cytoskeletal Disorders. *Mol Hum Reprod* 2005;11:335-44., 2005.

115. CATALA, M. G., et al. Brilliant Cresyl Blue Stain Selects Largest Oocytes with Highest Mitochondrial Activity, Maturation-Promoting Factor Activity and Embryo Developmental Competence in Prepubertal Sheep. *Reproduction (Cambridge, England)*, 20110714, Oct, 2011, vol. 142, no. 4. pp. 517-527. ISSN 1741-7899; 1470-1626.
116. VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W. and LEE, J. ATP Content of Human Oocytes and Developmental Potential and Outcome After in-Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Feb, 1995, vol. 10, no. 2. pp. 415-424. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
117. STOJKOVIC, M., et al. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes before and After in Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After in Vitro Fertilization and Culture. *Biology of Reproduction*, Mar, 2001, vol. 64, no. 3. pp. 904-909. ISSN 0006-3363; 0006-3363.
118. DI PASQUALE, E.; BECK-PECCOZ, P. and PERSANI, L. Hypergonadotropic Ovarian Failure Associated with an Inherited Mutation of Human Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP15) Gene. *American Journal of Human Genetics*, 20040510, Jul, 2004, vol. 75, no. 1. pp. 106-111. ISSN 0002-9297; 0002-9297.
119. OTSUKA, F.; MOORE, R. K. and SHIMASAKI, S. Biological Function and Cellular Mechanism of Bone Morphogenetic Protein-6 in the Ovary. *The Journal of Biological Chemistry*, 20010710, Aug 31, 2001, vol. 276, no. 35. pp. 32889-32895. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
120. Agudo D. Interacción Cúmulo-Ovocito. Relación Con La Calidad Embrionaria. . *Cuadernos De Medicina Reproductiva*. 2007; 3;13: 15-25., 2007.
121. KRISHER, R. L.; and BAVISTER, B. D. Responses of Oocytes and Embryos to the Culture Environment. *Theriogenology*, Jan 1, 1998, vol. 49, no. 1. pp. 103-114. ISSN 0093-691X; 0093-691X.
122. FUJINO, Y., et al. DNA Fragmentation of Oocytes in Aged Mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jul, 1996, vol. 11, no. 7. pp. 1480-1483. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
123. FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M. and YANG, M. Y. Follicular Development: The Role of the Follicular Microenvironment in Selection of the Dominant Follicle. *Animal Reproduction Science*, Jul, 2004, vol. 82-83. pp. 109-126. ISSN 0378-4320; 0378-4320.
124. GOSDEN, R. G.; and FADDY, M. J. Biological Bases of Premature Ovarian Failure. *Reproduction, Fertility, and Development*, 1998, vol. 10, no. 1. pp. 73-78. ISSN 1031-3613; 1031-3613.
125. LEROY, J. L., et al. Metabolic Changes in Follicular Fluid of the Dominant Follicle in High-Yielding Dairy Cows Early Post Partum. *Theriogenology*, Sep 15, 2004, vol. 62, no. 6. pp. 1131-1143. ISSN 0093-691X; 0093-691X.
126. BALABAN, B.; and URMAN, B. Effect of Oocyte Morphology on Embryo Development and Implantation. *Reproductive Biomedicine Online*, May, 2006, vol. 12, no. 5. pp. 608-615. ISSN 1472-6483; 1472-6483.

127. PATRIZIO, P., et al. Molecular Methods for Selection of the Ideal Oocyte. *Reproductive Biomedicine Online*, Sep, 2007, vol. 15, no. 3. pp. 346-353. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
128. DAWSON, A.; GRIESINGER, G. and DIEDRICH, K. Screening Oocytes by Polar Body Biopsy. *Reproductive Biomedicine Online*, Jul, 2006, vol. 13, no. 1. pp. 104-109. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
129. VEECK, L. Abnormal Morphology of the Human Oocyte and Conceptus. "An Atlas of Human Gametes and Conceptus: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology". *Ed the Parthenon Publishing Group. 1999: 57-68, 1999.*
130. TARIN JJ, Pellicer A. Oocyte Maturation in Human in Vitro Fertilisation Programmes. *Ann Acad Med Singapore 1992;21 (4): 492-497, 1992.*
131. HARTSHORNE, G.; MONTGOMERY, S. and KLENTZERIS, L. A Case of Failed Oocyte Maturation in Vivo and in Vitro. *Fertility and Sterility*, Mar, 1999, vol. 71, no. 3. pp. 567-570. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
132. ALIKANI M, Cohen J. Patterns of Cell Fragmentation in the Human Embryo. *J Assist Reprod Genet 1995, 12:28.*
133. OTSUKI, J., et al. The Relationship between Pregnancy Outcome and Smooth Endoplasmic Reticulum Clusters in MII Human Oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20040604, Jul, 2004, vol. 19, no. 7. pp. 1591-1597. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
134. SERHAL, P. F., et al. Oocyte Morphology Predicts Outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jun, 1997, vol. 12, no. 6. pp. 1267-1270. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
135. VAN BLERKOM, J. Occurrence and Developmental Consequences of Aberrant Cellular Organization in Meiotically Mature Human Oocytes After Exogenous Ovarian Hyperstimulation. *Journal of Electron Microscopy Technique*, Dec, 1990, vol. 16, no. 4. pp. 324-346. ISSN 0741-0581; 0741-0581.
136. ALIKANI, M., et al. Intracytoplasmic Sperm Injection in Dysmorphic Human Oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, Nov, 1995, vol. 3, no. 4. pp. 283-288. ISSN 0967-1994; 0967-1994.
137. ROSEN, M. P., et al. A Quantitative Assessment of Follicle Size on Oocyte Developmental Competence. *Fertility and Sterility*, 20080204, Sep, 2008, vol. 90, no. 3. pp. 684-690. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
138. KUBIAK, J. Z. Mouse Oocytes Gradually Develop the Capacity for Activation during the Metaphase II Arrest. *Developmental Biology*, Dec, 1989, vol. 136, no. 2. pp. 537-545. ISSN 0012-1606; 0012-1606.
139. JI, Y. Z., et al. Modifications of the Human Oocyte Plasma Membrane Protein Pattern during Preovulatory Maturation. *Molecular Reproduction and Development*, May, 1997, vol. 47, no. 1. pp. 120-126. ISSN 1040-452X; 1040-452X.

140. BERGH, C., et al. Comparison of Fertilization, Cleavage and Pregnancy Rates of Oocytes from Large and Small Follicles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jul, 1998, vol. 13, no. 7. pp. 1912-1915. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
141. Wittmaak FM, Kreger DO, Blasco L, Tureck RW, Mastroianni L Jr, Lessey BA. Effect of Follicular Size on Oocyte Retrieval, Fertilization, Cleavage and Embryo Quality in in-Vitro Fertilization Cycles: A 6-Year Data Collection. *Fertility and Sterility 1994*, 62:1205-1210.
142. MILLER, K. F.; GOLDBERG, J. M. and FALCONE, T. Follicle Size and Implantation of Embryos from in Vitro Fertilization. *Obstetrics and Gynecology*, Oct, 1996, vol. 88, no. 4 Pt 1. pp. 583-586. ISSN 0029-7844; 0029-7844.
143. CROZET, N.; AHMED-ALI, M. and DUBOS, M. P. Developmental Competence of Goat Oocytes from Follicles of Different Size Categories Following Maturation, Fertilization and Culture in Vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, Mar, 1995, vol. 103, no. 2. pp. 293-298. ISSN 0022-4251; 0022-4251.
144. Salha O, Nugent D, Dada T, Kaufmann S, Levett S, Jenner L, Lue S, Sharma V. The Relationship between Follicular Fluid Aspirate Volume and Oocyte Maturity in in-Vitro Fertilization Cycles. *Hum Reprod 1998*, 13:1901-1906.
145. Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE. The Relationship between Size and Maturation in Vitro in the Unstimulated Human Oocyte. *Fertil Steril 1995*, 63:404-406.
146. Whitacre KS, Seifer DB, Friedman CI, Coskun S, Kenard KA, Kim MH, Alak BM. Effects of Ovarian Source, Patients Age and Menstrual Cycle Phase on in Vitro Maturation of Immature Human Oocytes. *Fertil Steril 1998*, 70: 1015-1021.
147. TSUJI, K.; SOWA, M. and NAKANO, R. Relationship between Human Oocyte Maturation and Different Follicular Sizes. *Biology of Reproduction*, Mar, 1985, vol. 32, no. 2. pp. 413-417. ISSN 0006-3363; 0006-3363.
148. MaNatty KP, Makris A, Reinhold VN, De Grazia C, Osathanodth R, Ryan K. Metabolism of Androstenedione by Human Ovarian Tissues in Vitro with Particular Reference to Reductase and Aromatase Activity. *Steroids 1979*, 34:429-443.
149. Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS. The Correlation between Follicular Measurements, Oocyte Morphology and Fertilization Rates in an in Vitro Fertilization Programme. *Fertil Steril 1995*, 64:787-790.
150. HAINES CJ, Emes AL. The Relationship between Follicle Diameter, Fertilization Rate and Microscopic Embryo Quality. *Fertil Steril 1991*, 55:205-207.
151. DIAMOND MP, Wentz AC. Ovarian Induction with Human Menopausal Gonadotrophins. *Obstet Gynecol Surv 1986*, 41:480-490.
152. SIMON, C., et al. Clinical Evidence for a Detrimental Effect on Uterine Receptivity of High Serum Oestradiol Concentrations in High and Normal Responder Patients. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Sep, 1995, vol. 10, no. 9. pp. 2432-2437. ISSN 0268-1161; 0268-1161.

153. Peña JE, Chang PL, Chan L, Zeitoun K, Thornton MH, Sauer MV. Supraphysiological Estradiol Levels do Not Affect Oocyte and Embryo Quality in Oocyte Donation Cycles. *Hum Reprod* 2002;17:83-7, 2002.
154. Ng EH, Lau EY, Yeung WS, Ho PC. Oocyte and Embryo Quality in Patients Withn Excessive Ovarian Response during in Vitro Fertilization Treatment. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:186-91., 2003.
155. Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K. Early Human Embryo Metabolism. *Bioessays* 1993;15,259-264.
156. LEESE, H. J. Metabolic Control during Preimplantation Mammalian Development. *Human Reproduction Update*, Jan, 1995, vol. 1, no. 1. pp. 63-72. ISSN 1355-4786; 1355-4786.
157. GARDNER, D. K., et al. Noninvasive Assessment of Human Embryo Nutrient Consumption as a Measure of Developmental Potential. *Fertility and Sterility*, Dec, 2001, vol. 76, no. 6. pp. 1175-1180. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
158. MUNNE, S., et al. Maternal Age, Morphology, Development and Chromosome Abnormalities in Over 6000 Cleavage-Stage Embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, May, 2007, vol. 14, no. 5. pp. 628-634. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
159. MUNNE S, Wells D. Preimplantation Genetic Diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002;14:239-244.
160. SCOTT, L. The Biological Basis of Non-Invasive Strategies for Selection of Human Oocytes and Embryos. *Human Reproduction Update*, May-Jun, 2003, vol. 9, no. 3. pp. 237-249. ISSN 1355-4786; 1355-4786.
161. Hamamah S. Oocyte and Embryo Quality: Is their Morphology a Good Criterion?. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005;34(7 Pt 2):5S38-5S41.
162. Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A. Fatty Acid Metabolism in Human Preimplantation Embryos. *Hum Reprod*. 2006 Mar;21(3):766-773.
163. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological Evaluation of Human Embryos and Derivation of an Embryo Quality Scoring System Specific for Day 3 Embryos: A Preliminary Study. *Hum Reprod*. 2000;15(10):2190-2196.
164. FISCH, J. D., et al. The Graduated Embryo Score (GES) Predicts Blastocyst Formation and Pregnancy Rate from Cleavage-Stage Embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Sep, 2001, vol. 16, no. 9. pp. 1970-1975. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
165. CRUZ, M., et al. Embryo Quality, Blastocyst and Ongoing Pregnancy Rates in Oocyte Donation Patients Whose Embryos were Monitored by Time-Lapse Imaging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20110311, Jul, 2011, vol. 28, no. 7. pp. 569-573. ISSN 1573-7330; 1058-0468.
166. Bruna I, Pérez F, Tur R, Ricciarelli E, De la Fuente A. Embarazo Múltiple Derivado De FIV-ICSI En España: Incidencia y Criterios Sobre La Transferencia Embrionaria. *Rev Iberoam Fertilidad* 2005;22(2):99-110.

167. Hardarson T, Hanson Ch, Sjogren A, Lundin K. Human Embryos with Unevenly Sized Blastomeres have Coger Pregnancy and Implantation Rates: Indications for Aneuploy and Multinucleation. *Hum Reprod.* 2001;16:313-318.
168. VAN ROYEN, E., et al. Calculating the Implantation Potential of Day 3 Embryos in Women Younger than 38 Years of Age: A New Model. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Feb, 2001, vol. 16, no. 2. pp. 326-332. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
169. VAN ROYEN, E., et al. Characterization of a Top Quality Embryo, a Step Towards Single-Embryo Transfer. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Sep, 1999, vol. 14, no. 9. pp. 2345-2349. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
170. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S. Embryo Morphology Or Cleavage Stage: How to Select the Best Embryos for Transfer Alter in-Vitro Fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:1545-1549.
171. Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A. Day 3 and Day 5 Morphological Predictors of Embryo Viability. *Reprod BioMed Online* 2003;6:232-331.
172. ALIKANI, M., et al. Cleavage Anomalies in Early Human Embryos and Survival After Prolonged Culture in-Vitro. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Dec, 2000, vol. 15, no. 12. pp. 2634-2643. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
173. GOYANES, V. J., et al. Morphometric Categorization of the Human Oocyte and Early Conceptus. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jul, 1990, vol. 5, no. 5. pp. 613-618. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
174. MERIANO, J., et al. Binucleated and Micronucleated Blastomeres in Embryos Derived from Human Assisted Reproduction Cycles. *Reproductive Biomedicine Online*, Nov, 2004, vol. 9, no. 5. pp. 511-520. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
175. Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The Impact of the Zona Pellucida Thickness Variation of Human Embryos on Pregnancy Outcome in Relation to Suboptimal Embryo Development. A Prospective Randomized Controlled Study. *Hum Reprod* 2001;16(10): 2166-2170.
176. HARLOW, C. R.; HILLIER, S. G. and HODGES, J. K. Androgen Modulation of Follicle-Stimulating Hormone-Induced Granulosa Cell Steroidogenesis in the Primate Ovary. *Endocrinology*, Sep, 1986, vol. 119, no. 3. pp. 1403-1405. ISSN 0013-7227; 0013-7227.
177. HILLIER, S. G.; and DE ZWART, F. A. Evidence that Granulosa Cell Aromatase induction/activation by Follicle-Stimulating Hormone is an Androgen Receptor-Regulated Process in-Vitro. *Endocrinology*, Oct, 1981, vol. 109, no. 4. pp. 1303-1305. ISSN 0013-7227; 0013-7227.
178. HILLIER, S. G.; TETSUKA, M. and FRASER, H. M. Location and Developmental Regulation of Androgen Receptor in Primate Ovary. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Jan, 1997, vol. 12, no. 1. pp. 107-111. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
179. ZELEZNIK, A. J.; HILLIER, S. G. and ROSS, G. T. Follicle Stimulating Hormone-Induced Follicular Development: An Examination of the Role of Androgens. *Biology of Reproduction*, Oct, 1979, vol. 21, no. 3. pp. 673-681. ISSN 0006-3363; 0006-3363.

180. PRADEEP, P. K., et al. Dihydrotestosterone Inhibits Granulosa Cell Proliferation by Decreasing the Cyclin D2 mRNA Expression and Cell Cycle Arrest at G1 Phase. *Endocrinology*, Aug, 2002, vol. 143, no. 8. pp. 2930-2935. ISSN 0013-7227; 0013-7227.
181. KAIPIA A, Hsueh AJW. Regulation of Ovarian Follicle Atresia. *Annu Rev Physiol* 1997;59:349–363.
182. BILLIG, H.; FURUTA, I. and HSUEH, A. J. Estrogens Inhibit and Androgens Enhance Ovarian Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology*, Nov, 1993, vol. 133, no. 5. pp. 2204-2212. ISSN 0013-7227; 0013-7227.
183. SEN, A.; and HAMMES, S. R. Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20100525, Jul, 2010, vol. 24, no. 7. pp. 1393-1403. ISSN 1944-9917; 0888-8809.
184. Hugues JN. Impact of Androgen on Fertility – Physiological, Clinical and Therapeutical Aspects. *Reprod Biomed Online* 2005;11:570–580.
185. Weil SJ, Vendola K, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, Okafor J, Bondy CA. Androgen Receptor Gene Expression in the Primate Ovary: Cellular Localization, Regulation, and Functional Correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jul;83(7):2479-85.
186. WEIL, S., et al. Androgen and Follicle-Stimulating Hormone Interactions in Primate Ovarian Follicle Development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Aug, 1999, vol. 84, no. 8. pp. 2951-2956. ISSN 0021-972X; 0021-972X.
187. VENDOLA, K., et al. Androgens Promote Oocyte Insulin-Like Growth Factor I Expression and Initiation of Follicle Development in the Primate Ovary. *Biology of Reproduction*, Aug, 1999, vol. 61, no. 2. pp. 353-357. ISSN 0006-3363; 0006-3363.
188. VENDOLA, K. A., et al. Androgens Stimulate Early Stages of Follicular Growth in the Primate Ovary. *The Journal of Clinical Investigation*, Jun 15, 1998, vol. 101, no. 12. pp. 2622-2629. ISSN 0021-9738; 0021-9738.
189. FARHI, J.; and JACOBS, H. S. Early Prediction of Ovarian Multifollicular Response during Ovulation Induction in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Fertility and Sterility*, Mar, 1997, vol. 67, no. 3. pp. 459-462. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
190. HORIE, K., et al. Immunohistochemical Localization of Androgen Receptor in the Human Endometrium, Decidua, Placenta and Pathological Conditions of the Endometrium. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Nov, 1992, vol. 7, no. 10. pp. 1461-1466. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
191. NIELSEN, M. E., et al. In Human Granulosa Cells from Small Antral Follicles, Androgen Receptor mRNA and Androgen Levels in Follicular Fluid Correlate with FSH Receptor mRNA. *Molecular Human Reproduction*, 20100914, Jan, 2011, vol. 17, no. 1. pp. 63-70. ISSN 1460-2407; 1360-9947.
192. Massin N, Cedrin-Durnerin I, Coussieu C, Galey-Fontaine J, Wolf JP, Hugues JN. Effects of Transdermal Testosterone Application on the Ovarian Response to FSH in Poor Responders Undergoing Assisted

Reproduction Technique— a Prospective, Randomized, Double-Blind Study. *Hum Reprod* 2006;21:1204– 1211.

193. LOSSL, K., et al. Short-Term Androgen Priming by use of Aromatase Inhibitor and hCG before Controlled Ovarian Stimulation for IVF. A Randomized Controlled Trial. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20080515, Aug, 2008, vol. 23, no. 8. pp. 1820-1829. ISSN 1460-2350; 0268-1161.

194. BARAD, D.; BRILL, H. and GLEICHER, N. Update on the use of Dehydroepiandrosterone Supplementation among Women with Diminished Ovarian Function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20071211, Dec, 2007, vol. 24, no. 12. pp. 629-634. ISSN 1058-0468; 1058-0468.

195. BALASCH, J., et al. The Effect of Exogenous Luteinizing Hormone (LH) on Oocyte Viability: Evidence from a Comparative Study using Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Alone Or in Combination with Recombinant LH for Ovarian Stimulation in Pituitary-Suppressed Women Undergoing Assisted Reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, May, 2001, vol. 18, no. 5. pp. 250-256. ISSN 1058-0468; 1058-0468.

196. BARAD, D.; and GLEICHER, N. Effect of Dehydroepiandrosterone on Oocyte and Embryo Yields, Embryo Grade and Cell Number in IVF. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20060922, Nov, 2006, vol. 21, no. 11. pp. 2845-2849. ISSN 0268-1161; 0268-1161.

197. DURNERIN, C. I., et al. Effects of Recombinant LH Treatment on Folliculogenesis and Responsiveness to FSH Stimulation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20071215, Feb, 2008, vol. 23, no. 2. pp. 421-426. ISSN 1460-2350; 0268-1161.

198. CASSON, P. R., et al. Dehydroepiandrosterone Supplementation Augments Ovarian Stimulation in Poor Responders: A Case Series. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 2000, vol. 15, no. 10. pp. 2129-2132. ISSN 0268-1161; 0268-1161.

199. GARCIA-VELASCO, J. A., et al. The Aromatase Inhibitor Letrozole Increases the Concentration of Intraovarian Androgens and Improves in Vitro Fertilization Outcome in Low Responder Patients: A Pilot Study. *Fertility and Sterility*, Jul, 2005, vol. 84, no. 1. pp. 82-87. ISSN 1556-5653; 0015-0282.

200. MITWALLY, M. F.; and CASPER, R. F. Aromatase Inhibition Improves Ovarian Response to Follicle-Stimulating Hormone in Poor Responders. *Fertility and Sterility*, Apr, 2002, vol. 77, no. 4. pp. 776-780. ISSN 0015-0282; 0015-0282.

201. LOSSL, K., et al. Androgen Priming using Aromatase Inhibitor and hCG during Early-Follicular-Phase GnRH Antagonist Down-Regulation in Modified Antagonist Protocols. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20060619, Oct, 2006, vol. 21, no. 10. pp. 2593-2600. ISSN 0268-1161; 0268-1161.

202. Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and Treatment of Low Responders in Assisted Reproductive Technology: A Challenge to Meet. *J Assist Reprod Genet.* 2000 Aug;17(7):357-73.

203. TARLATZIS, B. C., et al. Clinical Management of Low Ovarian Response to Stimulation for IVF: A Systematic Review. *Human Reproduction Update*, Jan-Feb, 2003, vol. 9, no. 1. pp. 61-76. ISSN 1355-4786; 1355-4786.


204. BALASCH, J., et al. Pretreatment with Transdermal Testosterone may Improve Ovarian Response to Gonadotrophins in Poor-Responder IVF Patients with Normal Basal Concentrations of FSH. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20060303, Jul, 2006, vol. 21, no. 7. pp. 1884-1893. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
205. CAMERON, I. T., et al. Occult Ovarian Failure: A Syndrome of Infertility, Regular Menses, and Elevated Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Dec, 1988, vol. 67, no. 6. pp. 1190-1194. ISSN 0021-972X; 0021-972X.
206. KEAY, S. D., et al. Assisted Conception Following Poor Ovarian Response to Gonadotrophin Stimulation. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, May, 1997, vol. 104, no. 5. pp. 521-527. ISSN 0306-5456; 0306-5456.
207. MAHUTTE NG, Arici A. Poor Responders: Does the Protocol make a Difference? . *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002 Jun;14(3):275-81.
208. SURREY, E. S.; and SCHOOLCRAFT, W. B. Evaluating Strategies for Improving Ovarian Response of the Poor Responder Undergoing Assisted Reproductive Techniques. *Fertility and Sterility*, Apr, 2000, vol. 73, no. 4. pp. 667-676. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
209. GOUGEON, A. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*, Apr, 1996, vol. 17, no. 2. pp. 121-155. ISSN 0163-769X; 0163-769X.
210. BARBIERI, R. L., et al. Association of Body Mass Index, Age, and Cigarette Smoking with Serum Testosterone Levels in Cycling Women Undergoing in Vitro Fertilization. *Fertility and Sterility*, Feb, 2005, vol. 83, no. 2. pp. 302-308. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
211. FRATTARELLI, J. L.; and PETERSON, E. H. Effect of Androgen Levels on in Vitro Fertilization Cycles. *Fertility and Sterility*, Jun, 2004, vol. 81, no. 6. pp. 1713-1714. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
212. ZELEZNIK, A. J.; LITTLE-IHRIG, L. and RAMASAWAMY, S. Administration of Dihydrotestosterone to Rhesus Monkeys Inhibits Gonadotropin-Stimulated Ovarian Steroidogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Feb, 2004, vol. 89, no. 2. pp. 860-866. ISSN 0021-972X; 0021-972X.
213. FABREGUES, F., et al. Transdermal Testosterone may Improve Ovarian Response to Gonadotrophins in Low-Responder IVF Patients: A Randomized, Clinical Trial. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20081203, Feb, 2009, vol. 24, no. 2. pp. 349-359. ISSN 1460-2350; 0268-1161.
214. Haning RV Jr, Hackett RJ, Flood CA, Loughlin JS, Zhao QY, Longcope C. Plasma Dehydroepiandrosterone Sulfate Serves as a Prehormone for 48% of Follicular Fluid Testosterone during Treatment with Menotropins. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 may;76(5):1301-7.
215. Burger HG. Androgen Production in Women. *Fertil Steril* 2002; 77(Suppl 4): S3-5, 2002.

216. ARLT, W., et al. Oral Dehydroepiandrosterone for Adrenal Androgen Replacement: Pharmacokinetics and Peripheral Conversion to Androgens and Estrogens in Young Healthy Females After Dexamethasone Suppression. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Jun, 1998, vol. 83, no. 6. pp. 1928-1934. ISSN 0021-972X; 0021-972X.
217. SUNKARA, S. K., et al. Should Androgen Supplementation be used for Poor Ovarian Response in IVF?. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20120116, Mar, 2012, vol. 27, no. 3. pp. 637-640. ISSN 1460-2350; 0268-1161.
218. BARAD, D. H.; and GLEICHER, N. Increased Oocyte Production After Treatment with Dehydroepiandrosterone. *Fertility and Sterility*, Sep, 2005, vol. 84, no. 3. pp. 756. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
219. ARTINI, P. G., et al. DHEA Supplementation Improves Follicular Microenvironment in Poor Responder Patients. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 20120726, Sep, 2012, vol. 28, no. 9. pp. 669-673. ISSN 1473-0766; 0951-3590.
220. Wisner A, Gonen O, Ghetler Y, Shavit T, Berkovitz A, Shulman A. Addition of Dehydroepiandrosterone (DHEA) for Poor-Responder Patients before and during IVF Treatment Improves the Pregnancy Rate: A Randomized Prospective Study. *Hum Reprod*. 2010 Oct;25(10):2496-500., 2010.
221. SUNKARA, S. K.; and COOMARASAMY, A. Androgen Pretreatment in Poor Responders Undergoing Controlled Ovarian Stimulation and in Vitro Fertilization Treatment. *Fertility and Sterility*, 20110524, Jun 30, 2011, vol. 95, no. 8. pp. e73-4; author reply e75. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
222. CARDENAS, H.; HERRICK, J. R. and POPE, W. F. Increased Ovulation Rate in Gilts Treated with Dihydrotestosterone. *Reproduction (Cambridge, England)*, Apr, 2002, vol. 123, no. 4. pp. 527-533. ISSN 1470-1626; 1470-1626.
223. GLEICHER, N.; and BARAD, D. "Ovarian Age-Based" Stimulation of Young Women with Diminished Ovarian Reserve Results in Excellent Pregnancy Rates with in Vitro Fertilization. *Fertility and Sterility*, 20061030, Dec, 2006, vol. 86, no. 6. pp. 1621-1625. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
224. GLEICHER, N.; WEGHOFER, A. and BARAD, D. H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Reduces Embryo Aneuploidy: Direct Evidence from Preimplantation Genetic Screening (PGS). *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 20101110, Nov 10, 2010, vol. 8. pp. 140. ISSN 1477-7827; 1477-7827.
225. LEVI, A. J., et al. Reproductive Outcome in Patients with Diminished Ovarian Reserve. *Fertility and Sterility*, Oct, 2001, vol. 76, no. 4. pp. 666-669. ISSN 0015-0282; 0015-0282.
226. MORALES, C., et al. Cytogenetic Study of Spontaneous Abortions using Semi-Direct Analysis of Chorionic Villi Samples Detects the Broadest Spectrum of Chromosome Abnormalities. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, Jan 1, 2008, vol. 146A, no. 1. pp. 66-70. ISSN 1552-4833; 1552-4825.

227. PAL L, Santoro N. Age-Related Decline in Fertility. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003 Sep;32(3):669-88.
228. KUMBAK, B., et al. Young Patients with Diminished Ovarian Reserve Undergoing Assisted Reproductive Treatments: A Preliminary Report. *Reproductive Biomedicine Online*, Sep, 2005, vol. 11, no. 3. pp. 294-299. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
229. Ben-Rafael Z, Fateh M, Flickinger GL, Tureck R, Blasco L, Mastroianni L Jr. Incidence of Abortion in Pregnancies After in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Obstet Gynecol.* 1988 Mar;71(3 Pt 1):297-300.
230. MCCLAMROCK HD, Adashi EY. Gestational Hyperandrogenism. *Fertil Steril.* 1992 Feb;57(2):257-74.
231. SIR-PETERMANN, T., et al. Maternal Serum Androgens in Pregnant Women with Polycystic Ovarian Syndrome: Possible Implications in Prenatal Androgenization. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Oct, 2002, vol. 17, no. 10. pp. 2573-2579. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
232. SHIFREN, J. L., et al. Transdermal Testosterone Treatment in Women with Impaired Sexual Function After Oophorectomy. *The New England Journal of Medicine*, Sep 7, 2000, vol. 343, no. 10. pp. 682-688. ISSN 0028-4793; 0028-4793.
233. KUSHNIR, M. M., et al. Steroid Profiles in Ovarian Follicular Fluid from Regularly Menstruating Women and Women After Ovarian Stimulation. *Clinical Chemistry*, 20090115, Mar, 2009, vol. 55, no. 3. pp. 519-526. ISSN 1530-8561; 0009-9147.
234. NAESSEN, T., et al. Steroid Profiles in Ovarian Follicular Fluid in Women with and without Polycystic Ovary Syndrome, Analyzed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Fertility and Sterility*, 20100219, Nov, 2010, vol. 94, no. 6. pp. 2228-2233. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
235. WUNDER, D. M., et al. Steroids and Protein Markers in the Follicular Fluid as Indicators of Oocyte Quality in Patients with and without Endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Jun, 2005, vol. 22, no. 6. pp. 257-264. ISSN 1058-0468; 1058-0468.
236. Damario MA, Davis OK, Rosnwaks Z. The Endocrinology of Assisted Reproductive Endocrinologies. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes* 1995; 2: 493-499., 1995.
237. Verberg MF, Eijkemans MJ, Macklon NS, Heijnen EM, Baart EB, Hohmann FP, Fauser BC, Broekmans FJ. The Clinical Significance of the Retrieval of a Low Number of Oocytes Following Mild Ovarian Stimulation for IVF: A Meta-Analysis. *Hum Reprod Update.* 2009 Jan-Feb;15(1):5-12., 2009.
238. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The Result of Intracytoplasmic Sperm Injection is Not Related to any of the Three Basic Sperm Parameters. *Hum Reprod.* 1995 may;10(5):1123-9.
239. HAMMADEH, M. E., et al. Comparison between Chromatin Condensation and Morphology from Testis Biopsy Extracted and Ejaculated Spermatozoa and their Relationship to ICSI Outcome. *Human Reproduction (Oxford, England)*, Feb, 1999, vol. 14, no. 2. pp. 363-367. ISSN 0268-1161; 0268-1161.

240. GOKER, E. N., et al. Comparison of the ICSI Outcome of Ejaculated Sperm with Normal, Abnormal Parameters and Testicular Sperm. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, Sep 10, 2002, vol. 104, no. 2. pp. 129-136. ISSN 0301-2115; 0301-2115.
241. ABU-HASSAN, D., et al. Comet Assay of Cumulus Cells and Spermatozoa DNA Status, and the Relationship to Oocyte Fertilization and Embryo Quality Following ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*, Apr, 2006, vol. 12, no. 4. pp. 447-452. ISSN 1472-6483; 1472-6483.
242. Karydis S, Asimakopoulos B, Papadopoulos N, Vakalopoulos I, Al-Hasani S, Nikolettos N. ICSI Outcome is Not Associated with the Incidence of Spermatozoa with Abnormal Chromatin Condensation. *In Vivo*. 2005 Sep-Oct;19(5):921-5.
243. VAN BLERKOM, J.; ANTCZAK, M. and SCHRADER, R. The Developmental Potential of the Human Oocyte is Related to the Dissolved Oxygen Content of Follicular Fluid: Association with Vascular Endothelial Growth Factor Levels and Perifollicular Blood Flow Characteristics. *Human Reproduction (Oxford, England)*, May, 1997, vol. 12, no. 5. pp. 1047-1055. ISSN 0268-1161; 0268-1161.
244. ARDOY M, Calderón G. Ed: ASEBIR, 2007. *Criterios De Valoración Morfológicos De Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*.
245. Kopitović V, Milatović S, Pjević AT, Bjelica A, Bujas I, Tabs N. Results and Experiences After 1000 IVF Cycles at the Clinic for Gynecology and Obstetrics in Novi Sad. *Med Pregl*. 2011 Nov-Dec;64(11-12):565-9.
246. DE LOS SANTOS, M. J., et al. The Follicular Hormonal Profile in Low-Responder Patients Undergoing Unstimulated Cycles: Is it Hypoandrogenic?. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20120927, Jan, 2013, vol. 28, no. 1. pp. 224-229. ISSN 1460-2350; 0268-1161.

ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA.

 <p>Hospital Universitario La Paz SaludMadrid</p> <p>Comunidad de Madrid</p> <p>Paseo de la Castellana, 261 28046 MADRID ☎ 91 727 70 00</p>	<p style="text-align: center;">ETIQUETA (EN SU DEFECTO, INDIQUE NOMBRE Y UBICACIÓN DEL PACIENTE)</p> <p>NOMBRE:</p> <p>PROCEDENCIA (CAMA): NHC:</p> <p>FECHA:/...../..... GÉNERO:</p>
<p style="text-align: center;">CONSENTIMIENTO INFORMADO IDENTIFICACIÓN: M-GIN-011</p>	<p style="text-align: center;">SERVICIO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA (UNIDAD DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA)</p>
<p style="text-align: center;">FECUNDACION IN VITRO CON INYECCION INTRACITOPLASMATICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)</p>	
<p style="text-align: center;">¿QUÉ LE VAMOS A HACER?</p>	
<p>1. Descripción del procedimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • En qué consiste: en realizar la fecundación en el laboratorio. El procedimiento implica la inyección de un único espermatozoide dentro del ovocito. • Cómo se realiza: <ol style="list-style-type: none"> 1) Estimulación ovárica: para recoger un nº alto de ovocitos aptos para ser fecundados en la placa de cultivo, obteniendo el nº más adecuado de embriones a transferir. La medicación consta de análogos de LHrH diarios, en ciclo largo iniciado el día 22-23-24 del ciclo menstrual anterior. Añadiendo a continuación las gonadotropinas (HMG, FSH, rFSH y HCG) que actúan sobre los folículos ováricos. El control de los folículos en desarrollo se lleva a cabo por ecografía y si se precisa, por la monitorización hormonal. 2) La obtención de ovocitos: por punción transvaginal guiada por ecografía, una vez que se ha conseguido un desarrollo folicular adecuado. Se realiza con anestesia local y sedación ligera, y en ocasiones anestesia general. En esa misma mañana el varón debe recoger semen y entregarlo en el laboratorio FIV (Fecundación In Vitro); la muestra es procesada para la selección de un buen espermatozoide e inyectarlo en el citoplasma del óvulo. No todos los ovocitos recogidos presentan la calidad o el grado de madurez necesario para soportar la inyección del esperma. Esta técnica también puede lesionar los ovocitos, no siendo útiles para un posterior desarrollo embrionario y transferencia. Al día siguiente de la punción, en el laboratorio de FIV se examinan los ovocitos inseminados para comprobar si ha habido fecundación, comunicando el resultado a la paciente. 3) La transferencia embrionaria al interior del útero: mediante un catéter con uno o más embriones, tres como máximo. Se realiza al 2º-3º día a partir de la punción. No suele precisar anestesia. Si hay exceso de embriones (más de 4) se procede a su congelación, si se estiman adecuados para su uso en ciclos posteriores. 4) Constatación del éxito o fracaso: dos semanas después se realiza un test de embarazo. Generalmente se realiza un tratamiento de apoyo a la fase lútea mediante progesterona. Los porcentajes de embarazo por ciclo están en torno al 25% y disminuyen de forma progresiva con el aumento de la edad de la mujer. • Cuánto dura: la obtención de ovocitos dura entre 15 y 30 minutos y la paciente permanece en el "hospital de día" durante unas horas. La transferencia embrionaria dura entre 5 y 10 minutos, y la paciente permanece en reposo 30-60 minutos, marchando a su domicilio a continuación. <p>2. Qué objetivos persigue: conseguir el embarazo.</p>	
<p style="text-align: center;">¿QUÉ RIESGOS TIENE?</p>	
<p>1. Riesgos generales:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Respuesta ovárica excesiva: formación de quistes ováricos, que se clasifica en leve, moderada y severa. Esta última, con importante afectación del estado general, que exige hospitalización y control. Raramente hay peligro para la vida. La sospecha de exceso de estimulación ovárica obliga a cancelar el tratamiento en ese ciclo. - Si no se ha producido la fertilización de los ovocitos no se pueden transferir embriones al interior del útero. - Complicaciones por la punción: 1)Leves: molestias que desaparecen al cabo de unas horas; y 2)Graves: por la posibilidad de dañar vasos, que ocasionan hemorragias intraperitoneales y lesiones de vísceras como vejiga o intestino, que pueden requerir cirugía urgente. - Riesgos fetales: gestación múltiple, abortos y embarazo ectópico (fuera del útero) - Repeticiones de FIV: a partir de 3 intentos los resultados descienden de forma drástica. <p>Riesgos específicos de la inyección intracitoplasmática:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Defectos del cromosoma Y (portado sólo por los varones): por su asociación con la esterilidad masculina, si el varón presenta una alteración, puede que los hijos varones la hereden. - Alteraciones cromosómicas: se ha observado un riesgo 4 veces mayor, lo que también conlleva un aumento de abortos. Esto hace necesario la realización del cariotipo (estudio de los genes). 	
<p style="text-align: right;">05.00</p>	

- Alteraciones genéticas: los varones cuyo semen no contiene espermatozoides por obstrucción del conducto por el que sale (azoospermia obstructiva) pueden ser portadores de mutaciones de la fibrosis quística (enfermedad hereditaria grave, que debe ser evitada). Por ello, todo varón con azoospermia obstructiva debe ser estudiado antes de realizar la ICSI.

2. Riesgos personalizados:

Además de los riesgos anteriormente citados por la/s enfermedad/es que padece puede presentar otras complicaciones.....

3. Beneficios del procedimiento a corto y medio plazo:

Puede lograr la gestación en casos en los que otras técnicas no lo han conseguido.

¿QUÉ OTRAS ALTERNATIVAS HAY?

Ante el fracaso de la técnica y variantes, se recomienda reflexión sobre la adopción.

¿NOS AUTORIZA?

Por este documento solicitamos su autorización para realizarle el procedimiento y/o prueba, y usar imágenes e información de su Historia Clínica con fines docentes o científicos, ya que está siendo atendido en un Hospital Universitario. Su anonimato será respetado.

DECLARACIONES Y FIRMAS

Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda sobre su enfermedad, no dude en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto. Le informamos que tiene derecho a revocar su decisión y retirar su consentimiento.

Conforme a lo dispuesto en la LOPD (Ley de Protección de Datos) 15/1999 de 13 de diciembre se informa que sus datos serán objeto de tratamientos e incorporados a ficheros del área 5 Atención especializada con fines asistenciales, de gestión investigación científica y docencia. Solo podrán ser cedidos a organismos autorizados. Podrá ejercer el derecho a acceso, cancelación, rectificación y oposición en la Gerencia del Área

1. Relativo al paciente:

D./D.^a con D.N.I.

He sido informado/a suficientemente del procedimiento que se me va a realizar, explicándome sus riesgos, complicaciones y alternativas; la he comprendido y he tenido el tiempo suficiente para valorar mi decisión. Por tanto, estoy satisfecho/a con la información recibida. Por ello, doy mi consentimiento para que se me realice dicho procedimiento por el médico responsable y/o médico residente supervisado por facultativo especialista. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno, sin que esta decisión repercuta en mis cuidados posteriores.

Sé que estoy siendo atendido en un Hospital Universitario. Autorizo SI NO para utilizar material gráfico o biológico resultado de la intervención con fines docentes y científicos.

Si existieran preembriones sobrantes congelados, deseamos que sean, señalar opción:

Donación otras parejas

Utilización posterior

Investigación

Cese conservación

Firma del paciente

Fecha: / /

2. Relativo al médico:

Dr./Dra. he informado al paciente y/o al tutor o familiar del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar explicándole los riesgos, complicaciones y alternativas posibles.

Firma del médico

Fecha: / /

3. Relativo a los familiares y tutores:

El paciente D./Dña. no tiene capacidad para decidir en este momento.

D./D.^a con D.N.I. y en calidad de

..... he sido informado/a suficientemente del procedimiento que se le va a realizar. Por ello, doy expresamente mi consentimiento. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno.

Firma del tutor o familiar

Fecha: / /

ANEXO B. CONSENTIMIENTO INFORMADO ESPECÍFICO DEL ESTUDIO.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Análisis de los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular y de la luteinización prematura para optimización de los resultados de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides)”

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Nayara López Carpintero

Servicio de Esterilidad

Teléfono: 600214000

CENTRO: Hospital Universitario La Paz

INTRODUCCIÓN

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

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

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

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

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

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Usted va a someterse a una técnica de reproducción asistida que consiste en la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), para la cual es necesario realizar una hiperestimulación ovárica controlada con el fin de generar múltiples ovocitos (células reproductoras femeninas) en un determinado ciclo.

El protocolo de estimulación asignado es el protocolo largo con agonistas de GnRH (hormona liberadora de Gonadotropina) y rFSH (Hormona estimulante del folículo recombinante) con el fin de estimular el crecimiento de más folículos y obtener más ovocitos en la punción ovárica. En la práctica clínica habitual, la concentración de estradiol y el tamaño folicular son los parámetros rutinarios usados para monitorizar el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria durante la inducción de la ovulación en reproducción asistida, y así comprobar el desarrollo del proceso. El seguimiento del proceso de estimulación será el estándar realizado en la consulta, y se monitorizará el crecimiento de los folículos en el ovario mediante ecografías transvaginales periódicas. Uno de los factores que podría estar implicado en los resultados de fecundación es el nivel de progesterona sérica determinada previamente a la administración de hCG. La única prueba extraordinaria en este punto si usted participa en el estudio que le proponemos es la determinación de progesterona sérica junto con la del estradiol que es la determinación rutinaria. Se aprovechará la analítica rutinaria para hacer las 2 determinaciones el día de la administración de hCG (Gonadotropina coriónica humana).

En este estudio clínico en el que le invitamos a participar analizamos el nivel de hormonas esteroideas existente en el líquido folicular que se obtiene el día de la punción con el objetivo de optimizar los resultados de reproducción asistida. La punción ovárica consiste en la punción del ovario con el objetivo de aspirar los ovocitos contenidos en los folículos y tendrá lugar a las 36 horas de la

administración de hCG. La punción es llevada a cabo mediante una aguja que se introduce por vía transvaginal utilizando la ecografía como guía visual. Para evitar que sufra dolor alguno, usted recibirá anestesia local o sedación leve. Los ovocitos obtenidos mediante la primera punción de cada ovario serán usados para la técnica de reproducción asistida mediante la microinyección espermática (ICSI).

Si usted consiente la participación en este estudio se obtendrá también líquido folicular procedente de la primera aspiración de cada ovario que en la práctica habitual es desechado, y se realizará un análisis hormonal.

La comunidad científica está de acuerdo en que el factor clave en el éxito de la fecundación con ICSI es el ovocito sano. Nuestra hipótesis es que el líquido folicular que rodea al ovocito es fundamental en la salud ovocitaria y que los niveles de hormonas esteroideas (estradiol, progesterona y andrógenos) son mejores indicadores de maduración ovocitaria que el tamaño folicular o el estradiol sérico empleado en la práctica clínica habitual.

Creemos que en los folículos de los que se obtiene un ovocito que es fecundado con éxito existen concentraciones mayores de estradiol, progesterona y andrógenos que en aquellos folículos con un ovocito que degenera o en los que falla la fecundación.

Por otra parte, postulamos que la progesterona sérica alta medida el día de la administración de hCG podría repercutir negativamente en los resultados de ICSI.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Su participación en el estudio no implican beneficios ni riesgos adicionales a los que ya suponen la misma técnica usada como práctica clínica habitual.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los

derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, n^o de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Título del Ensayo: “Análisis de los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular y de la luteinización prematura para optimización de los resultados de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides)”

Yo (nombre y apellidos)

.....

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

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Nayara López Carpintero. Teléfono de contacto: 600214000

.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FIRMA DEL
INVESTIGADOR

ANEXO C: INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN.



Hospital Universitario La Paz

Comunidad de Madrid

**Comisión de Investigación HULP**

Informe de Proyecto de Investigación:

La Comisión de Investigación del HULP ha examinado el proyecto de investigación titulado: "Análisis de los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular y de la luteinización prematura para optimización de los resultados de ICSI (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides)."

Investigador Principal: Nayara López Carpintero. Servicio de Esterilidad.

Sin financiación.

El Proyecto de Investigación cumple los requisitos metodológicos necesarios y es viable en todos sus términos, por todo ello la Comisión de Investigación lo ha considerado adecuado y ha decidido su aprobación para ser presentado en el CEIC.

Madrid, 14 de febrero de 2011

Fdo.: Damián García Olmo
Presidente .C. De Investigación

Fdo.: Alejandro Balsa Criado
Secretario C. de Investigación

ANEXO D: INFORME DEL COMITÉ ÉTICO.



Hospital Universitario La Paz

 Comunidad de Madrid

INFORME DEL COMITE ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Antonio Gil Aguado, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de la Dra. Nayara López Carpintero del Servicio de Esterilidad del Hospital Maternal para que se realice el proyecto de investigación titulado **“ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LIQUIDO FOLICULAR Y DE LA LUTEINIZACIÓN PREMATURA PARA OPTIMIZACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ICSI (INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES)”**, código HULP: PI-1148

y considera que teniendo en cuenta la respuesta a las aclaraciones solicitadas:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios de disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado en el Hospital Universitario La Paz por la Dra. Nayara López Carpintero del Servicio de Esterilidad del Hospital Maternal como investigadora principal

Lo que firmo en Madrid a 26 de mayo de 2011

Firmado:
Don Antonio Gil Aguado

