



Universidad
Zaragoza



Relación de los distintos tipos de estimulación ovárica sobre la obtención de embriones con alta capacidad de implantación

TRABAJO FIN DE GRADO. BIOTECNOLOGÍA.

Unidad de Reproducción Asistida Hospital QuironSalud Zaragoza

Autora: Iratxe Escobar de Carlos

Director: Antonio Urries López

Ponente: Alberto Anel Bernal

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT.....	3
3. ANTECEDENTES	4
4. OBJETIVOS.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
7. CONCLUSIONES	23
8. CONCLUSIONS.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25
ANEXO 1	27
ANEXO 2	28

1. RESUMEN

El papel de la hormona luteinizante (LH) en los protocolos de estimulación ovárica ha sido ampliamente debatido en las últimas décadas. La LH es esencial para proporcionar andrógenos para la síntesis de estrógenos, lo que contribuye a la maduración de los ovocitos y puede desempeñar un papel relevante en la calidad del embrión. Sin embargo, la secreción excesiva de LH que se produce en algunos trastornos, se ha relacionado con efectos perjudiciales sobre la función reproductiva, como ciclos menstruales irregulares, anovulación, infertilidad y aborto espontáneo.

El objetivo final de este trabajo es determinar si la suplementación con LH en los protocolos de estimulación ovárica controlada incrementa la obtención de embriones con alta capacidad de implantación.

Se ha realizado un estudio retrospectivo de 200 ciclos de pacientes del Hospital QuirónSalud Zaragoza entre junio de 2017 y diciembre de 2018, analizándose un total de 774 embriones. La población del estudio ha sido separada en función de la estimulación administrada a las pacientes (FSH frente a FSH+LH). A su vez, se han tenido en cuenta la baja reserva, la edad materna avanzada, así como la calidad seminal.

En general, se ha visto que la suplementación con LH aumenta el número de embriones con alto poder de implantación. Con este estudio se podría concluir que el empleo de la LH mejora la calidad embrionaria en ciclos con pacientes con baja reserva o edad materna avanzada, que no presentan factor masculino.

2. ABSTRACT.

The role of the luteinizing hormone (LH) in ovarian stimulation protocols has been widely discussed in the last decades. The LH is essential to obtain androgens for the synthesis of estrogens, which contributes to the maturation of oocytes and can perform a relevant role in the embryo quality. However, the excessive secretion of LH observed in some disorders has been related to some detrimental effects on the reproductive function, such as irregular menstrual periods, anovulation, infertility and spontaneous abortion.

The objective of this essay is to determine whether the supplementation with LH in the controlled ovarian stimulation protocols increases the production of embryos with high ability of implantation.

A retrospective research of 200 cycles has been carried out in patients of QuironSalud Hospital in Zaragoza between June 2017 and December 2018 and a total of 774 embryos have been analyzed. Patients have been separated taking into account the stimulation given to them (FSH vs FSH+LH). At the same time, we have also taken into consideration the low ovarian reserve, the advanced maternal age as well as the semen quality.

In general, it has been observed that the supplementation with LH increases the number of embryos with high implantation potential. We could come to the conclusion that the use of LH improves the embryo quality in cycles with patients with low ovarian reserve or advanced maternal age whenever they don't show a severe male factor.

3. ANTECEDENTES

La esterilidad es la incapacidad para lograr la gestación tras doce meses de relaciones sexuales regulares y sin uso de ningún método anticonceptivo. Afecta al 15% de la población en edad reproductiva de los países occidentales, es decir, a una de cada seis parejas, y experimenta una evolución creciente. Aunque el varón es responsable de entre el 25-35% de los casos, la edad avanzada de las mujeres con deseo reproductivo puede considerarse una importante causa del actual incremento de la esterilidad.

La capacidad reproductiva de la mujer presenta su máxima fecundidad entre los 20 y los 30 años, a partir de entonces se inicia una pérdida progresiva, que es mucho más acusada desde los 35 años y aún mayor a partir de los 38. El cambio en las aspiraciones de la mujer y su masiva incorporación al mundo laboral, han generado consecuencias en la tendencia reproductiva, como el retraso del establecimiento de relaciones personales estables o el uso de anticonceptivos para retrasar las gestaciones, incrementando así la edad reproductiva social. Por tanto, dado que la perspectiva vital de las mujeres de las sociedades desarrolladas se ha transformado profundamente en los últimos años, se ha registrado una creciente demanda de las técnicas de reproducción asistida humana para solucionar estos problemas de esterilidad^{1 2}.

Las **técnicas de reproducción asistida (TRA)** para el tratamiento de la esterilidad consisten en una serie de procedimientos para la manipulación controlada de gametos y embriones, destinados a favorecer el embarazo.

En la actualidad, la mayoría de las TRA se realizan con el apoyo de un tratamiento de estimulación ovárica controlada (EOC), que pretende conseguir un desarrollo folicular múltiple para aumentar el número de ovocitos recuperados y poder obtener un mayor número de embriones.

Así, es importante conocer el funcionamiento natural del ovario para poder comprender los protocolos de estimulación ovárica. Las funciones fisiológicas del ovario son la liberación periódica de gametos (ovocitos) y la producción de hormonas esteroideas, estradiol y progesterona. Ambas actividades están integradas en el proceso continuo y repetitivo de maduración folicular, ovulación y formación y regresión del cuerpo lúteo, todo lo cual constituye el ciclo ovárico.

El ovario está constituido por tres partes principales: la corteza externa, la médula central y el hilio. Los ovocitos, encerrados en complejos llamados folículos, constituyen la parte interna de la corteza inmersa en el tejido de la estroma.

- Foliculogénesis.

El desarrollo folicular comienza cuando las células germinales migran del saco vitelino a la cresta genital en las semanas 5-6 de gestación. Posteriormente, comienza una rápida multiplicación mitótica de las células germinales, registrándose la máxima cantidad de ovocitos (6-7 millones) en las semanas 16-20. Al comienzo de la pubertad, la masa de células germinales se ha reducido a 300.000-500.000. Durante los siguientes años fértiles hasta la menopausia, unos 400-500 ovocitos serán seleccionados para alcanzar la ovulación.

Los folículos primordiales se forman cuando los ovocitos primarios, detenidos en la profase de meiosis, son envueltos por una sola capa de células de la pregranulosa escamosas. El cambio de la capa de células de la pregranulosa a células cuboides indica la transformación en folículos primarios que, tras rodearse de dos o más capas de células de la granulosa, pasan a folículos secundarios³. Al mismo tiempo, se desarrollan pequeñas zonas de comunicación (gap junctions) entre las células de la granulosa y el ovocito que, permiten el intercambio de nutrientes, iones y moléculas reguladoras.

La capa de la granulosa está separada de las células de la estroma por una membrana, llamada lámina basal. Las células de la estroma periféricas se diferencian en capas concéntricas, llamadas teca interna (más próximas a la lámina basal) y teca externa (la parte más externa). Las capas de la teca aparecen cuando la proliferación de la granulosa produce 3-6 capas de células granulosas⁴.

Posteriormente, se produce una mayor proliferación de las células de la granulosa para formar el folículo preantral. Después, comienza a formarse el antro, que al principio aparece como un agregado de numerosas cavidades intragranulosas, llamadas cuerpos de Call-Exner, pero pronto se acumula líquido procedente de los vasos de la teca para formar el folículo antral. El folículo antral atravesará diferentes estadios de maduración hasta llegar al estadio de folículo preovulatorio.

- Regulación de la dinámica folicular.

La hipófisis anterior comienza su desarrollo entre la cuarta y quinta semana de vida fetal y la circulación portal hipotálamo-hipofisaria, muy importante en la regulación de la dinámica folicular, es funcional en la semana 12. En el hipotálamo se produce la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que llega a la hipófisis anterior donde controla la secreción de gonadotropinas, como son la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

El mecanismo que determina cuántos folículos, y cuáles, comenzarán a crecer en un ciclo no se conoce. El aumento de los niveles de FSH es indispensable para “reclutar” a un grupo de folículos, que comenzará a crecer hasta permitir que uno de ellos llegue a la ovulación. Se cree que el tiempo necesario para que un folículo primario evolucione hasta la ovulación es de alrededor de 85 días⁵:

- La mayor parte de ese tiempo, durante la fase preantral, el desarrollo es independiente de las gonadotropinas⁶. El folículo sufrirá un proceso de crecimiento y diferenciación, sometido a una regulación por factores de crecimiento. La creencia de que el inicio del crecimiento folicular es independiente de la estimulación gonadotrópica se apoya en la

persistencia de este crecimiento en ratones mutantes con deficiencia gonadotrópica y en fetos anencefálicos^{7 8}.

- Durante la fase antral se produce un enorme crecimiento del tamaño folicular que es dependiente de gonadotropinas, las cuales se unirán a sus respectivos receptores.

El ovario tiene la capacidad para producir estrógenos, andrógenos y progestágenos. La síntesis de estas hormonas esteroideas está funcionalmente compartimentalizada dentro de los folículos humanos, en lo que se conoce como “sistema de dos células-dos gonadotropinas”. Es decir, los receptores de LH se encuentran sólo en las células de la teca y los de FSH sólo en las de la granulosa. En respuesta a la LH, el tejido de la teca produce andrógenos que pueden ser convertidos en estrógenos en las células de la granulosa, gracias a la actividad de la enzima aromatasa inducida por la FSH⁹. A medida que el folículo crece, la FSH induce la aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa.

Los andrógenos sirven no sólo como sustratos para la aromatización a estrógenos inducida por FSH, sino también, en bajas concentraciones, pueden estimular aún más la actividad aromatasa. Sin embargo, niveles elevados de andrógenos, promueven la conversión de andrógenos a 5 α -andrógenos reducidos y no a estrógenos, inhibiendo la acción de la aromatasa y de la FSH.

El reclutamiento folicular termina con la selección del folículo destinado a ovular, que viene determinada por el dominio de los estrógenos en un único folículo. Este proceso de selección del folículo dominante resulta del efecto positivo de los estrógenos sobre la secreción hipofisaria de FSH. Sin embargo, este efecto provoca la retroalimentación negativa sobre la FSH a nivel hipotálamo-hipofisario, que sirve para retirar el apoyo de las gonadotropinas a los otros folículos menos desarrollados.

La secreción de FSH es muy sensible al efecto inhibitorio negativo de los estrógenos, incluso cuando los niveles son bajos. Con niveles más altos, los estrógenos se combinan con la inhibina para suprimir profundamente y sostenidamente a la FSH. La FSH estimula la secreción de inhibina por las células de la granulosa, que, a su vez, suprime la secreción de FSH a nivel hipofisario, en una relación recíproca.

La caída de los niveles de FSH provoca una disminución de la actividad de la aromatasa dependiente de FSH y limita la producción de estrógenos en los folículos menos maduros, induciendo irreversiblemente la atresia. El primer fenómeno del proceso de atresia es una disminución de los receptores de FSH en la capa granulosa. Asimismo, los componentes de la granulosa se desorganizan y los de la cavidad antral se reabsorben, lo que provoca su colapso, degenerándose el ovocito. La consecuencia de estos cambios negativos es un proceso llamado apoptosis, muerte celular programada.

El folículo dominante sigue dependiendo de la FSH y debe completar su desarrollo preovulatorio a pesar de que los niveles plasmáticos de FSH están disminuyendo, debido a la rápida producción de estrógenos por la propia FSH.

El folículo dominante presenta una masa de células de la granulosa más grande, lo que supone que contenga un mayor número de receptores de la FSH, por lo que su acción en este folículo es mayor. Además, presenta una mayor vascularización de las células de la teca, lo que permite una diferente llegada de gonadotropinas hacia el folículo dominante que hace que retenga la

sensibilidad a FSH y continúe su desarrollo a pesar de la caída de los niveles de gonadotropinas. Como resultado, la FSH necesaria para la aromatización de los andrógenos se puede mantener en este folículo, mientras que desaparece en los folículos menos desarrollados. En consecuencia, se observa una “ola” de atresia en los folículos menos desarrollados, que es paralela al aumento de los estrógenos.

El folículo preovulatorio produce mayores cantidades de estrógenos, que aumentan rápidamente en la fase folicular tardía y alcanzan un pico aproximadamente 24-36 horas antes de la ovulación. Los niveles elevados de estradiol desencadenan el pico de LH, que actúa a través de sus propios receptores y promueve la luteinización de las células de la granulosa del folículo dominante, lo que resulta en la producción de progesterona.

La ovulación se produce aproximadamente 10-12 horas después del pico de LH; que supone la reanudación de la meiosis en el ovocito, la luteinización de las células de la granulosa y la síntesis de progesterona y prostaglandinas en el folículo. La progesterona aumenta la actividad de enzimas proteolíticas responsables, junto con las prostaglandinas, de la digestión y rotura de la pared celular. El aumento de la FSH en la mitad del ciclo, controlado por la progesterona, provoca la liberación del ovocito y garantiza que haya suficientes receptores de LH para una fase lútea adecuada¹⁰.

- **Estimulación ovárica.**

Una vez explicado el complejo proceso y regulación de la dinámica folicular podemos describir los tratamientos más utilizados para la estimulación ovárica. Con estos tratamientos conseguiremos el reclutamiento y estimulación simultánea de varios ovocitos, con lo que se aumenta el número de embriones obtenidos y, por tanto, la posibilidad de embarazo tras un ciclo de FIV. Además, podremos controlar, de forma bastante fiable, el momento en que los ovocitos pueden ser captados del folículo ovárico.

En la actualidad, se administran gonadotropinas en dosis suficiente para superar el umbral de FSH, anular los mecanismos intraováricos de selección y mantener el crecimiento de múltiples folículos preovulatorios. Esto se consigue, habitualmente, administrando gonadotropinas bajo supresión hipofisiaria con análogos de la GnRH ¹¹.

Inicialmente, los preparados gonadotrópicos se basaban en la gonadotropina menopáusica humana (hMG), obtenida por purificación a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas. La hMG con su componente FSH recluta folículos ováricos y estimula su crecimiento, y el componente LH facilita la maduración del folículo, pero no es suficiente para provocar la ovulación. Más tarde, se desarrolló una preparación urinaria más purificada de FSH (uFSH). Actualmente, se producen FSH y LH recombinantes.

La FSH es secretada por la glándula pituitaria y forma parte de la familia de las hormonas glicoprotéicas. Se trata de un heterodímero formado por dos subunidades, α y β ¹². Como hemos comentado, su mecanismo de acción se basa en el reclutamiento de folículos y la estimulación de su crecimiento. Las indicaciones para su uso son:

- Inducción de la ovulación.
- Estimulación ovárica en técnicas de reproducción asistida.
- Fallo de los tratamientos de estimulación con clomifeno.
- Pacientes con síndrome de ovario poliquístico.
- Pacientes con niveles elevados de LH.

La LH también pertenece a la familia de las hormonas glicoprotéicas, por lo que su estructura es similar a la de la FSH. La subunidad α es idéntica para las diferentes hormonas, mientras que la subunidad β es la que varía y le confiere la función biológica al interactuar con su respectivo receptor. El mecanismo de acción de la LH consiste en la estimulación de la maduración folicular. Las indicaciones para su uso son:

- Primera opción en el tratamiento de los hipogonadismos hipogonadótropos.
- En pacientes con baja respuesta a la estimulación con gonadotropinas.
- En mujeres de edad superior a los 38 años que van a ser sometidas a un tratamiento de estimulación ovárica para un ciclo de FIV.

En los ciclos de estimulación ovárica existen varias formas de fijar el momento de la ovulación:

- Identificando el pico endógeno de LH. Es una técnica que está en desuso porque resulta clínicamente difícil.
- Induciendo el pico con gonadotropina coriónica humana recombinante (r-hCG) administrada de forma exógena.
La hCG posee una estructura y actividad biológica similar a la de la hormona natural del embarazo, actuando sobre los receptores para la LH, por lo que su administración permite conocer con exactitud el momento de la ovulación. Se sabe que ésta ocurre 37 horas después de la administración de la hCG, por lo que los folículos deben ser aspirados entre las 36 ± 1 horas.
- Mediante la inducción de la ovulación con agonistas de la GnRH.
- Mediante la inducción con LH recombinante.

El momento de la inducción de la ovulación debe venir indicado por uno de los siguientes factores:

- Ecográfico: por la presencia de, al menos, dos folículos de 16-18 mm de diámetro medio.
- Analítico: estradiol en suero sobre 300 pg/ml por cada folículo que alcance un diámetro medio de 17 mm.

Los análogos de la GnRH se vienen usando de forma rutinaria en los tratamientos de reproducción asistida con el fin de evitar el pico endógeno de LH inducido por el incremento de los niveles de estradiol. Aunque inicialmente sólo se contaba con los agonistas de la GnRH, la introducción de los antagonistas ha ampliado la oferta terapéutica.

a) Agonistas de la GnRH.

Mientras que la liberación de GnRH de forma pulsátil estimula la síntesis y liberación de gonadotropinas hipofisarias, su administración de forma continua provoca una liberación inicial de gonadotropinas (efecto flare up) que iría seguida de un bloqueo reversible de la liberación hipofisaria de FSH y LH. La principal finalidad de los análogos de la GnRH en los programas de

FIV sería evitar el pico prematuro de LH con la luteinización posterior del folículo que con frecuencia ocurre durante la estimulación con gonadotropinas.

b) Antagonistas de la GnRH.

Los antagonistas de la GnRH, por el contrario, actúan de forma competitiva uniéndose al receptor, bloqueándolo y causando una profunda e inmediata supresión hipofisaria. Así, se evita el efecto flare up por liberación inicial de FSH y LH, y se necesitan menos dosis de gonadotropinas para la estimulación ovárica¹³.

Cuando se produce una respuesta anormalmente alta de los ovarios ante la estimulación hormonal, nos encontramos ante el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Por lo tanto, será necesario un protocolo individualizado según las necesidades de cada paciente para tratar de disminuir las probabilidades de sufrir el SHO.

▪ **Punción folicular.**

Una vez se ha llevado a cabo correctamente la estimulación ovárica, se realiza la punción folicular. Este procedimiento consiste en la aspiración del contenido de los folículos ováricos que han madurado gracias a la estimulación ovárica.

▪ **Análisis de la muestra seminal.**

Asimismo, se debe realizar un **análisis básico de la muestra seminal** en el que se evalúa la concentración, motilidad y morfología espermática, así como el volumen del eyaculado, para obtener información del estado clínico del varón.

Posteriormente, se debe procesar la muestra seminal mediante la **capacitación espermática** para la selección de los espermatozoides de mayor calidad y movilidad. Según el último manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la examinación y procesamiento del semen humano, los valores de referencia mínimos que debe presentar una muestra seminal para ser considerada normal son los siguientes¹⁴:

Parámetro	Límite de referencia mínimo
Volumen seminal (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Número total de espermatozoides (10 ⁶ por eyaculado)	39 (33-46)
Concentración espermática (10 ⁶ por ml)	15 (12-16)
Motilidad total (PR + NP, %)	40 (38-42)
Motilidad progresiva (PR, %)	32 (31-34)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología espermática (formas normales, %)	4 (3.0-4.0)

Tabla 1. Límites mínimos de referencia (percentiles 5 y sus intervalos de confianza del 95%) para las características del semen, según la Organización Mundial de la Salud¹⁴.

- **Fecundación *in vitro*.**

Una vez disponemos de los ovocitos maduros y los espermatozoides capacitados, se puede proceder a la fecundación *in vitro* (FIV). Hay diferentes tipos de FIV según la concentración de la muestra seminal:

- FIV convencional: consiste en la co-incubación de los ovocitos con los espermatozoides.
- Microinyección intracitoplasmática (ICSI): esta técnica consiste en la microinyección mediante un micromanipulador de un espermatozoide en el interior de un ovocito que ha sido previamente decumulado.
- En parejas en las que la muestra espermática presenta una elevada fragmentación del DNA y/o una baja concentración y mala morfología espermática, se realiza la técnica PICSI, que es una variante de la ICSI. A diferencia de la ICSI, en la que los espermatozoides son seleccionados subjetivamente por el embriólogo en función de su morfología y motilidad, en la PICSI se seleccionan de manera objetiva los espermatozoides con un mayor grado de madurez y menor daño en el DNA. Esto se realiza depositando los espermatozoides en una placa que contiene un material sintético muy similar al ácido hialurónico, que es la sustancia principal que se encuentra en las células que rodean al ovocito. Los espermatozoides de buena calidad se adherirán por la cabeza a la placa, pero la cola seguirá moviéndose, lo que permite su identificación y fácil selección.

- **Cultivo embrionario.**

Tras la fecundación, se procede al cultivo de los cigotos en el incubador. En la actualidad, el desarrollo de los sistemas *time-lapse* ha permitido el cultivo ininterrumpido en un medio universal que permite el mantenimiento de los embriones en el cultivo a lo largo de todo su desarrollo hasta el momento de la transferencia. Gracias a esta tecnología se puede llevar a cabo un seguimiento continuado de los embriones, obteniendo información detallada de su evolución que permite una mejor selección embrionaria¹⁵.

Para la categorización de los embriones, los laboratorios se basan en la clasificación morfológica de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). La clasificación de ASEBIR, publicada en 2007, jerarquiza los embriones en cuatro categorías: A, B, C y D siendo estos últimos los que menor potencial de implantación tienen. Así, valora morfológicamente cada uno de los estadios, desde el ovocito (Día inicial, D+0), cigoto y primera división celular (D+1) hasta el estadio de blastocisto (D+5)¹⁶. Además, la incorporación de los sistemas *time-lapse* ha permitido clasificar los embriones no solo de forma morfológica sino también basándose en su cinética. De esta forma, cada laboratorio crea su propio algoritmo en base a la morfocinética.

- **Transferencia embrionaria.**

Como último paso en el tratamiento de FIV, se realiza la transferencia embrionaria. Este procedimiento consiste en la introducción de los embriones seleccionados en el útero materno bajo guía ecográfica.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es comparar dos protocolos de estimulación ovárica con la finalidad de determinar si la suplementación con LH mejora la calidad embrionaria en nuestras pacientes que presentan baja reserva y/o edad materna avanzada. Para ello comparamos la efectividad del uso de FSH recombinante en combinación con LH recombinante, frente al uso de FSH recombinante sola en los protocolos de estimulación ovárica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo de 200 ciclos de pacientes del Hospital QuirónSalud Zaragoza entre junio de 2017 y diciembre de 2018. Para la realización de este trabajo únicamente se han analizado ovocitos propios y se ha tenido en consideración diferentes tipos de esterilidad:

- El factor masculino: la calidad seminal.
- El factor femenino: la baja reserva y/o edad materna avanzada.

La población del estudio está constituida por 200 ciclos de pacientes con una edad media de $37,69 \pm 3,49$, de los cuales se han analizado un total de 774 embriones. La población se ha dividido en dos grupos según el protocolo de estimulación que han recibido las pacientes (FSH frente a FSH+LH):

- Estimulación realizada únicamente con FSH. La edad media de las pacientes pertenecientes a este grupo es de $35,94 \pm 4,52$ años y se han obtenido 71 embriones.
- Estimulación realizada con FSH en conjunto con LH. La edad media de las pacientes pertenecientes a este grupo es de $37,88 \pm 3,35$ años y se han obtenido 703 embriones.

Todos los embriones se han obtenido siguiendo el protocolo mencionado a continuación:

- **Estimulación ovárica.**

En este estudio se han administrado antagonistas de la GnRH junto con gonadotropinas (FSH vs FSH+LH).

- Administramos solo FSH a 17 pacientes normorrespondedoras con una edad media de $35,94 \pm 4,52$ años. Analizamos 71 embriones.
- Administramos FSH+LH a 183 pacientes con una edad media de $37,88 \pm 3,35$ años que presentan una baja reserva (número de folículos antrales < 5) o una edad materna avanzada (mayor que 38 años) o que han presentado mala respuesta en anteriores ciclos en los que se ha empleado FSH sola. Analizamos 703 embriones.

De esta manera, se realizan una serie de subdivisiones en cada grupo para tratar de ver si realmente se produce una mejora en los casos de:

- Edad materna avanzada.

	FSH		FSH+LH	
	<i>n=71</i> <i>embriones</i>	<i>Nº pacientes</i>	<i>n=703</i> <i>embriones</i>	<i>Nº pacientes</i>
Edad materna < 35 años	21	5	133	29
Edad materna 35-38 años	22	5	221	52
Edad materna > 38 años	28	7	349	102

Tabla 2. Muestra el número de embriones analizados en los tres grupos de pacientes divididos en función de la edad materna y según el tipo de estimulación ovárica recibida.

- Baja reserva.

	FSH		FSH+LH	
	<i>n=71</i> <i>embriones</i>	<i>Nº pacientes</i>	<i>n=703</i> <i>embriones</i>	<i>Nº pacientes</i>
Nº folículos antrales < 5	17	7	187	90
Nº folículos antrales > 5	54	10	516	93

Tabla 3. Muestra el número de embriones analizados en función de la reserva ovárica y según el tipo de estimulación recibida.

Mediante ecografía se realiza el seguimiento del crecimiento de los folículos y cuando adquieren un tamaño igual o superior a 18 mm, se administra la hCG a la paciente.

Tras la estimulación ovárica, se realiza la **punción folicular** mediante una aguja transvaginal guiada por ecografía. Paralelamente, se realiza el **análisis de la muestra seminal** mediante una cámara Makler bajo microscopía óptica. A continuación, se procesa la muestra seminal mediante la **capacitación espermática**. La técnica utilizada en este laboratorio es la centrifugación por gradiente de densidad, en la que los espermatozoides seleccionados serán aquellos que atraviesen los gradientes de densidad del 40% y del 80% y que, por tanto, serán viables y móviles. Los medios utilizados para los gradientes son PureSperm 40™ y PureSperm 80™ de la casa comercial Nidacon ¹⁷.

Así, se realiza otra subdivisión según el recuento de espermatozoides móviles (REM) obtenido tras analizar la muestra seminal. De esta manera, se intenta descartar aquellos casos en los que el factor masculino interfiere en la calidad de los embriones obtenidos tras la estimulación con FSH+LH. Se realizan tres subgrupos:

- Factor masculino severo: REM < 3 millones/ml.
- Factor masculino ligero: REM 3-15 millones/ml.
- Normozoospermia: REM > 15 millones/ml.

Según la Organización Mundial de la Salud, la concentración normal de espermatozoides en una muestra seminal es de 15 millones de espermatozoides por cada mililitro de volumen de eyaculado. Si el recuento de espermatozoides móviles (REM) es menor a dicho valor, estaríamos hablando de oligozoospermia¹⁴, un número anormalmente bajo de espermatozoides en la muestra seminal.

	FSH		FSH+LH	
	<i>n=71</i> <i>embriones</i>	<i>Nº pacientes</i>	<i>n=703</i> <i>embriones</i>	<i>Nº pacientes</i>
REM < 3 millones/ml	6	2	148	37
REM 3-15 millones/ml	42	8	236	61
REM > 15 millones/ml	23	7	319	85

Tabla 4. Muestra el número de embriones analizados los tres grupos de pacientes divididos en función de la concentración espermática y según el tipo de estimulación ovárica recibida.

▪ Fecundación *in vitro*

Dependiendo de la concentración de espermatozoides móviles observada en la muestra seminal, se procederá a utilizar la técnica más indicada:

- Cuando la concentración espermática es superior a 3 millones de espermatozoides móviles por mililitro, se cuenta con una calidad seminal suficiente para que el espermatozoide sea capaz de fecundar al ovocito por sí mismo, por lo que se realiza la FIV convencional.
- Cuando la concentración espermática es inferior a 3 millones de espermatozoides por mililitro, la muestra espermática es de peor calidad, por lo que se lleva a cabo la ICSI.

▪ Cultivo embrionario

Tras la fecundación se cultivan los embriones en el incubador Geri+®, en el que se monitoriza el seguimiento de su desarrollo. Se trata de un incubador *time-lapse* en el cual se realiza el cultivo embrionario en medio único (Gems Geri®, Genea). Los embriones pueden ser analizados gracias al software Geri Assess acoplado al incubador.

La categorización de los embriones realizada en este laboratorio se basa en la clasificación morfológica de ASEBIR (Anexo 1, Figura 10) y en el análisis cinético mediante un algoritmo propio creado y validado en nuestro laboratorio¹⁸ (Anexo 2, Figura 11).

En base a estos criterios de clasificación, para este estudio se ha considerado:

- Embriones de grado 1 (G1) a aquellos con una tasa de implantación del 70,40%.
- Embriones de grado 2 (G2) a aquellos con una tasa de implantación del 48,70%.
- Embriones de grado 3 (G3) a aquellos con una tasa de implantación del 40% al 29,4%.
- Embriones de grado 4 (G4) a aquellos con una tasa de implantación del 12,5% al 0%.

De esta manera, definimos como embriones de buena calidad a aquellos de grado 1 y grado 2.

- **Transferencia embrionaria**

La transferencia embrionaria consiste en la introducción de los embriones en el útero materno con la ayuda de una cánula. La transferencia se realiza también en medio Gems Geri®.

- **Determinación del embarazo clínico**

Pasados 15 días de la transferencia embrionaria las pacientes se realizan un análisis de sangre. Esta prueba consiste en la medida de la concentración de gonadotropina coriónica humana sérica (hCG), una hormona producida por el embrión, en sangre. Valores superiores a 10 UI/l son indicativos de gestación. Estos resultados se deben confirmar mediante ecografía y la visualización de las vesículas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos han sido analizados utilizando Microsoft Excel. Las comparaciones estadísticas entre el grupo de ciclos en los que se ha empleado FSH sola y el grupo en el que se ha utilizado FSH conjuntamente con LH se han realizado mediante el test t-Student. La significancia estadística se asume al obtener un p-valor < 0,05.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha analizado si la administración de la LH junto con la FSH proporciona embriones de mayor tasa de implantación (grado 1 y 2) frente a la administración de la FSH sola. Para ello, se ha calculado el porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría tras haber empleado un protocolo u otro de estimulación ovárica.

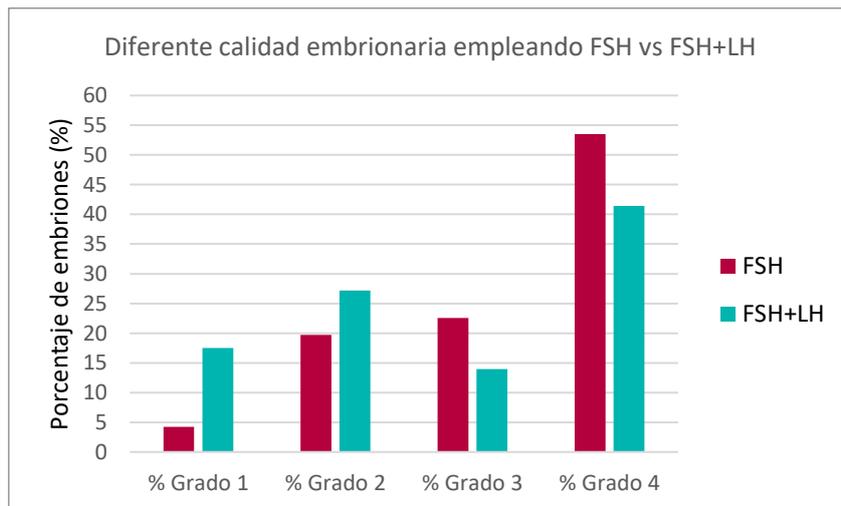


Figura 1. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de todos los ciclos.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	3	4,30	123	17,5
G2	14	19,7	191	27,2
G3	16	22,5	98	13,9
G4	38	53,5	293	41,4
G1+G2	17*	24	314*	44,7

Tabla 5. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria según la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,04

Empleando los datos del total de los ciclos analizados, se obtiene la figura 1. En ella se puede observar que mediante la suplementación con LH se consigue un mayor porcentaje de embriones de grado 1 y 2, un 24% (n=17 embriones) al emplear FSH sola frente a un 44,7% (n=314 embriones) al administrar FSH+LH. Para determinar si estos resultados poseen significancia estadística, se emplea Excel para realizar el test t-Student para dos muestras independientes. De esta manera, obtenemos un p-valor de 0,04, por lo que, al ser menor a 0,05, el resultado es estadísticamente significativo.

- Edad materna avanzada.

A continuación, se van a comparar tres grupos de pacientes de edades diferentes tratar de ver el efecto de la LH en cada uno de ellos:

- Menores de 35 años: 34 pacientes.
- Entre 35 y 38 años: 57 pacientes.
- Mayores de 38 años: 109 pacientes.

Se han analizado los embriones obtenidos de pacientes con una edad materna avanzada para determinar si en estos casos la LH ejerce un efecto beneficioso en la calidad embrionaria.

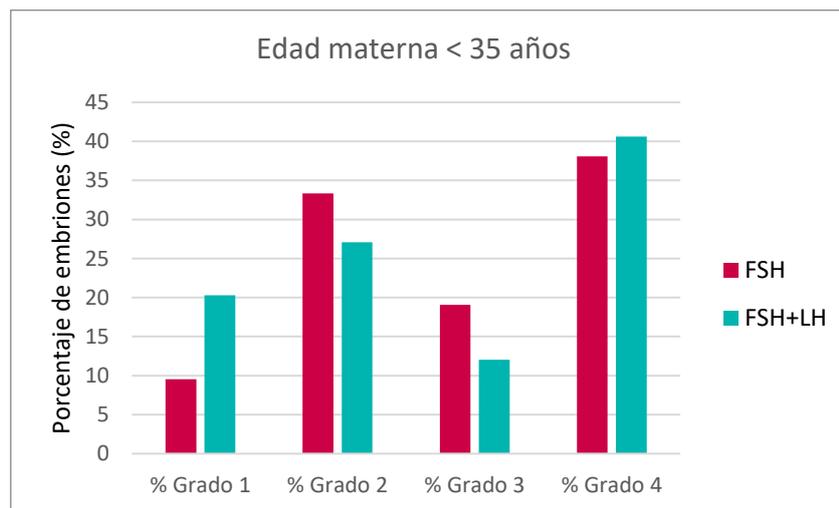


Figura 2. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes menores de 35 años.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	2	9,50	27	20,3
G2	7	33,4	36	27,1
G3	4	19,0	16	12,0
G4	8	38,1	54	40,6
G1+G2	9*	42,9	63*	47,4

Tabla 6. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de pacientes menores de 35 años y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,03.

Al observar la calidad de los embriones procedentes de pacientes menores de 35 años (34 pacientes), se ve que el efecto de la LH no confiere una ventaja. Si sumamos los porcentajes de los embriones de grado 1 y 2, se obtienen unos valores de 42,9% (n=9) al estimular con FSH sola y de 47,4% (n=63) al estimular con FSH+LH. Es decir, no se observan diferencias representativas tras el empleo de un protocolo de estimulación u otro, ya que por lo general las mujeres más jóvenes tienen mayor cantidad de óvulos y de mejor calidad, lo que conlleva a una mayor tasa de fecundación y de implantación. Al calcular el p-valor, se ha obtenido un valor de 0,03, por lo que dichos resultados son estadísticamente significativos.

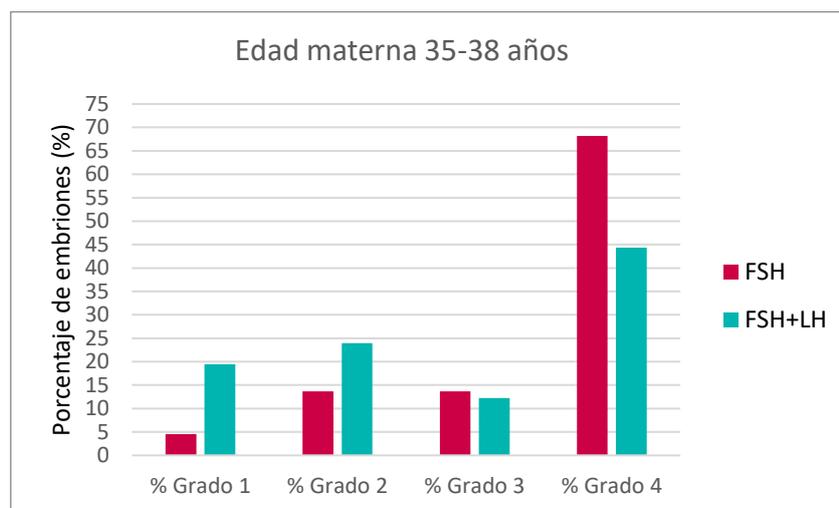


Figura 3. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes entre 35-38 años.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	1	4,70	43	19,5
G2	3	13,6	53	24,0
G3	3	13,6	27	12,2
G4	15	68,2	98	44,3
G1+G2	4*	18,3	96*	43,5

Tabla 7. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de pacientes entre 35-38 años y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,01.

Sin embargo, al aumentar la edad de las pacientes, 35-38 años (57 pacientes) se observa que la suplementación con la LH sí que proporciona un efecto beneficioso en la calidad embrionaria, ya que a partir de los 35 años la calidad de los ovocitos va siendo inferior. Se obtiene un 18,3% (n=4) de embriones de grado 1 y 2 al administrar FSH frente a un 43,5% (n=96) al emplear FSH+LH. De esta manera, se observa un mayor porcentaje de embriones de mayor calidad tras la administración de la LH. Se obtiene un p-valor de 0,01 por lo que los resultados son estadísticamente significativos.

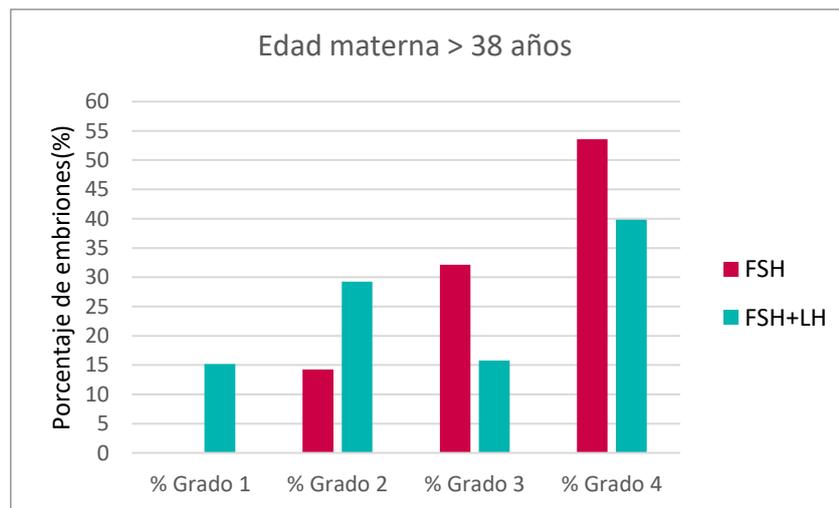


Figura 4. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes mayores de 38 años.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	0	0	53	15,2
G2	4	14,3	102	29,2
G3	9	32,1	55	15,8
G4	15	53,6	139	39,8
G1+G2	4*	14,3	155*	44,4

Tabla 8. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de pacientes mayores de 38 años y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,09.

Lo mismo sucede con pacientes de edad materna avanzada, mayores de 38 años (109 pacientes), observándose también un mayor porcentaje de embriones de alta tasa de implantación al emplear la LH, 14,3% (n=4) frente a un 44,4% (n=155). Incluso no se ha obtenido ningún embrión de grado 1 tras estimular con la FSH sola. Obtenemos un p-valor de 0,09 por lo que no se observan diferencias estadísticamente significativas probablemente por el bajo valor de n en el caso de FSH, aunque la tendencia continúa hacia una mejor calidad embrionaria tras la suplementación con LH.

El beneficio de la administración de LH a pacientes de mayores de 35 años, podría explicarse por los cambios endocrinos que ocurren con el envejecimiento ovárico. Se produce un aumento de los niveles de FSH, probablemente debido a la disminución de la secreción ovárica de inhibina, que no viene acompañado por un aumento de la LH¹⁹, produciéndose una disminución progresiva de los niveles de andrógenos con la edad²⁰. De esta manera, la acción de la LH aumenta la producción de andrógenos a nivel folicular para su posterior aromatización a estrógenos, restaurando el microambiente folicular, lo cual daría lugar a una mejor calidad ovocitaria y embrionaria.

- Baja reserva.

A continuación, se realizan dos grupos para observar si la estimulación con LH mejora la calidad embrionaria en los casos de baja reserva ovárica:

- Menos de 5 folículos antrales (97 pacientes).
- Más de 5 folículos antrales (103 pacientes).

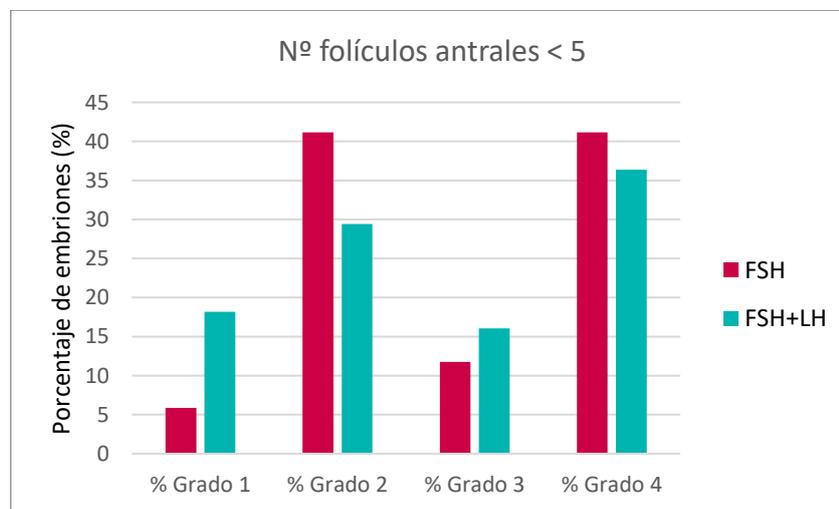


Figura 5. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes con un número de folículos antrales inferior a 5.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	1	5,90	34	18,2
G2	7	41,2	55	29,4
G3	2	11,7	30	16,0
G4	7	41,2	68	36,4
G1+G2	8*	47,1	89*	47,6

Tabla 9. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de pacientes con un número de folículos antrales menor que 5 y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,06.

En el caso de pacientes con menos de 5 folículos antrales, a pesar de obtener un porcentaje significativamente mayor de embriones de grado 1 al administrar LH (5,9% frente a 18,2%), al sumar los porcentajes de embriones de mejor calidad (grado 1 y 2) se obtienen valores muy similares: 47,1% (n=8) tras estimular con FSH y 47,6% (n=89) tras emplear FSH+LH. Esto puede deberse a que debido al bajo número de pacientes, no se ha realizado una separación por edad dentro de las pacientes con menos de 5 folículos antrales. De esta manera, se podrían encontrar pacientes de edades dispares en ambos grupos, lo cual estaría afectando a la calidad embrionaria. Se ha obtenido un p-valor de 0,06 por lo que no se observan diferencias estadísticamente significativas de nuevo debido al bajo valor de n en el grupo de pacientes estimuladas con FSH.

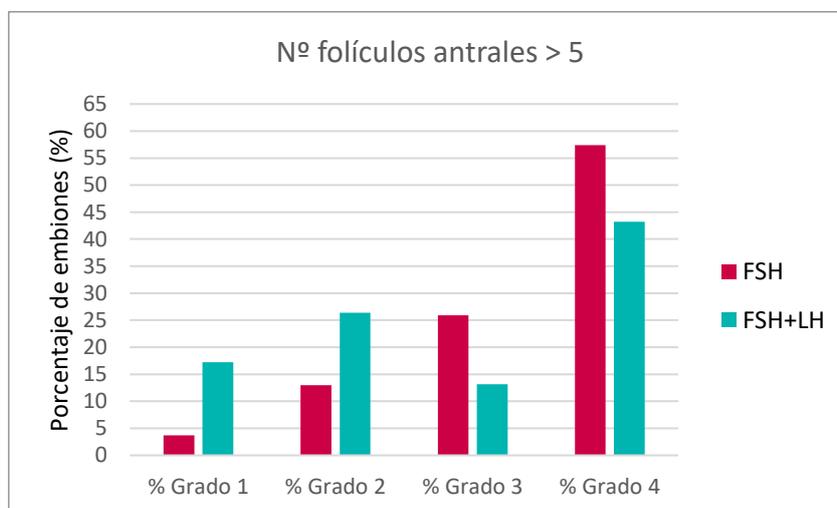


Figura 6. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes con un número de folículos antrales superior a 5.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	2	3,70	89	17,2
G2	7	13,0	136	26,4
G3	14	26,0	68	13,2
G4	31	57,3	223	43,2
G1+G2	9*	16,7	225*	43,6

Tabla 10. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de pacientes con un número de folículos antrales mayor que 5 y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,04.

Sin embargo, en el caso de pacientes con más de 5 folículos antrales, sí que se obtiene un mayor porcentaje de embriones de grado 1 y 2 tras la suplementación con LH, 16,7% (n=9) frente a 43,6% (n=225). Se ha obtenido un p-valor de 0,04, por lo que los resultados son estadísticamente significativos.

- Factor masculino.

Para descartar el efecto del factor masculino y poder ver si realmente con la LH se obtienen más embriones con una alta tasa de implantación, se han realizado tres grupos según la calidad de la muestra seminal:

- Factor masculino severo: REM < 3 millones/ml.
- Factor masculino ligero: REM 3-15 millones/ml.
- Normozoospermia: REM > 15 millones/ml.

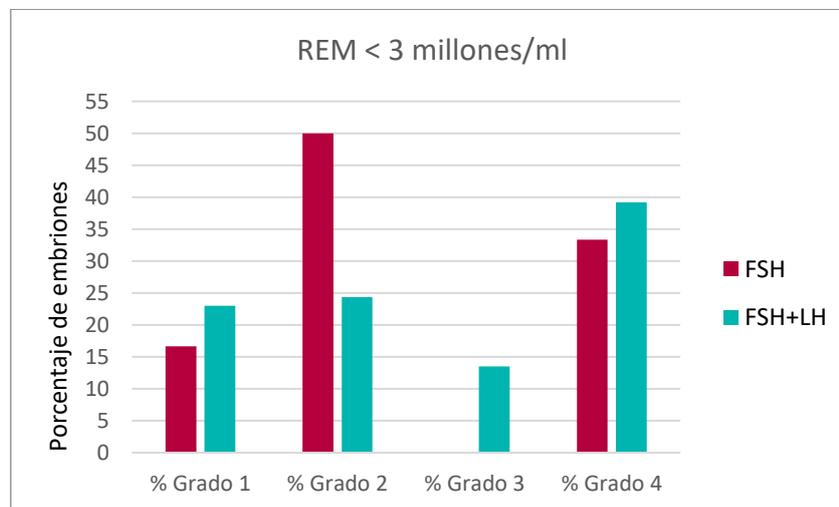


Figura 7. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes con un REM < 3 millones/ml.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	1	16,7	34	23
G2	3	50	36	24,3
G3	0	0	20	13,5
G4	2	33,3	58	39,2
G1+G2	4*	66,7	70*	47,3

Tabla 11. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de muestras seminales con factor masculino severo y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,001.

Como se puede observar, el factor masculino severo enmascara el efecto que tiene la LH sobre la calidad embrionaria, ya que en los ciclos en los que se ha empleado FSH+LH observamos un menor número de embriones con alto poder de implantación que para el grupo con FSH sola (66,7%, n=4 frente a 47,3%, n=70).

Se ha obtenido un p-valor de 0,001, por lo que los resultados poseen significancia estadística. De esta manera, se deduce que efectivamente el factor masculino afecta de manera importante la calidad embrionaria, por lo que no se observa el efecto de la LH. Por lo tanto, se han realizado otros subgrupos en los que se ha eliminado el factor masculino severo para comprobar si la suplementación con LH confiere embriones de alta tasa de implantación.

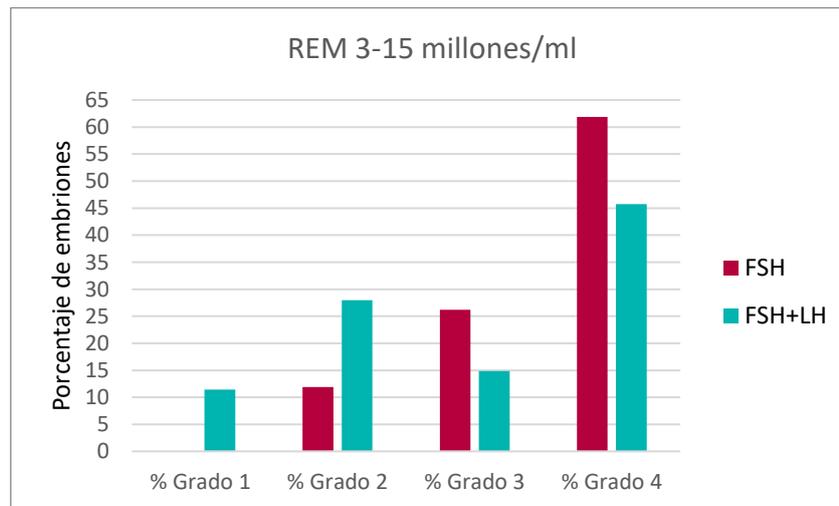


Figura 8. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes con un REM 3-15 millones/ml.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	0	0	27	11,4
G2	5	11,9	66	28,0
G3	11	26,2	35	14,8
G4	26	61,9	108	45,8
G1+G2	5*	11,9	93*	39,4

Tabla 12. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de muestras seminales con factor masculino ligero y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor= 0,045.

Sin embargo, con un factor masculino ligero es posible apreciar un mayor porcentaje de embriones de mejor calidad tras la administración de la LH, 11,9% (n=5) frente a 39,4% (n=93). Se ha obtenido un p-valor de 0,045, por lo que los resultados son estadísticamente significativos.

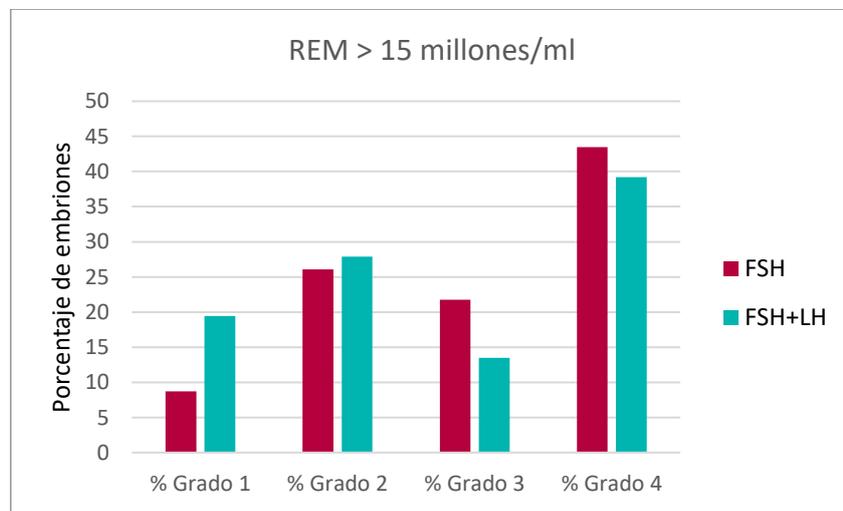


Figura 9. Representación mediante una gráfica de barras de los diferentes porcentajes de embriones de distintas categorías, separados en función de la estimulación ovárica (FSH frente a FSH+LH). Esta figura ha sido generada con los datos de pacientes con un REM > 15 millones/ml.

	FSH		FSH+LH	
	Nº embriones	% embriones (%)	Nº embriones	% embriones (%)
G1	2	8,70	62	19,4
G2	6	26,1	89	27,9
G3	5	21,7	43	13,5
G4	10	43,5	125	39,2
G1+G2	8*	34,8	151*	47,3

Tabla 13. Número y porcentaje de embriones correspondientes a cada categoría de calidad embrionaria, procedentes de muestras seminales normozoospermicas y separados en función de la estimulación ovárica empleada (FSH vs FSH+LH). *p-valor=0,03.

Asimismo, al eliminar el factor masculino se observa una mayor cantidad de embriones de alta tasa de implantación tras la estimulación con FSH+LH, 34,8% (n=8) frente a 47,3% (n=151). Se ha obtenido un p-valor de 0,03, por lo que los resultados son estadísticamente significativos.

Por lo tanto, podemos concluir que el factor masculino severo afecta de tal manera a la calidad embrionaria que no se puede apreciar el efecto de la LH en dicho caso. Sin embargo, analizar los embriones obtenidos a partir de una muestra seminal normal, se observa un mayor número de embriones tras la estimulación con FSH+LH frente a la estimulación con FSH sola.

DISCUSIÓN

En este estudio se han empleado antagonistas de la GnRH que inducen una supresión hipofisaria de secreción de gonadotropinas profunda e inmediata. Es cierto que el reclutamiento y crecimiento folicular se puede lograr con preparaciones de FSH pura. Sin embargo, la LH juega un papel esencial en la producción de andrógenos por las células de la teca en los estadios iniciales del crecimiento folicular, que son necesarios para la aromatización a estrógenos en las células de la granulosa. Los estrógenos son los encargados de estimular la proliferación del endometrio y la formación de los vasos sanguíneos, que cumplen un papel crítico en la implantación. Además, la acción de la LH es muy importante en las etapas finales de la maduración folicular en las que los receptores de la LH están expresados tanto en las células de la teca como en las de la granulosa, por lo que estimula la madurez de los folículos más desarrollados.

Por todos estos motivos y tras los resultados obtenidos en este estudio, se concluye que la LH podría tener implicación en la obtención de embriones con un alto poder de implantación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el número de pacientes de ambos grupos analizados es muy dispar, por lo que se debería seguir ampliando el estudio para comprobar estos resultados.

7. CONCLUSIONES

- En general, suplementando con LH se aumenta el número de embriones de alto poder de implantación (grado 1 y 2).
- Si se separan las pacientes según la edad materna avanzada (mayores de 38 y menores de 38 años) para descartar el posible factor ovárico, se sigue observando una mayor tendencia a obtener embriones de un alto poder de implantación al administrar FSH+LH. Además, no se ha observado ningún embrión de grado 1 en pacientes mayores de 38 años.
- No se observa un mayor número de embriones con alta tasa de implantación tras emplear FSH+LH cuando se estudian pacientes con baja reserva (número de folículos antrales < 5). Esto puede deberse a que no se ha realizado una separación por edad materna dentro de este grupo de pacientes, lo cual puede interferir en la calidad de los embriones obtenidos.
- Al analizar embriones procedentes de muestras seminales con un factor masculino severo, no se obtiene una mayor cantidad de embriones con alta tasa de implantación

tras suplementar con LH debido al gran impacto negativo en la calidad embrionaria. Sin embargo, en los casos de normozoospermia se sigue observando un mayor número de embriones de alto poder de implantación tras emplear LH.

- Para concluir, el empleo de la hormona luteinizante en los protocolos de estimulación ovárica controlada aumentaría el número de embriones con alta tasa de implantación obtenidos. Además, se ha visto que el empleo de la LH mejora sustancialmente la calidad embrionaria en ciclos con pacientes con edad materna avanzada o baja reserva, que no presentan factor masculino.

8. CONCLUSIONS.

- Generally, supplementing with LH increases the number of embryos with high implantation potential.
- When patients are separated according to advanced maternal age (over 38 and under 38) and we dismiss the possible ovarian factor, it can still be noticed a higher tendency to obtain embryos with a high ability of implantation after being FSH+LH had been administered. Furthermore, a grade 1-embryo in patients aged > 38 hasn't been noticed after stimulation only with FSH.
- When we study patients with a low ovarian reserve (fewer than five antral follicles) we cannot observe a higher number of embryos with high implantation potential after using FSH+LH. This may be due to the fact that this type of patients were not separated according to maternal age, which can lead to an interference in the quality of the embryos obtained.
- When analyzing embryos coming from semen samples with a severe male factor we don't obtain a higher number of embryos with high implantation potential after supplementing with FSH+LH. This is due to the big and negative impact on the embryo quality. Nevertheless, in cases of men with normozoospermia we can see a greater number of embryos with high implantation potential after using LH.
- In conclusion, the use of the luteinizing hormone in the controlled ovarian stimulation protocols increases the number of embryos with high implantation potential. Moreover, it has been proved that the use of LH significantly improves the embryo quality in cycles with advanced maternal age patients or with low ovarian reserve patients, whenever they don't show a severe male factor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Fertilidad. Saber más sobre: FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA. 2012. 2011:1-82.
2. Balasch J. Ageing and infertility: An overview. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(12):855-860. doi:10.3109/09513590.2010.501889
3. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. *Hum Reprod Update*. 2012;18(1):73-91. doi:10.1093/humupd/dmr039
4. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996;17(2):121-155. doi:10.1210/edrv-17-2-121
5. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Hum Reprod*. 1986;1(2):81-87. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365
6. Fortune JE. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003;78(3-4):135-163. doi:10.1016/S0378-4320(03)00088-5
7. Halpin DMG, Jones A, Fink G, Charlton HM. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *J Reprod Fertil*. 1986;77(1):287-296. doi:10.1530/jrf.0.0770287
8. Baker TG, Scrimgeour JB. Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. *J Reprod Fertil*. 1980;60(1):193-199. doi:10.1530/jrf.0.0600193
9. Kobayashi M, Nakano R, Ooshima A. Immunohistochemical localization of pituitary gonadotropins and gonadal steroids confirms the "two-cell, two-gonadotrophin" hypothesis of steroidogenesis in the human ovary. *J Endocrinol*. 1990;126(3):483-488. doi:10.1677/joe.0.1260483
10. Speroff L, H. Glass R, G. Kase N. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Sixth Edit. (Lippincott Williams & Wilkins, ed.); 1999.
11. Balasch J, Creus M, Fábregues F, 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 . *J Assist Reprod Genet*. 2001;18(5):250-256. doi:10.1023/A:1016662100572
12. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 2005;433(7023):269-277. doi:10.1038/nature03206
13. Remohí J, Pellicer A, Cobo A, Romero JL, Simón C. *Manual Práctico De Esterilidad y Reproducción Humana*. Segunda Ed.
14. Cao XW, Lin K, Li CY, Yuan CW. A review of WHO Laboratory Manual for the Examination

- and Processing of Human Semen (5th edition). *World Heal Organ*. 2011;17(12):1059-1063.
15. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1481-1489.e10. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.08.016
 16. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. *ASEBIR, Asoc para el Estud la Biol la Reprod*. 2015;3ª Edición:9-20.
 17. Mousset-Siméon N, Rives N, Masse L, Chevallier F, Mace B. Comparison of six density gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. *J Androl*. 2004;25(6):881-884. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb03157.x
 18. Lierta Sancho M, Gámez Prieto JL, Tomás Anadón L, Urries López A. *Adecuación de Los Eventos Morfocinéticos Para La Selección de Embriones de Alto Poder de Implantación En Nuestro Laboratorio*. Presentado al X Congreso de ASEBIR Cáceres; 2019.
 19. Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ, Soules MR. Reproductive aging: Accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(3):1038-1045. doi:10.1210/jc.81.3.1038
 20. Davison SL, Bell R, Donath S, Montalto JG, Davis SR. Androgen levels in adult females: Changes with age, menopause, and oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):3847-3853. doi:10.1210/jc.2005-0212

ANEXO 2

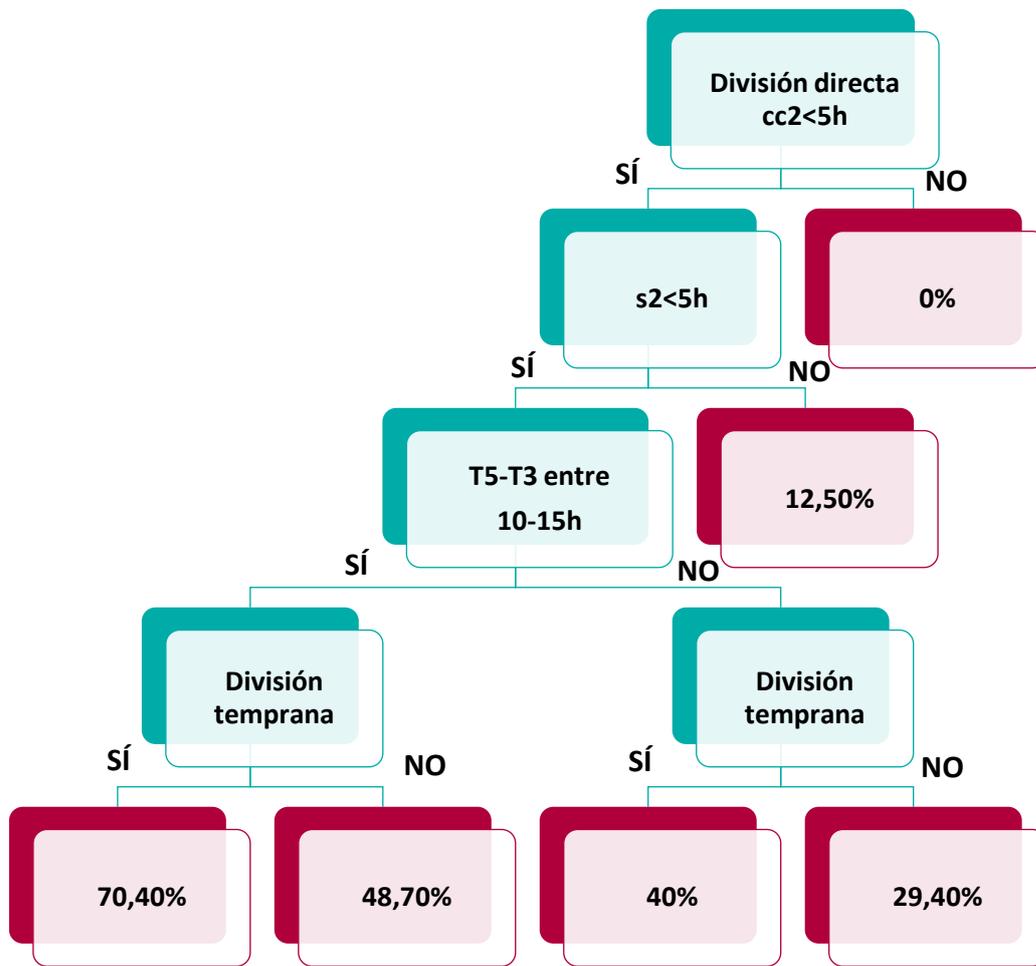


Figura 11. Algoritmo creado y validado en el laboratorio de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital QuirónSalud Zaragoza, presentado al X Congreso de ASEBIR, Cáceres 2019.