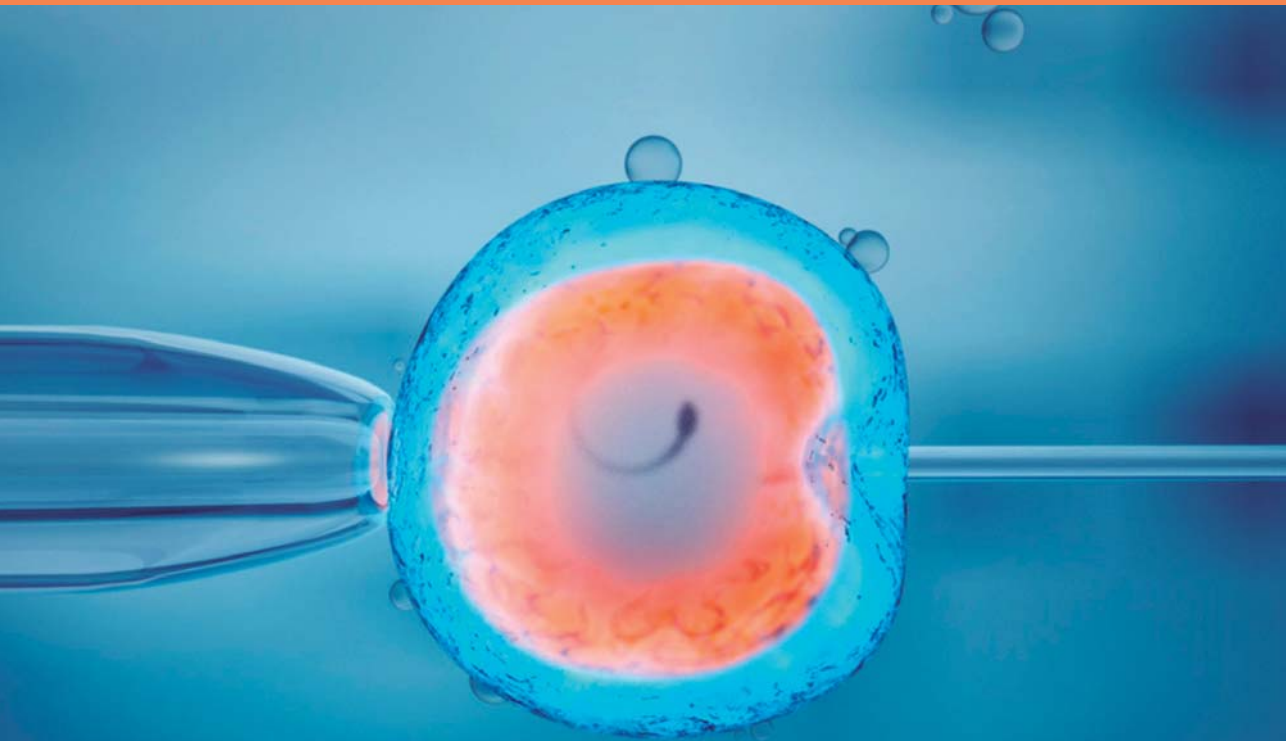


Laura Privitera

**Evaluación de los resultados obstétricos y perinatales
de recién nacidos vivos tras tratamiento de
reproducción asistida con ovocitos vitrificados**



TESIS DOCTORAL
MAYO 2017



Universitat de València
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Programa de doctorado 3042

Directores
Dr. José Remohí Giménez
Dra. Ana Cobo Cobal
Dr. Vicente Serra Serra



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

PROGRAMA DE DOCTORADO: 3042

Obstetricia y Ginecología

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y
PERINATALES DE RECIÉN NACIDOS VIVOS TRAS TRATAMIENTO
DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA CON OVOCITOS VITRIFICADOS

TESIS DOCTORAL

Directores

Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Dra. Dña. Ana Cristina Cobo Cobal

Dr. D. Vicente Serra Serra

Autora

Dña. Laura Privitera

Valencia, Mayo 2017

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor

Lugar de realización:

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Valencia

Facultad a la que está adscrita:

Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Título:

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES DE
RECIÉN NACIDOS VIVOS TRAS TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA
CON OVOCITOS VITRIFICADOS

Doctoranda:

Laura Privitera

Licenciada en Medicina por la Universidad de Roma “Tor Vergata” .

Especialista en Obstetricia y Ginecología con homologado al título español.

Directores:

Prof. Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Facultad de Medicina e Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia

Dr. Dña. Ana Cristina Cobo Cabal

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)

Prof. Dr. D. Vicente Serra Serra

Facultad de Medicina e Instituto Universitario IVI, Universidad de Valencia



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Prof. Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez, Catedrático de Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina de Valencia. Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de
Valencia, y Presidente del Instituto Valenciano de Infertilidad.

CERTIFICA QUE:

Que el trabajo titulado “Evaluación de los resultados obstétricos y perinatales de recién nacidos vivos tras tratamiento de reproducción asistida con ovocitos vitrificados”, ha sido realizado íntegramente por D^a Laura Privitera bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a .

Fdo. Prof. Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Dr. D^a. Ana Cristina Cobo Cabal, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia.

CERTIFICA QUE:

Que el trabajo titulado “Evaluación de los resultados obstétricos y perinatales de recién nacidos vivos tras tratamiento de reproducción asistida con ovocitos vitrificados”, ha sido realizado íntegramente por D^a Laura Privitera bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis

Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a

Fdo. Dr. D^a Ana Cristina Cobo Cabal



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Prof. Dr. D. Vicente Serra Serra, Catedrático de Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina de Valencia. Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia.

CERTIFICA QUE:

Que el trabajo titulado “Evaluación de los resultados obstétricos y perinatales de recién nacidos vivos tras tratamiento de reproducción asistida con ovocitos vitrificados”, ha sido realizado íntegramente por D^a Laura Privitera bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a .

Fdo. Prof. Dr. D. Vicente Serra Serra

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer al Profesor Doctor D. José Remohí Giménez por permitirme rerealizar esta tesis, por su apoyo, su profesionalidad, su carisma y su gran interés científico.

a la Dra. Ana Cobo, por su profesionalidad y su apoyo en la planificación del proyecto de esta tesis.

al Profesor Doctor D. Vicente Serra por ayudarme en la realización de esta tesis en el Instituto Valenciano de Infertilidad y por su profesionalidad y sus conocimientos.

Agradezco las enseñanzas de mis compañeros ginecólogos del IVI, por ser ejemplo de trabajo, de responsabilidad y una alta calidad profesional y humana y científica. En particular a Víctor Hugo Gómez por haberme facilitado sus trabajos y estudios.

Agradezco a todos los profesionales del IVI, porque también han aportado una parte a este trabajo y que son tantos que me es imposible nombrarlos a cada uno de ellos.

Agradezco mi compañera y amiga Ana María Sánchez García por su ayuda y su apoyo en la redacción de esta tesis

Agradezco a mi hermano Paolo por la ayuda durante estos años.

Dedico este trabajo

A mi esposo, Stefano, por todo su apoyo, por cuidarme tanto y por tanto amor.

A mis dos niños Simone y Alessandro, porque de vosotros he aprendido a amar y a ser muy feliz.

A mis Padres y a mi hermano Paolo.

A todos mis amigos, profesores, compañeros de trabajo en Italia del Hospital San Raffaele y personas que han estado presentes en algún momento de mi vida y de los cuales guardo un gran respeto y cariño. En particular el prof M. Candiani, el Dr. E. Papaleo y la Dr.a P. Viganò por haberme apoyado en concluir este proyecto.

Y a todas las pacientes que desean y anhelan ser madres.

A microscopic view of several cells, likely oocytes, against a blue background. The cells are spherical and have a textured, granular surface. One cell in the center is larger and more prominent than the others.

Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 ESTUDIO DE LA PAREJA INFÉRIL	19
1.2 PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVARICA	21
1.2.1 Análogos de la hormona liberadora de Gonadotropinas	21
1.2.2 Pretratamiento con estrógenos o progestágenos	27
1.2.3 Anticonceptivos orales	27
1.2.4 Desencadentes de la ovulación	27
1.2.5 Estimulación ovárica en mujeres donantes	28
1.2.6 Captación ovocitaria	29
1.3 TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)	31
1.3.1 Fecundación en vitro	32
1.3.2 Cúltivo embrionario	33
1.3.3 Transferencia embrionaria	33
1.3.4 Donación de ovocitos	34
1.3.4.1 Pacientes sin función ovárica	35
1.3.4.2 Pacientes con función ovárica	46
1.3.4.3 Receptora de TRA de DO	50
1.3.4.4 Resultados del programa de DO	53
1.4.- CRIOPRESERVACIÓN	57

ÍNDICE

1.4.1 Problemas asociados a la criopreservación	57
1.4.2 Estrategias de criopreservación	59
1.5. - CRIOPRESERVACIÓN OVOCITARIA	61
1.5.1 Efecto de la congelación de los ovocitos	62
1.5.2 Principales métodos de congelación ovocitaria	63
1.5.2.1 Protocolo de congelación lenta para ovocitos	63
1.5.2.2 Protocolo de vitrificación	64
1.5.3 Experiencia clínica	65
1.6 - COMPLICACIONES OBSTETRICAS DE LOS EMBARAZOS TRAS TRA	68
1.6.1 Hipertensión durante el embarazo	69
1.6.2 Diabetes Gestacional	71
1.6.3 Patología placentaria: Desprendimiento prematuro de la placenta (DPPNI) y placenta previa.	71
1.6.4 Rotura Prematura de membrana pretermino (RPM)	72
1.6.5 Amenaza de parto pretérmino	72
1.6.6 Embarazo múltiple	75
1.6.7 Otras complicaciones obstétricas	76
1.6.8 Malformaciones congénitas en tratamientos de reproducción asistida.	77
1.6.8.1 La técnica de reproducción asistida	81
1.6.8.2 La propia infertilidad	82
1.6.8.3. El tratamiento de la infertilidad	82
2. JUSTIFICACIÓN	83
3. OBJETIVOS	89
4. PACIENTES Y MÉTODO	91
4.1 PACIENTES	92
4.2 MÉTODOS	95
Anexo 1 Encuesta evaluación obstétrica y perinatal	95
5. RESULTADOS	101
5.1 CARACTERÍSTICAS BASALES	101

5.2 RESULTADOS OBSTÉTRICOS	107
5.2.1 Resultados obstétricos de embarazos únicos con ovocitos propios	107
5.2.2 Resultados obstétricos de embarazos únicos con ovocitos donados	108
5.2.3 Resultados obstétricos de embarazos múltiples con ovocitos propios	110
5.2.4 Resultados obstétricos de embarazos múltiples con ovocitos donados	111
5.2.5 Resultados obstétricos globales	112
5.3 RESULTADOS PERINATALES	117
5.3.1 Resultados perinatales de embarazos únicos con ovocitos propios	117
5.3.2 Resultados perinatales de embarazos únicos con ovocitos donados	119
5.3.3 Resultados perinatales de embarazos múltiples con ovocitos propios	120
5.3.4 Resultados perinatales de embarazos múltiples con ovocitos donados	121
5.3.5 Resultados perinatales globales	122
6. DISCUSIÓN	127
6.1 CONSIDERACIONES GENERALES	128
6.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA VITRIFICACIÓN OVOCITARIA E INFLUENCIA SOBRE LOS RESULTADOS DE TRA	132
6.3 INFLUENCIA DE LA OVODONACIÓN Y DE LA VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA EN LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES	136
6.4 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE LA VITRIFICACIÓN OVOCITARIA	140
6.4.1- Abortos y ectópicos	140
6.4.2- Anomalías congénitas y técnicas invasivas	140
6.4.3- Trastornos hipertensivos	141
6.4.4- Hemorragia obstétricas	143
6.4.5- Diabetes gestacional	144
6.4.6- Otras complicaciones gestacionales	145
6.4.7- Vía del parto	147
6.4.8- Resultados neonatales	147
7. CONCLUSIONES	149
8. BIBLIOGRAFÍA	151

A microscopic view of various cells, including a large central cell with a prominent nucleus and several smaller cells, set against a blue background.

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aGnRH	Análogos de la hormona liberadora del GnRH
aOR	Ajuste de OR
DG	Diabetes gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Donación de ovocitos
DPPNI	Desprendimiento de placenta normoinserta
E2	Estradiol
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica
EG	Etilenglicol
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
FIV	Fertilización en vitro
FOP	Fallo Ovárico prematuro
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GIFT	Transferencia tubárica de gametos
GnRH	Regulador Hipotalámico de las gonadotrofinas
HCG	Gonadotropina coriónica humana
HELLP	<i>Hemolytic anemia Elevated Liver enzyme Low Platelet count</i>
HMG	Gonadotropina menopáusica humana
HTG	Hipertensión gestacional
IAC	Inseminación artificial conyugal

ABREVIATURAS

IAD	Inseminación artificial de donante
IC	Intervalo de confianza
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de masa corporal
IVI	Instituto Valenciano de Infertilidad
LH	Hormone Lúteo estimulante
MBPN	Muy bajo peso al nacer
MVC	Mínimo volumen celular
MMP-1	Procolagenasa
MMP-3	Protomielina
MVC	Mínimo volumen celular
OR	Odd ratio
P4	Progesterona
PCO	Ovario Poliquístico
PE	Preeclampsia
PRHO	Propanediol
RA	Reproducción asistida
RCIU	Retraso de crecimiento intrauterino
RFA	Recuento folículos antrales
RPM	Rotura prematura de membranas
RR	Riesgo relativo
SEF	Sociedad Española de fertilidad
SET	Trasferencia de singulo embrión
SEGO	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
TE	Trasferencia embrionaria
TMG	Tamaño mínimo gota
TRA	Técnicas de Reproducción asistida
VE	Valerianato de Estradiol

1

1.1 ESTUDIO DE LA PAREJA ESTÉRIL

La imposibilidad de concebir tras un año de relaciones sexuales frecuentes y no protegidas debe ser motivo para iniciar un estudio de la pareja. Sin embargo, existen distintos factores asociados que podrían ser indicativos de iniciar a los 6 meses el estudio, como por ejemplo en la mujer una edad >35 años, amenorreas, oligomenorreas >6 meses, enfermedades de transmisión sexual (ETS), enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), cirugía abdomino-pélvica, patología uterina, tubárica u ovárica y en el hombre, patología o cirugía urogenital previa, ETS, varicocele sintomático y enfermedades sistémicas entre otras.

El estudio básico de esterilidad se debe iniciar con una completa anamnesis y exploración física y ginecológica, junto con la realización de algunas pruebas diagnósticas; como por ejemplo la ecografía transvaginal, la analítica hormonal en estado basal, el estudio de la permeabilidad tubárica y en el varón el estudio básico de la esterilidad es el seminograma. Todo con la finalidad de encontrar causas capaces de producir esterilidad. Aunque existe un

INTRODUCCIÓN

grupo de parejas en las que a pesar de un estudio exhaustivo, no se encuentra ninguna causa que explique el problema de esterilidad, (10-15 % de casos).

Las causas capaces de producir esterilidad o infertilidad son muy numerosas y complejas, tratándose en general de la suma de varios factores existentes en ambos cónyuges. Por lo que es recomendable que los dos componentes de la pareja deban acudir a la primera visita puesto que así podrán proporcionar la información precisa durante la anamnesis sobre sus antecedentes. Pese a que los resultados de los estudios son variables se atribuye al varón en un 30% de los casos aproximadamente, un 30-40% el origen sería tubárico y peritoneal (Hammadiéh *et al.* 2008) (Speroff L. 2006), menos de un 5% al factor cervical (Quaas *et al.* 2008), entre el 15 y 38% de todos los casos a causas anatómicas u otras patologías endocrinas; la anovulación por sí sola alcanza el 18% de las causas.

Sin duda el factor más importante es la edad de la mujer, que cada vez pospone más la maternidad por motivos profesionales, produciéndose con el paso del tiempo un reducción cuantitativa y cualitativa de los ovocitos que se pone de manifiesto no solo por un descenso en la fecundidad (a partir de los 35 años, lo que se acentúa más a partir de los 40 años), sino también por el aumento de la tasa de abortos ocasionados por el incremento de aneuploidías o cromosomopatías.

1.2 PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVARIACA

La hiperestimulación ovárica controlada para el desarrollo folicular múltiple, es la primera etapa que garantiza la recogida de al menos un ovocito fecundable, es decir, de un ovocito que haya terminado las distintas fases de su maduración citoplásmica y nuclear. Existen diversos protocolos de estimulación ovárica cuyas estrategias utilizadas deben de ser la de producir embriones con excelentes tasas de implantación, al mismo tiempo que reducir al mínimo la incidencia de complicaciones médicas relacionadas con el procedimiento.

La estimulación está diseñada para proporcionar un aumento de la concentración de gonadotropinas circulantes en la fase folicular temprana, lo que permite el reclutamiento de múltiples folículos antes de que se produzca la selección endógena del folículo dominante y la consecuente atresia del resto de la cohorte folicular. El aumento de las gonadotropinas sobrepasa los mecanismos de control naturales, lo que proporciona un impulso para el desarrollo multifolicular. El control de este desarrollo se “afina” ajustando la cantidad de tiempo de exposición y las dosis de gonadotropinas.

1.2.1 ANÁLOGOS DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS.

Los análogos son péptidos sintéticos que han experimentado modificaciones estructurales para alterar la afinidad por el receptor de la GnRH. Su uso durante la estimulación ovárica para la FIV, no sólo evita el pico prematuro de LH sino también produce un incremento de las posibilidades de embarazo, al aumentar el número de ovocitos recuperados y fecundados, y con ello el número de embriones disponibles para transferir.

Se clasifican en agonistas y antagonistas y estos presentan diferencias muy relevantes en su mecanismo de acción **Figura 1**.

ANÁLOGOS AGONISTAS DE LA GnRH La administración continua de a-GnRH produce inicialmente una estimulación de la secreción de gonadotropinas endógenas. Este efecto *flare-up* o llamarada, de liberación de una gran cantidad de gonadotropinas, FSH y LH, induce una *up regulation* de los receptores. Su uso de forma mantenida determina una internalización

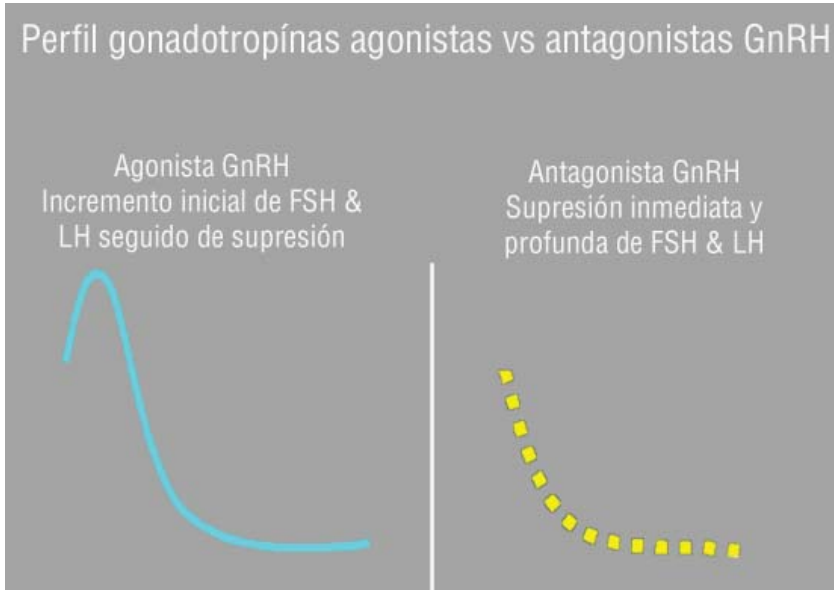


Figura 1. Perfil gonadotropinas agonistas vs antagonistas GnRH

del complejo receptor-molécula GnRH y una *down regulation* de los receptores, al cabo de aproximadamente una semana. Este efecto supresor producido por la desensibilización hipofisaria, es el resultado de la administración continua no pulsátil. Son más potentes que la GnRH endógena al presentar mayor afinidad que esta por su receptor hipofisario y realizar con este una unión más duradera. En función del momento en que se administre el agonista y de la duración de éste, se distinguen diferentes protocolos.

Protocolo largo de *a-GnRH*: Debe iniciarse en fase lútea media del ciclo previo y actuar un mínimo de 7 días antes de producir la desensibilización hipofisaria y poder iniciar la estimulación. **Fig 2.**

Tras 5 días de estimulación, se inicia la monitorización de la respuesta mediante determinaciones hormonales y ecografía transvaginal, y se ajusta la dosis de gonadotropinas en consecuencia. El agonista se mantiene hasta el momento de la descarga ovulatoria. Este protocolo se caracteriza por producir una inhibición profunda de la liberación endógena de gonadotropinas durante la fase folicular precoz, lo que permite un crecimiento folicular coordinado y homogéneo y una maduración folicular simultánea en respuesta a

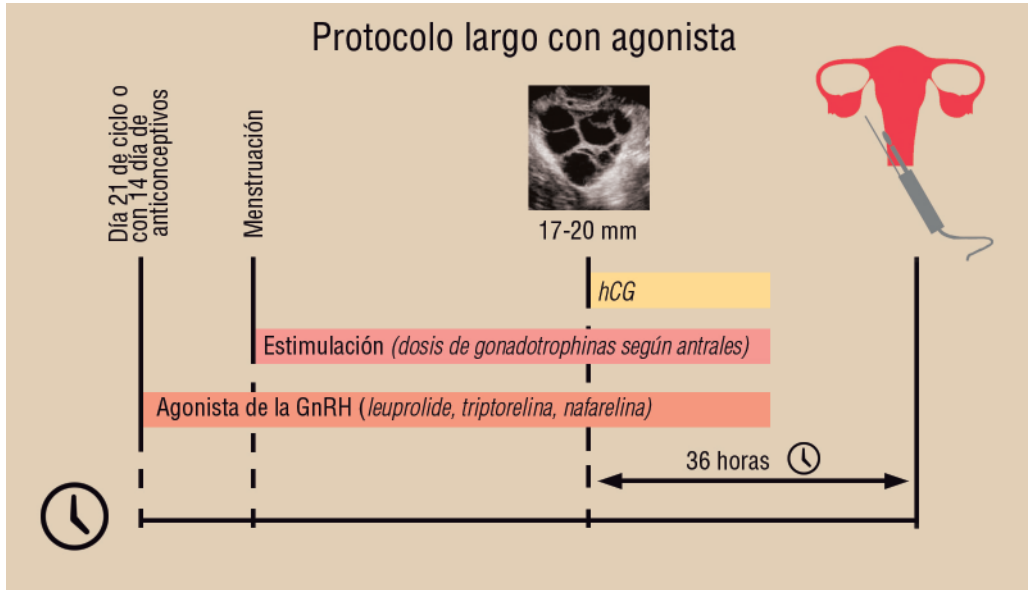


Figura 2. Protocolo de estimulación a-GnRH.

la administración de gonadotropinas exógenas. Esto se relaciona con un incremento en el número de folículos maduros y de ovocitos recuperados. Pero también en la duración del tratamiento y en el consumo de gonadotropinas.

Una de las ventajas del protocolo largo es que permite cierta flexibilidad en cuanto a programación se refiere, ya que la estimulación ovárica se puede iniciar de manera arbitraria una vez que se haya conseguido la supresión hipofisaria.

Protocolo corto (flare): La administración del agonista de la GnRH se inicia el primer día de menstruación, en lugar de en mitad de la fase lútea del ciclo previo, con la dosis habitual de 0,1 mg/día. El inicio de la administración del agonista puede ser del primer al tercer día del ciclo menstrual seguido inmediatamente de la administración de gonadotropinas exógenas. Las gonadotropinas pueden ser iniciadas simultáneamente o 1 o 2 días después del inicio del agonista, momento en el cual la dosis de agonista puede reducirse a la mitad.

Este tipo de protocolo evita la supresión ovárica excesiva que se produce en el protocolo largo y aprovecha el efecto *flare up* ejercido por el agonista, que se suma al de las gonadotropinas, por lo que su empleo se centra en la estimulación ovárica en la baja respondedora.

Protocolo corto (microflare): En este protocolo se inician las microdosis de agonista el primer o segundo día del ciclo (igual que el protocolo *flare* convencional) o el segundo o tercer día después de haber finalizado los anticonceptivos. Se han utilizado diferentes variantes en cuanto al momento de inicio del agonista de la GnRH y la dosis del mismo. Este tipo de protocolo independientemente de la variedad utilizada ha demostrado ser más efectivo en la paciente baja respondedora, por poseer una menor tasa de cancelación que el protocolo con agonistas y que el protocolo largo, pero la tasa de embarazo no ha sido significativamente más alta.

ANÁLOGOS ANTAGONISTAS DE LA GnRH (ant-GnRH)

Los ant-GnRH se caracterizan por bloquear de forma competitiva los receptores de la GnRH. Producen, en un periodo de 8 horas, una inhibición profunda e inmediata de la secreción de gonadotropinas (la inhibición de LH es más profunda que la de FSH), evitando así el efecto *flare-up*. Presenta varias ventajas en relación con el clásico protocolo largo de a-GnRH (Olivennes *et al.* 2002):

- Menor duración del tratamiento
- Menor consumo de gonadotropinas
- Mejor tolerancia por parte de la paciente
- Menor coste
- Menor riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica
- Ausencia de la sintomatología derivada de la privación estrogénica
- Posibilidad de evaluar la reserva ovárica inmediatamente antes de la hiperestimulación ovárica para conocer la cohorte de folículos potencialmente estimulables.

A pesar de estas ventajas, los ant-GnRH aún no han desplazado a los agonistas, probablemente porque se observa una tendencia a una menor tasa de embarazo en comparación con el protocolo largo y a la dependencia del ciclo menstrual. No obstante, los datos relacionados con las tasas de embarazo al comparar los dos tipos de análogos son discordantes. En el estudio de meta-análisis de Kolibianakis *et al.* (2006), donde compararon ambos tipos de análogos, no se constataron diferencias significativas en las tasas de embarazo en función del tipo de análogo utilizado.

Los tipos de protocolo de antagonistas de la GnRH empiezan la estimulación con gonadotropinas desde el segundo día del ciclo hasta el sexto. A partir del séptimo día del ciclo (día 6 de estimulación) se inicia la monitorización de la respuesta mediante determinaciones hormonales y ecografía transvaginal, y se ajusta la dosis de gonadotropinas en consecuencia. En función del momento de inicio del antagonista y de la duración de éste, diferenciamos los siguientes tipos de protocolos:

Protocolo de dosis única: Consiste en la administración de una única dosis de antagonista de la GnRH de 3 mg, cuando el foliculo mayor ha alcanzado 14 mm de diámetro (generalmente en el séptimo día del ciclo). Si trascurridas 72 horas no se ha administrado la hCG, se administra una segunda inyección de antagonista. **Fig 3.**

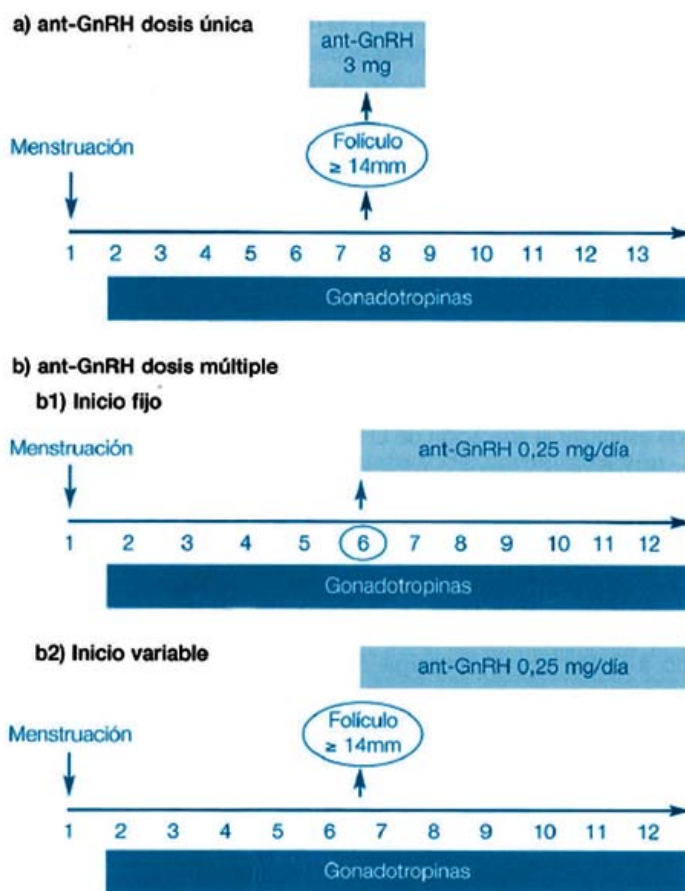


Figura 3. Protocolos de estimulación con ant-GnRH

Protocolo de dosis múltiple: El ant-GnRH se administra a una dosis de 0,25 mg al día, ya que es la mínima dosis eficaz/segura, a partir del sexto día de estimulación (protocolo fijo) o a partir de la detección en la ecografía de al menos un folículo de 14mm o más (protocolo flexible), hasta el día de la descarga ovulatoria. Según este último criterio, casi el 50% de las pacientes empezarán con el antagonista más allá del sexto día de estimulación, lo que reduce la duración del tratamiento. **Fig 4.**

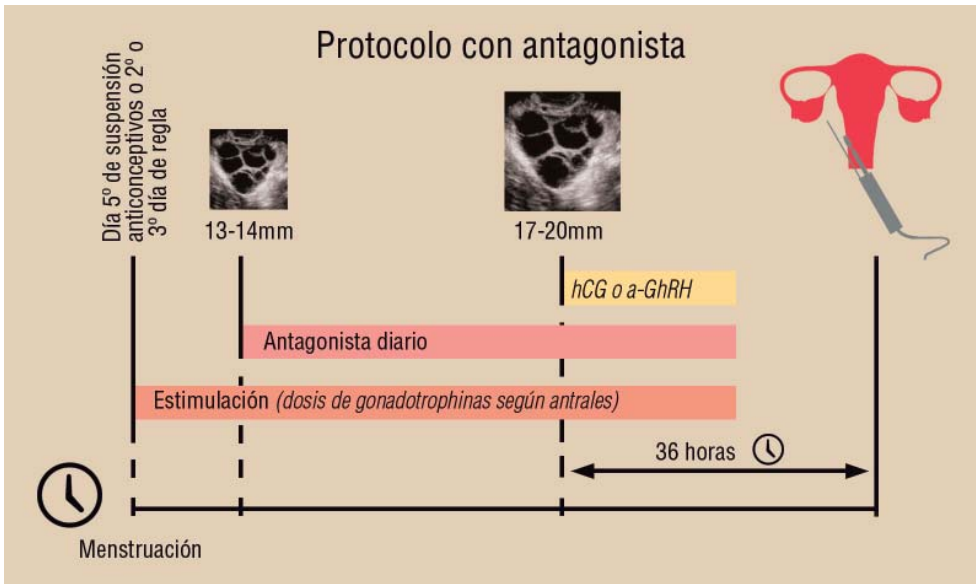


Figura 4. Protocolo con ant- GnRH dosis múltiple

En un meta-análisis realizado por (Al-Inany *et al.*, 2005) Al-Inany et al., donde se compara el protocolo fijo frente a flexible, se observa una tendencia hacia mayores tasas de embarazo con el protocolo fijo, pero las diferencias no son estadísticamente significativas.

Sin duda en el momento actual el mejor protocolo utilizado en las donantes de ovocitos es con antagonistas de la GnRH e inducción final de la ovulación con análogos agonistas de la GnRH, es el que más se adapta a dichas exigencias.

1.2.2 PRETRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS O PROGESTÁGENOS.

En las pacientes sometidas a estimulación ovárica para fecundación *in vitro*, a veces puede ser útil en el protocolo con antagonista, la toma de estrógenos, por ejemplo, valeranato de estradiol (Progynova ®) 4 mg diarios desde el día 24-25 del ciclo anterior a la estimulación hasta la regla, permitiendo empezar la estimulación entre el día 1-5 del ciclo (Fanchin *et al.*, 2003). Mismo efecto tiene el uso de progestágenos (noretisterona acetato cp 10 mg) (Primolut Nor ®) desde el día 17-18 del ciclo anterior a la estimulación, hasta el momento supuesto de la regla (Smulders *et al.*, 2010).

1.2.3. ANTICONCEPTIVOS ORALES

Los anticonceptivos permiten programar los ciclos de tratamiento y mejoran la asincronía folicular, pero su uso se asocia con un incremento en la duración del tratamiento y en el consumo de gonadotropinas. En un meta-análisis realizado por Griesinger (Griesinger *et al.*, 2007) no se observaron diferencias significativas en las tasas de embarazo evolutivo al comparar ciclos de antagonistas con tratamiento previo con anticonceptivos orales y sin él. Sin embargo, algunos autores describen un incremento en la tasa de abortos precoces en el grupo con anticonceptivos en el ciclo previo (Kolibianakis *et al.*, 2006; Smulders *et al.*, 2010)

1.2.4. DESENCADENANTES DE LA OVULACIÓN

Descarga ovulatoria con gonadotropina coriónica humana: Las ventajas del uso de este tipo de fármaco es que se determina con facilidad en el momento de la punción folicular (35-36 h) y ofrece un soporte de la fase lútea. Como inconveniente la posibilidad del riesgo del síndrome de hiperestimulación. Existen dos presentaciones diferentes: la hCG urinaria (hCG lepori ®) (Angelini Farmaceutica Madrid España) y la rHCG (Ovitrelle ®) (Merck Serono Madrid España).

Descarga ovulatoria con a-GnRH. Una de las ventajas de los ciclos con ant-GnRH es la posibilidad de realizar la descarga ovulatoria con a-GnRH en lugar de con hCG,

en casos de riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Los a-GnRH son capaces de estimular la liberación de LH a la vez que minimizan o eliminan el riesgo de hiperestimulación ovárica (Humaidan *et al.*, 2005). Por ello, aunque hay estudios que describen tasas de embarazo significativamente menores que cuando la descarga se realiza con hCG, es una estrategia válida en pacientes con riesgo de desarrollar un SHO. Esta afirmación adquiere más relevancia, sobre todo después de que algunos autores demostraran que con un correcto tratamiento de la fase lútea, utilizando a-GnRH como descarga ovulatoria, la tasa de embarazo es equiparable a la obtenida cuando la descarga se realiza con hCG.

Descarga ovulatoria con LH recombinante: mucho menos utilizada en clínica debido a que la formulación actual de rLH (75 UI) (Luveris®) (Merck Serono Madrid España) no permite el uso en la práctica clínica. Como ventaja podemos concluir que la vida media es más corta que la hCG por lo que podría reducir el riesgo de hiperestimulación

1.2.5. ESTIMULACIÓN OVARICA EN MUJERES DONANTES

La elección del protocolo de estimulación ideal para la población de las mujeres donantes de óvulos, debe ser eficaz, seguro, sencillo, cómodo y corto buscando siempre conseguir aumentar el número de ovocitos recuperados fecundados y/o fecundables, y con ello el número de embriones de buena calidad disponibles para transferir. Todo esto basado fundamentalmente en la reserva ovárica de la paciente, índice de masa corporal y la respuesta a ciclos previos para así optimizar la elección del mejor protocolo de estimulación, establecer la dosis inicial de gonadotropinas y seleccionar de manera más fiable a las candidatas para donación de ovocitos.

Se ha demostrado que el recuento de folículos antrales es un medidor útil de la reserva ovárica, que nos permite predecir la respuesta ovárica y estimar el riesgo de cancelación del ciclo, así no lo describe un estudio publicado por Melo (Melo *et al.*, 2009) basándose en el recuento de folículos antrales (RFA) previo a la estimulación en donantes de ovocitos, observa que con un número inferior a 5 folículos antrales en cada ovario, el riesgo de una cancelación previa a punción es cercana al 40%, mientras que si el RFA se sitúa en torno a 7-8 folículos antrales en cada ovario, el riesgo de cancelación baja a un 9-13%.

Inicialmente el protocolo de estimulación más ampliamente utilizado ha sido el ciclo largo a mitad dosis con agonistas de la GnRH, ya que con este protocolo se han obtenido buenos resultados en lo que concierne a las tasas de gestación y de implantación. En los ciclos con agonistas de la GnRH, al sólo poder inducir la ovulación con hGC, existe más riesgo de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) y esto es fundamental en el caso de las donantes. La introducción del uso de los antagonistas ha permitido buscar alternativas para desencadenar la ovulación y evitar así el SHO.

Otra característica a tener en cuenta es que en la mayoría de los casos se intenta que las donantes tomen anticonceptivos en el ciclo previo al tratamiento, ya que permite una mejor organización de la estimulación. El protocolo a utilizar dependerá del número de antrales y si la donante ha realizado un ciclo con anterioridad.

En los ciclos con antagonistas el protocolo es de dosis múltiple y el antagonista se añade cuando el tamaño del folículo de mayor tamaño alcance los 13-14 mm de diámetro medio. En aquellas donantes con agonistas y con riesgo de SHO (>20-30 folículos de >20mm o con niveles de estradiol ≥ 3.500 pg/ml) se inician medidas profilácticas el día de la hCG.

1.2.6. CAPTACIÓN OVOCITARIA

La aspiración de los ovocitos se realiza por punción a través de la vagina, que al día de hoy se considera la técnica de elección debido a su simplicidad y efectividad, además de ser infrecuentes sus complicaciones (0,4-1%). Incluso en condiciones adversas, como la obesidad de la paciente, los ovarios pueden ser visualizados fácilmente.

- La aspiración a través de la vagina ofrece, otra serie de ventajas:
- La distancia hasta los folículos es corta, lo que facilita su localización.
- No se producen daños en la piel.
- No requiere hospitalización.
- Se necesita poco personal para llevarla a cabo.
- El aprendizaje es rápido y relativamente sencillo.
- Es posible incluso cuando hay adherencias pélvicas importantes.
- Es menos costosa que otras técnicas.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de la punción folicular es la recogida de la mayor cantidad posible de ovocitos fecundables que hayan completado el proceso de maduración nuclear y citoplásmica in vivo antes de que los folículos se rompan.

El momento de la recogida se establece con gran precisión: la maduración acaba a las 25 a 30 horas después de la elevación preovulatoria del pico de LH (o de la inyección de hCG) y la rotura folicular ocurre, por término medio, 37 horas después de hCG).

1.3.- TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)

Se engloban en este concepto una serie de métodos que sustituyen o complementan el contacto sexual de la pareja con la finalidad de facilitar la reproducción. Durante los últimos años las técnicas que se han conocido como de Reproducción Asistida o TRA han adquirido un gran desarrollo, en los países desarrollados, representan entre un 1% y un 4% de todos los embarazos. Estos procedimientos combinan la estimulación ovárica para conseguir un desarrollo folicular múltiple con la preparación y capacitación del semen en el laboratorio para depositarlo posteriormente en el interior de la cavidad uterina (inseminación artificial conyugal (IAC) o de donante (IAD) o cultivarlo con ovocitos en el laboratorio para obtener embriones que serán finalmente transferidos a la cavidad uterina (Fecundación In Vitro. FIV).

Según el registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en el 2011, se realizaron 30.800 ciclos de inseminación artificial, siendo 24.013 (78%) de IAC y 6.787 (22%) de IAD y 70.030 ciclos de Fecundación in Vitro y microinyección espermática. El procedimiento más frecuente fue el correspondiente a embriones FIV/ICSI (el 52,5% de los ciclos).

Los datos sobre la fertilidad de la especie humana provenían inicialmente de los censos de población y/o encuestas comunitarias, de datos de parejas que suspendían su método anticonceptivo o de datos históricos de comunidades cerradas. Desde hace unos cuantos años, la SEF está realizando un seguimiento de los Tratamientos de Reproducción Asistida realizados en España elaborando un registro SEF anual. En la elaboración de este registro intervienen tanto los centros públicos como los privados, y se pretende elaborar una radiografía de los problemas de reproducción en el momento actual. Según datos publicados, correspondientes al Registro SEF 2014, España se sitúa a la cabeza de tratamientos de reproducción asistida en Europa, con un total de 116.688 ciclos iniciados, con un 44,2% (51.591 ciclos) FIV/ICSI con ovocitos propios. El número de ciclos de donantes iniciados fue de 16.630. No obstante, no todas las clínicas de reproducción colaboran en la elaboración del registro SEF, pero en este último registro han participado 278 centros de fertilidad, un 70 % más que el registro anterior.

1.3.1 FECUNDACIÓN EN VITRO (FIV)

La fecundación de ovocitos humanos en el laboratorio y la posterior transferencia de los embriones al útero materno, es decir la fecundación *in vitro* consiste en realizar fuera del organismo el mismo proceso que en condiciones normales tiene lugar en la trompa uterina la captación del ovocito maduro por la ampolla tubárica, el transporte de los espermatozoides hasta el lugar donde ha de producirse la fecundación (en general, la ampolla tubárica, lugar donde acaba su capacitación), la fecundación y el transporte del huevo hasta la cavidad uterina, donde tendrá lugar la implantación, todo ello garantizando la condiciones necesarias para que ocurran las primeras segmentaciones del embrión.

Por tanto, es normal que la primera indicación terapéutica de la fecundación *in vitro* sea la insuficiencia funcional de las trompas de Falopio o la ausencia de trompas. Más tarde, la evolución de las técnicas ha permitido aplicar también la fecundación *in vitro* a los casos más graves de esterilidad masculina, mediante la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI).

Tras el primer nacimiento de un niño sometido a tratamiento FIV (año 1978), el número de niños nacidos en todo el mundo como resultado del FIV/ICSI, ya alcanza los 5 millones. Los procedimientos clínicos y de laboratorio han sido mejorados constantemente y hoy en día se informa de alrededor del 30% de la transferencia de las tasas de embarazo (Andersen *et al.* 2007). Por lo tanto, el FIV/ICSI es un método importante para corregir los índices demográficos desfavorables pese al coste asociado, que es tan alto como lo que gasta una familia durante un trimestre anual en algunos países. En unos casos donde la respuesta a la estimulación ovárica no permitía recuperar un número elevado de ovocitos, se intentó acumular ovocitos de diferentes estimulaciones para alcanzar un número mínimo-suficiente para hacer un tratamiento de fecundación *in vitro* con un pronóstico más favorable, esta herramienta se aplica en paciente con reserva ovárica reducida.

Existen dos métodos:

Inseminación (FIV) ó unión de un espermatozoide con un ovocito fuera del aparato reproductor femenino. Consiste en la unión de una determinada concentración de

espermatozoides con los ovocitos recuperados, dejando que el proceso de la fecundación ocurra de igual forma que la fecundación *in vivo*. Se considera que un ovocito está fecundado normalmente cuando, transcurrido entre 17 y 20 horas después de la inseminación, se observa la presencia de dos pronúcleos juntos y 2 corpúsculos polares.

ICSI o Inyección Intracitoplasmática: Procedimiento utilizado para facilitar la fecundación, sólo se necesita un espermatozoide móvil por ovocito que se microinyecta, cuando el semen no presenta las características adecuadas, es decir semen con baja movilidad o con bajo recuento o presenta una disminución en el número de espermatozoides con morfología normal, etc. o hay pocos ovocitos recuperados, es entonces cuando está indicado la realización de ICSI.

1.3.2 CULTIVO EMBRIONARIO

Hasta el momento de la transferencia al útero materno 3-5 días, el embrión o los embriones permanecen en cultivo, siguiendo su desarrollo y siendo evaluados por el embriólogo. La selección de los embriones para su transferencia se basa en criterios morfológicos, fundamentalmente número de células, simetría de las mismas y el porcentaje de fragmentación y de otros parámetros complementarios en el caso de que el cultivo se realice en una incubadora *time lapse*, como la velocidad de división celular del embrión en los primeros días.

1.3.3 TRANSFERENCIA EMBRIONARIA (TE).

La transferencia embrionaria (TE) es el proceso mediante el cual depositamos en la paciente los embriones generados en el laboratorio de FIV. Con ello culmina y finaliza el proceso.

El Grupo de Interés de salud Embrionaria y Prevención de la Gestación múltiple de la SEF (Sociedad Española de Fertilidad) emitió en 2007 recomendaciones sobre la política de transferencia embrionaria adecuada para la prevención de la gestación múltiple derivada de FIV-TE (Matorras 2007). Estas recomendaciones constituyen la referencia más común en nuestro país a la hora de sustentar las recomendaciones clínicas destinadas a asesorar a los

pacientes en la toma de decisiones, dichas recomendaciones permiten aconsejar la transferencia de un embrión único a pacientes menores de 37 años.

1.3.4 DONACIÓN DE OVOCITOS (DO)

La donación de ovocitos es la técnica de reproducción asistida en la cual el gameto femenino es aportado por una mujer distinta de la que recibirá éste o el embrión resultante. Es un tratamiento de la medicina de reproducción con la tasa más elevada de éxito que permite poder lograr un embarazo en esas mujeres que han fallado con los tratamientos homólogos de fecundación *in vitro* o que por condiciones fisiológicas no pueden ser sometidas a este tipo de tratamiento.

Desde la descripción de la primera gestación obtenida mediante esta técnica por el equipo australiano de Trounson y Wood en 1983 (Trounson *et al.* 1983) y la primera gestación a término en 1984 por Lutjen *et al.*, En 1987 Yovich y cols. (Yovich *et al.* 1987) introducen con éxito la transferencia tubárica de cigotos en donación de ovocitos y en 1988 Balmaceda y cols. la transferencia tubárica de gametos (GIFT) (Balmaceda *et al.* 1988). El mismo año fue también publicado el primer embarazo con criopreservados (Abdalla *et al.* 1988). Desde 1984 hasta nuestros días esta técnica no ha hecho más que crecer y mejorar sus resultados a través de los años, debido en gran medida, a una mejora considerable en las condiciones del laboratorio, lo que ha redundado en un incremento en la calidad embrionaria, hasta el día de hoy es la técnica de reproducción asistida con mejores resultados, de forma que es la que mayor tasa de recién nacido vivo presenta de todas las técnicas, esta nos permite conseguir una gestación en cualquier mujer independientemente de su edad, de la ausencia de ovarios o del funcionamiento de éstos. En la actualidad en España la donación de ovocitos representa aproximadamente el 14% de todos los ciclos de TRA (Registro de la sociedad española de fertilidad. Disponible en <http://www.registrosef.com>). Su uso se ha incrementado por los cambios sociológicos que han provocado el inicio de la maternidad a edades donde la mujer es menos fértil y que se reduzca el número de gestaciones por mujer. Este hecho hace que cada vez tengamos en los centros de reproducción a mujeres de mayor edad que buscan una solución para lograr la maternidad, y es también más frecuente que deban recurrir a

las técnicas de donación de óvulos como única solución a su problema. Podemos encontrar pacientes con o sin función ovárica mantenida.

1.3.4.1 Pacientes con ausencia de función ovárica:

Si excluimos la menopausia fisiológica, las pacientes con fallo ovárico prematuro, se caracterizan por amenorrea hipergonadótropa, primaria o secundaria antes de los 40-45 años (Jones GS y De Moraes-Rhuesen 1969). Según su etiología podemos clasificarlas en diferentes grupos:

A) Alteraciones gonadales y genitales de origen genético: Disgenesias Gonadales.

Para las alteraciones de origen genético, se han propuesto diversas clasificaciones. Una de ellas es la realizada por Bergada (Bergada 1987). En esta clasificación junto a los síndromes de origen genético, se incluyen otras alteraciones de origen congénito, algunas producidas por influencias hormonales externas previas al nacimiento. Clasificación de C. Bergada de las anomalías de la diferenciación sexual (Bergada, 1987):

- | | |
|--|---|
| <p>a) <i>Disgenesias gonadales:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Disgenesias ováricas: - Síndrome de Turner. - Disgenesia gonadal pura. - Disgenesias mixtas: - Hermafroditismo verdadero. - Diferenciación gonadal asimétrica. - Disgenesias testiculares. | <p>b) <i>Función gonadal y hormonal normal (pseudohermafroditismo masculino).</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Función endocrina testicular normal. - Respuesta anormal del órgano efector. <p>c) <i>Masculinización del feto femenino (pseudohermafroditismo femenino).</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hiperplasia suprarrenal congénita fetal. - Acción de andrógenos extrafetales. - Causa desconocida. |
|--|---|

Coulam (Coulam. 1983) planteó que el trastorno resultante de un fallo gonadal anterior al nacimiento y causado por anomalías en la gónada debe ser distinguido del FOP. Algunas mujeres con disgenesia gonadal pueden experimentar desarrollo sexual, ovular por un tiempo, y ocasionalmente quedar gestantes a expensas de algunos ovocitos persistentes (Optíz *et al.* 1983; Reyes *et al.* 1976).

Las disgenesias gonadales se definen como anomalías en la diferenciación sexual, de las gónadas y de los genitales, debidas a una alteración numérica o estructural de los cromosomas sexuales. La pérdida o alteración de un cromosoma sexual o parte de él, durante los primeros estadios del desarrollo del embrión, es lo que determina generalmente un trastorno en la diferenciación gonadal con la consiguiente alteración de los genitales internos y externos.

En cambio el exceso de material cromosómico sexual que acompaña a una línea celular normal (XX, XY) excepcionalmente compromete los mecanismos de diferenciación sexual, pudiendo sin embargo influir en el desarrollo del epitelio germinal de la gónada ya diferenciada (Ej. 46, XX/47,XXX), aparentemente un exceso de cromosomas X podría estar asociado con un descenso del número de células germinales o con una atresia acelerada (Day *et al.* 1964; Gordon *et al.* 1967; Villanueva y Rebar. 1983.).

De entre las disgenesias gonadales, aquellas susceptibles de beneficiarse de la técnica de donación de ovocitos, serían los sujetos con fenotipos femenino (Síndrome de Turner, Disgenesia Gonadal Pura), y teóricamente las disgenesias mixtas y pseudohermafroditismos masculinos que hayan sido derivados hacia un fenotipo femenino (corrección quirúrgica) cuando sus genitales internos lo permitan, es decir, cuando posean útero sin graves alteraciones morfológicas.

- Síndrome de Turner

Descrito por primera vez por Henry H. Turner, en 1938, otros investigadores fueron describiendo posteriormente su histología (Wilkins y Fleishmann. 1944), y su constitución cromosómica: 45 X0 (Ford *et al.* 1959).

El cariotipo X0 se asocia a un fenotipo femenino, baja estatura, infantilismo sexual y diversas anomalías somáticas. El mosaicismo de los cromosomas sexuales o las anormalidades estructurales de un cromosoma X o Y pueden modificar todos los aspectos de este síndrome.

Los embriones con esta anomalía cromosómica, poseen igual cantidad de células germinales que los embriones normales hasta el tercer mes de vida intrauterina. A partir

de este momento, las células germinales comenzarían a disminuir rápidamente hasta desaparecer en el nacimiento. En estos casos, el ovocito sería incapaz de entrar en la primera división meiótica y desaparecería con la consiguiente involución de la gónada (Singh y Carr. 1966). El grado de disgenesia gonadal de estas pacientes dependerá de la constitución cromosómica de las células germinales presentes en el momento del proceso de diferenciación ovárica.

- Disgenesia gonadal pura

En estos casos no aparecen los estigmas del síndrome de Turner. Su talla es normal durante la infancia, pero pueden adquirir carácter eunucoide en el período adulto, por ausencia de hormonas sexuales. Poseen una dotación cromosómica normal pudiendo ser 46,XX y 46,XY también denominado Síndrome de Swyer (1955). Los pacientes de este grupo tienden a desarrollar enfermedades malignas gonadales (disgerminomas o gonadoblastomas).

Como probable explicación etiológica, se baraja, la no migración de las células germinales hasta la cresta genital, o la involución de las mismas inmediatamente después de alcanzar la gónada.

En cualquiera de las dos circunstancias la ausencia de células germinales determinaría una incapacidad para diferenciar la gónada. Ante la ausencia de actividad gonadal, los gonoductos y genitales externos se diferencian hacia el tipo femenino. Las pacientes con síndrome de Turner tienen un riesgo obstétrico más elevados con respecto a otras pacientes (Folsom y Fuqua 2015).

B) Fallo ovárico precoz no disgenético

Se define como el fallo de la función ovárica que ocurre antes de la edad promedio de aparición de la menopausia (dos desviaciones estándar previo en años). Sin embargo, debido a la falta de estudios epidemiológicos, la definición más comúnmente es el fallo ovárico antes de los 40 años (Aiman *et al.* 1985). Estas pacientes presentan amenorrea secundaria de duración variable y niveles elevados de gonadotropinas (FSH Y LH > 40mUI/ml). Dentro de los varios factores implicados se encuentran:

- Factores hereditarios

Varios autores (Austin *et al.* 1979; Coulam 1983; Mattison *et al.* 1984; Starup *et al.* 1973) han descrito la aparición familiar del FOP con transmisión vertical del carácter, lo que sugiere un posible modo de herencia autosómica dominante ligada al sexo.

Teóricamente, la pérdida prematura de ovocitos puede ser el resultado de un fallo en la migración de las células germinales desde la cresta genital, o de una acelerada pérdida de ovocitos de base genética. El estudio del número de ovocitos en diferentes razas de ratones demuestra que la dotación genética varía ampliamente entre las razas, así como la tasa de atresia ovocitaria (Jones *et al.* 1961). Igualmente los datos de Block en 1952 y 1953 (Block. 1952; Block. 1953) sugieren la existencia de diferencias en la dotación de ovocitos y las tasas de atresia folicular entre mujeres. La etiología del FOP es desconocida, pero podría tener su base en una disminución del número de células germinales o en una atresia acelerada (Harper *et al.* 1972).

- Déficits enzimáticos

- Déficit de 17 alfa- hidroxilasa

Las niñas presentan ausencia de los caracteres sexuales secundarios y amenorrea primaria, junto con un incremento de la concentración sérica de gonadotrofinas, hipertensión, ligera alcalosis metabólica hipokaliémica e incremento - de los niveles séricos de desoxicorticosterona y progesterona (Biglieri. 1979; Biglieri *et al.* 1966; Goldsmith *et al.* 1967; Mallin. 1969). La producción de hidroxiprogesterona y de 17 alfa- hidroxipregnenolona está disminuida. La secreción de cortisol disminuye y la producción de andrógenos y andrógenos de origen adrenal y gonadal también está dañada (de Lange *et al.* 1973). La biopsia ovárica, revela numerosos quistes y folículos primordiales con un fallo completo en la maduración folicular (Mallin. 1969).

- Galactosemia

La galactosemia es un desorden con una herencia autosómica recesiva, causado por el déficit del enzima Galactosa- 1- fosfato (Gal-1-P) uridil transferasa. Los recién nacidos

desarrollan lesiones por acumulación del metabolito tóxico: galactosa- 1- fosfato. Se caracterizan clínicamente por retraso mental, cataratas, hepatoesplenomegalia, y disfunción tubular renal.

Actualmente se sabe que las pacientes con galactosemia desarrollan FOP (hipogonadismo hipergonadotropo), a pesar de un tratamiento adecuado (Hoefnagel *et al.* 1979; Kaufman *et al.* 1979).

Existen tres genes que codifican el enzima: Silvestre Gt+, Galactosemia gt, y la variante Duarte Gt D. En la población normal, aproximadamente, un 1% presentarían la actividad normal del enzima: heterocigótico (Gt+/gt) y homocigótico (Gt D/Gt D) y del 0.03% al 0.07% podría tener $\frac{1}{4}$ de la actividad normal: heterocigóticos compuestos (Gt D/gt) (Hagenfeldt *et al.* 1989).

La etiología del fallo ovárico en la galactosemia es desconocida, sin embargo, debemos considerar que los grupos de carbohidratos en las moléculas de gonadotrofinas están alterados, resultando un LH y FSH biológicamente inactivas y que el efecto directo de los azúcares sobre el ovocito es otra posibilidad (Chen *et al.* 1981). La alta toxicidad de la galactosa o sus metabolitos sobre los ovarios sugiere la posibilidad de que pudiera ocurrir FOP en los sujetos con baja actividad de la enzima, sobre todo en los heterocigóticos compuestos, aunque esto no es una causa importante, ya que observando la frecuencia de estos genes (gt y Gt D) en la población caucásica, vemos que estas combinaciones genéticas tienen elevada dificultad para asociarse a disminución de la fertilidad (Hagenfeldt *et al.* 1989).

- Defectos en la secreción de gonadotrofinas

La existencia de gonadotrofinas anormales, con una reducción de su actividad biológica, puede conducir a una acelerada atresia folicular y FOP en fases precoces del desarrollo embrionario. Apoyando esta posibilidad está la demostración de que la exéresis quirúrgica de la glándula pituitaria en monos, con la consiguiente supresión de la secreción de gonadotrofinas, tiene como resultado la aparición de ovarios desprovistos de ovocitos al nacimiento (Gulyas *et al.* 1981).

De hecho, han sido descritos casos de pseudohermafroditismo masculino con LH inmunológicamente activa pero biológicamente inactiva (Axelrod *et al.* 1979; Park *et al.* 1976). Aunque no existen casos documentados similares en mujeres con FOP, se han descrito diferencias entre la LH o FSH inmunoreactiva en orina de mujeres con FOP comparada con la de mujeres castradas o postmenopáusicas (Rebar *et al.* 1983). Todavía no está demostrado que la gonadotropina esté también biológicamente alterada. Estos datos sugieren que el metabolismo y/o excreción de las gonadotropinas y posiblemente sus subunidades, están alterados en algunos casos de FOP, lo cual puede tener importancia en el desarrollo del fallo ovárico causado por una atresia acelerada antes del nacimiento.

- Defectos en el receptor y/o post-receptor de gonadotropinas. (Síndrome de Savage)

El síndrome del ovario resistente o insensible fue caracterizado originalmente en mujeres jóvenes amenorreicas con elevación de las gonadotropinas séricas y urinarias, bajas de estradiol sérico, ovarios con múltiples folículos primordiales no estimulados, cariotipo 46XX, desarrollo normal de los caracteres sexuales secundarios e hipersensibilidad al estímulo con gonadotropinas exógenas (Jones *et al.* 1969).

La patogénesis de este trastorno permanece oscura, aunque son posibles defectos en el receptor y/o post-receptor de gonadotropinas. Un fallo de las gonadotropinas para unirse al receptor por defecto en su actividad biológica o debido a un inhibidor que impide la acción hormonal, un fallo del complejo gonadotropina-receptor para activar la adenilciclase, o un fallo post-receptor, pueden conducir a una atresia acelerada y fallo ovárico precoz. El desarrollo de los caracteres sexuales secundarios podría explicarse basándonos en la elevada síntesis de 'D-4-androstendiona por células del estroma ovárico, que se transformaría en estrona en la periferia.

En la literatura solamente 14 casos cumplieron estrictamente los criterios de este raro síndrome (Maxson *et al.* 1983).

- Fallo ovárico y trastornos autoinmunes

Se han descrito cierto número de casos de FOP con trastornos autoinmunes asociados (Aiman *et al.* 1985; Coulam. 1982; de Moraes-Ruehsen *et al.* 1972). Más comúnmente el fallo ovárico se ha demostrado en pacientes con fallo poliglandular, incluyendo hiperparatiroidismo, enfermedad de Addison, y candidiasis mucocutánea (Drury *et al.* 1970; Golonka *et al.* 1968; Kleerekoper *et al.* 1974). Sin embargo, parece razonable suponer que el fallo ovárico autoinmune puede presentarse con independencia de cualquier otro trastorno autoinmune.

La existencia de anticuerpos (Ac) dirigidos contra los receptores ováricos de las gonadotropinas puede bloquear la acción de éstas y la maduración folicular en algunas mujeres con FOP. La naturaleza intermitente de los trastornos autoinmunes, con niveles fluctuantes de anticuerpos circulantes, podrían dar como resultado ovulaciones esporádicas y eventuales gestaciones.

En la literatura, varios investigadores han detectado anticuerpos circulantes contra el tejido ovárico humano (Coulam *et al.* 1979, de Moraes-Ruehsen *et al.* 1972). Se han descrito efectos citotóxicos del suero de algunas de estas pacientes sobre las células de la granulosa humana en medio de cultivo (McNatty *et al.* 1975).

Escobar (1982) (c *et al.* 1982) demostró la existencia de anticuerpos frente a los receptores de la FSH en dos mujeres con *miastenia gravis* y amenorrea hipergonadotropa, mientras que Austin Coulam y Ryan (1979) (Austin *et al.* 1979) fracasaron al intentar detectar anticuerpos dirigidos contra el receptor de la LH en 14 mujeres con FOP.

Es importante identificar precozmente los casos de FOP autoinmunes por la posibilidad de reversibilidad tras la administración de corticoides (Lucky *et al.* 1977). También ha sido descrito el retomo temporal de la ovulación en una mujer con *miastenia gravis* tras plasmaféresis (Bateman *et al.* 1983) o tras terapia con glucocorticoides en una mujer con un infiltrado linfocitario perifolicular (Coulam *et al.* 1983).

Sin embargo, el diagnóstico de fallo ovárico de origen autoinmune es, en la mayoría

de los casos de sospecha. La presencia de otros trastornos autoinmunes, anticuerpos circulantes frente a otros tejidos diferentes del ovario, o la existencia de infiltrados linfocitarios en folículos, tras biopsia ovárica, constituyen solamente una evidencia indirecta de que el fallo ovárico es de causa autoinmune.

C) - Aplasia tímica congénita

Diversas evidencias sugieren que la presencia del timo es necesaria para la normal secreción de gonadotrofinas, y para prevenir la atresia folicular acelerada. Las alteraciones hormonales y la pérdida acelerada de ovocitos, que ocurren en ratones con ausencia de timo, pueden ser prevenidas mediante el trasplante del timo en el momento del nacimiento (Pierpaoli *et al.* 1975; Rebar *et al.* 1980)

Es importante recordar que los estadios del desarrollo ovárico que ocurren en el ratón en las primeras semanas después del nacimiento, ocurren “in útero” en monos y en humanos. Miller y Chatten (1967) (Miller *et al.* 1967) han demostrado que niñas con ausencia congénita de timo, que fallecieron antes de la pubertad, tenían ovarios desprovistos de ovocitos en la autopsia. Rebar *et al.* (Rebar *et al.* 1981) han demostrado que un péptido tímico sintético (Timosín B4) puede estimular la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y, por lo tanto, de FSH y LH.

D) - Fallo ovárico precoz iatrogénico

Radiaciones

En 1939, Jacob demostró que la irradiación de los ovarios 800 rads durante tres días es, generalmente, suficiente para inducir un fallo ovárico. Pacientes con enfermedad de Hodgkin que recibieron irradiación (40-50 Gy durante 4-6 semanas) desarrollaron en menos del 50% un fallo ovárico permanente, en las demás se observó amenorrea hipergonadotropa sólo temporalmente (Baker *et al.* 1972; De Bruin *et al.* 2009).

Quimioterapia

Los agentes alquilantes, especialmente la ciclofosfamida, también son capaces de inducir fallo ovárico. Koyama *et al.* (Koyama *et al.* 1977) encontraron que es necesaria una

gran dosis de total de ciclofosfamida para producir una amenorrea permanente, tanto en mujeres jóvenes como en las de mayor edad. Siris et al. (Siris *et al.* 1976) han concluido que los ovarios de mujeres jóvenes son más resistentes a los efectos de los quimioterápicos que los de mujeres de mayor edad.

Otros agentes implicados serían el clorambucil y el busulfan (Heller *et al.* 1964).

Diversos estudios en roedores, sugieren que el tratamiento con análogos de la GnRH puede proteger los ovarios de estos efectos indeseables de los agentes alquilantes (Kishk & Mohammed 2013.). Respecto a las publicaciones más recientes, este efecto de protección de los análogos de la GnRH no se puede paulatinamente confirmar ya que mientras Demeestere *et al* (2016) la confirma, Del Mastro *et al* (2014) la niega.

Cirugía

Las resecciones parciales de uno o ambos ovarios no parecen tener influencia demostrable sobre la fecha de aparición de la menopausia, aunque fueran amplias. En cambio, cualquier patología ginecológica que ocasione destrucción del parénquima ovárico da lugar a una presentación más temprana la menopausia, entre éstas debemos destacar la endometriosis y la enfermedad pélvica inflamatoria abscesificante.

Factores ambientales

Agentes infecciosos

Morrison et al. (Morrison *et al.* 1975) han descrito FOP y/o esterilidad en pacientes con virus de la parotiditis. Otros virus implicados en la etiología del FOP son el Cocksakie y el virus de la rubeola. La etiopatogénia vírica suele presentarse en dos fases: en la primera se producen lesiones en el folículo, y en la segunda se forman anticuerpos antiováricos en el tejido lesionado.

Tabaco

En base a estudios epidemiológicos, es conocido que existe una relación inversa dosis-respuesta entre el número de cigarrillos consumidos por día, y la edad de la menopausia.

Los efectos del tabaco son aparentemente independientes de la masa corporal y de otros factores (Daniel. 1978; Jick *et al.* 1977).

Aunque el agente responsable de estos efectos es desconocido, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, han mostrado tener un efecto tóxico para los ovocitos en diversos animales.

Fallo ovárico precoz idiopático

El FOP idiopático es un diagnóstico de exclusión (1n). Es posible que algunas mujeres incluidas en este grupo tuvieran ovarios resistentes por trastornos en el receptor y/o post-receptor de gonadotrofinas, pero que no se llegó a determinar la causa del fallo ovárico.

E) - Menopausia fisiológica

La edad media de la menopausia en los países industrializados se sitúa en los 50+2 años. Datos de la SEGO (1988) cifran una media de 47 años para las mujeres de España.

Varios años antes de la menopausia se produce un aumento en los niveles circulantes de FSH y una disminución en los niveles de estradiol y progesterona. Durante la fase folicular temprana, la concentración de la FSH está aumentada y disminuye a medida que se eleva el nivel del estradiol de forma concomitante con la maduración folicular. Sin embargo, el nivel de la FSH en el momento de la oleada de las gonadotrofinas durante la parte media del ciclo y durante la fase lútea tardía es más elevado que en las mujeres jóvenes, mientras que la concentración de LH es similar. Otros autores han hallado aumentos similares de la FSH sin cambios concomitantes de la LH en las mujeres añosas (Reyes *et al.* 1976). Por lo tanto, los ovarios presentan una reducción gradual de la capacidad de respuesta a las gonadotrofinas varios años antes de la desaparición de las menstruaciones, y este puede ser un suceso desencadenante en la iniciación de la menopausia. Para comprender las motivaciones por las que una mujer mayor de 40-50 años con ausencia de menstruación puede plantearse la maternidad hay que tener en cuenta la situación social. En la actualidad casi un tercio de la vida de la mujer está formada por senilidad y menopausia.

La incorporación de la mujer al mundo intelectual y laboral ha retrasado la edad del matrimonio y de la primera gestación. Las mujeres mayores de 40 años con ovarios activos consiguen, en muchas ocasiones gestaciones de forma espontánea, aunque la frecuencia de aborto aumenta posiblemente por envejecimiento del ovocito (Gindoff y Jewelewicz 1986).

Para aquellas mujeres de la misma edad, pero que presentan una alteración de la función ovárica, las posibilidades de gestación sólo pueden hacerse realidad a través de un programa de donación de ovocitos.

Anatomía patológica

De las consideraciones etiológicas expuestas anteriormente, se deduce que tanto el aspecto macro como microscópico de las gónadas, en las mujeres con fallo ovárico, no va a ser uniforme.

Así, podemos establecer dos grandes grupos:

Ovarios con ausencia de folículos: aquí incluiríamos desde las gónadas disgenéticas, acintadas o hipovascularizadas; los ovarios rudimentarios, algo más desarrollados pero formados únicamente por estroma compacto hasta los ovarios típicos de la menopausia fisiológica, completamente establecida, esto es, ovarios pequeños, retraídos, de superficie invertida y en cuyo estroma se aprecian elementos celulares de la teca que rodean a los cuerpos atrésicos y los cuerpos albicans que quedan incorporados al mesénquima ovárico (Bonilla. 1970).

Ovarios que presentan folículos: como en el caso de ovarios resistentes, en los que se aprecian numerosos folículos primordiales, en algunos casos progresión hasta folículo antral, pero ningún desarrollo posterior. Junto a ello el estroma aparece hiperplásico y en ocasiones luteinizado (Jones y De Moraes. 1969). También vamos a encontrar folículos en diversos estadios del desarrollo en los casos de déficit de 17 -alfa hidroxilasa. Por último, gónadas similares, pero con infiltrados linfocitarios, se presentarían en los casos de etiología autoinmune (Coulam 1982).

Bien sea debido a la ausencia de células germinales, a su escasa dotación, a la atresia acelerada o a la ausencia de respuesta a las gonadotrofinas, en las mujeres con ausencia de función ovárica se produce un ambiente general de hipoestrogenismo, por falta de producción hormonal, que repercute en los órganos diana.

El endometrio en las mujeres con ausencia de función ovárica presenta un patrón de atresia generalizada caracterizado por el epitelio de células adelgazadas, que reviste a las glándulas, las cuales pueden ser de variada configuración, observándose en ocasiones dilataciones quísticas que son específicas en el diagnóstico de atrofia quística o atrofia de estructura adenomatosa. El epitelio superficial consiste en una capa de células planas o cúbicas, apenas conectadas con las glándulas subyacentes. El estroma está formado por células fusiformes que pueden encontrarse muy próximas entre sí o separadas por colágeno. Presentan un núcleo pequeño redondo u oval y denso. El citoplasma es, a menudo, escaso y puede ser difícil de visualizar. Esta aparente ausencia de citoplasma, imparte un aspecto de núcleos desnudos y puede dar la falsa impresión de que la célula estromal fusiforme, es redonda. La relación glándulas/estroma es generalmente menor a la unidad, aunque en los casos de atrofia quística las glándulas pueden predominar. Como conclusión podríamos decir que la característica morfológica del endometrio atrófico es un epitelio glandular de apariencia inactiva (Hendrickson y Kempson 1980). Para la obtención del éxito de la técnica de donación de ovocitos, el endometrio de la receptora debe estar adecuadamente preparado para la nidación del embrión. Para la consecución de este objetivo, se hace necesario, en mujeres con ausencia de función ovárica, el aporte exógeno de preparados hormonales que hagan los efectos de las hormonas ováricas sobre el tejido endometrial.

1.3.4 2.- Pacientes con función ovárica

- Portadoras de trastornos genéticos

Desde que Mendel, a finales del siglo pasado, enunció los postulados básicos por los que se transmiten de padres a hijos los caracteres de los individuos, se ha podido identificar numerosos síndromes y alteraciones hereditarias. Este grupo de pacientes está disminuyendo gracias al diagnóstico preimplantacional.

Herencia autosómica dominante (el gen normal se manifiesta en heterocigosis). Patologías según Caballero 1991:

- Hematológicas: Eliptocitosis y Esferocitosis
- Musculares: Distrofia muscular, Miotonía congénita, Miotonía distrófica.
- Nerviosas: Corea de Huntington, Neurofibromatosis y Esclerosis tuberosa.
- Óseas: Acondroplasia, Exóstosis múltiple, Osteogénesis imperfecta y Enanismo tanatomorfo.
- Otras: Aniridia, Diabetes insípida, Epidermolisis ampollar simple, Hiperblastosis del cutis, Hipercolesterolemia familiar, Poliposis múltiple del intestino, Porfiria intermitente aguda, Porfiria variegada, Retinoblastoma, Riñones poliquísticos, S. de Marfan, s., De Waardenburg, S. de Stein Levental.

- **Herencia autosómica recesiva** (el gen se manifiesta en homocigosis)

Abarca las siguientes patologías (Caballero, 1991):

- Endocrinas: Cretinismo bocioso familiar, Hipertiroidismo y Síndrome adrenogenital.
- Hematológicas: Anemia drepanocítica, Hemoglobinopatías y Talasemia mayor.
- Musculares: Atrofia muscular espinal progresiva y Distrofia muscular.
- Metabólicas: Albinismo, Alcaptonuria, Cistinuria, Enfermedad de Hartnup, Enfermedad de Niemann-Pick, Enfermedad de Wilson, Fenilcetonuria, Galactosemia, Glucogenosis tipo I-III, Hipofosfatasa, Intolerancia a la fructosa, Mucopolisacaridosis y Mucoviscidosis.
- Otras: Leucodistrofia metacromática, Síndrome de Hurler y Síndrome de Sanfilipo (Caballero. 1991).

- **Herencia ligada al sexo** (el gen anormal se encuentra en el cromosoma X, y sólo se manifiesta en el varón siendo la mujer portadora).

En estos casos, debemos ofrecerle a la pareja la posibilidad del diagnóstico preimplantacional. La donación de ovocitos sólo estaría indicada si fracasa el diagnóstico preimplantacional, o si la pareja desea ir directamente a la donación. Abarca las siguientes patologías (Caballero, 1991):

- Enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X: Agammaglobulinemia de Burton, Albinismo ocular, Amielogénesis imperfecta, Ceguera a los colores, Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, Diabetes insípida nefrogénica, Distrofia muscular de Duchenne, Enfermedad de Christmas (hemofilia por el factor IX) , Enfermedad de Fabry (deficiencia de la enzima α -galactosidasa A), Enfermedad granulomatosa crónica, Ictiosis, Hemofilia A, Mucopolisacaridosis 11, Retinitis pigmentaria, Feminización testicular.
- Enfermedades dominantes ligadas al cromosoma X: Raquitismo vitamina D resistente y Síndrome polimalformativo llamado BBB (Caballero. 1991).

Herencia limitada al sexo (el gen sólo puede manifestarse en un sexo. Puede tratarse de un gen dominante ligado al X que es letal en el varón, o de un gen ligado al cromosoma Y).

Causa multifactorial (afectan a caracteres que se heredan bajo la influencia de dos o más genes, pero que para que se manifieste el trastorno también precisa del concurso de algún factor ambiental). Este grupo abarca las siguientes patologías (Caballero, 1991):

- Defecto del tubo neural: Mielomeningocele, Encefalocele, Anencefalia.
- Cardiopatía congénita: Comunicación interventricular, Comunicación interauricular, Persistencia del ductus arterioso y Tetralogía de Fallot.
- Otras: Estenosis pilórica, Luxación congénita de cadera, Pie zambo o equino varo, Labio leporino, Fisura palatina, Agangliosis, Atopias, Psoriasis y Esquizofrenia

B) - Anomalías cromosómicas asociadas a la infertilidad

Las anomalías cromosómicas asociadas a la esterilidad e infertilidad en la especie humana pueden clasificarse en dos grupos (Navarro et al. 1987):

- Las anomalías cromosómicas somáticas que afectan tanto a las células de la línea somática como a las de la línea germinal del individuo.

- Las anomalías cromosómicas meióticas, que afectan únicamente a las células germinales del individuo.

En ambos casos se puede producir infertilidad o esterilidad mediante dos vías. Una sería el bloqueo de la gametogénesis, en cuyo caso quedará afectado el número de gametos formados, en mayor o menor grado. Dependiendo de que el bloqueo sea parcial o total. La segunda vía sería la formación de gametos desequilibrados cromosómicamente, obteniendo como resultado la aparición de abortos de repetición o silenciosos e hijos con malformaciones.

Se han estudiado muy pocas series de mujeres infértiles, y de sus datos se deduce que la frecuencia de anomalías cromosómicas en sus cariotipos es prácticamente igual a la observada en recién nacidos (0.2-0.9%) (Chandler. 1979), no ocurriendo lo mismo en los varones infértiles donde el porcentaje de alteraciones cromosómicas es mucho más elevado (5-10%) (Bourrouillon *et al.* 1985, Tiepolo *et al.* 1981). Esta menor frecuencia de anomalías en la mujer podría explicarse por una segregación selectiva en la formación de los ovocitos, de manera que, en algunos casos, el núcleo portador de las anomalías sería incluido en el corpúsculo polar.

Las anomalías cromosómicas más asociadas a la infertilidad son las translocaciones recíprocas equilibradas. Cuando el origen de la translocación es materno el pronóstico en cuanto a la fertilidad empeora, aumentando el número de abortos o hijos con malformaciones. Algunos autores sitúan estas alteraciones en un 26% de los ovocitos estudiados de FIV (Angell *et al.* 1986; Veiga *et al.* 1987). Por otra parte, en un estudio realizado o se observaron diferencias entre las alteraciones encontradas en este grupo con relación a las encontradas en ovocitos de mujeres fértiles (Tarin *et al.* 1991). Los abortos espontáneos del 1º trimestre ($\approx 60\%$) y del 2º trimestre (20%) se deben a alteraciones cromosómicas (Navarro *et al.* 1987) y que clasificados de mayor a menor frecuencia (Barri.1987) serían:

- Trisomías: 52-60%	Tetraploidías: 3-7%
- Monosomías X: 20-29%	Mosaicos: 1-4%
- Triploidías: 14-21%	Anomalías estructurales: 3-6%

En algunos casos de trisomía el origen del cromosoma extra ha sido determinado (trisomías 16 y 21), observándose un origen materno en el 72% y 64% de los casos respectivamente.

En estas ocasiones, la mayor parte de las veces (87%) se debía a una no disyunción de la primera división meiótica. En los casos de triploidía, la no división meiótica materna es lo más frecuente.

La posibilidad de llevar un embarazo a término disminuye considerablemente después de dos o más abortos espontáneos. Cuando la alteración aparece *de novo* y no es repetitiva, se interpreta como una tendencia, en uno de los dos miembros de la pareja, a presentar fenómenos de no disyunción (Navarro *et al.* 1987). En parejas con abortos recurrentes, la frecuencia de translocaciones equilibradas en uno de los progenitores fue del 5.8% de un total de 1600 parejas (Diedrich *et al.* 1983). Cuando se estudian las parejas con uno o más abortos, tras descartar causas ginecológicas de los mismos, la incidencia aumenta hasta el 11.7% (Diedrich *et al.* 1983; Michels *et al.* 1982).

1.3.4.3 - Receptora de TRA de DO

Cada pareja receptora de ovocitos donados debe cumplir con ciertos requisitos ya establecidos. Primero, el médico especialista determinará qué pareja en particular califica para participar en este proceso. Se toma en consideración la salud física de la receptora, para evaluar la ausencia de problemas físicos que constituyan una contraindicación para el embarazo y, por otro lado, la psicológica, que la misma se sienta cómoda con la ausencia de conexión genética con el bebé, para aceptar este tipo de embarazo. La edad máxima de las mujeres receptoras depende del programa de TRA, pero usualmente no es más de 50 años.

En el caso del hombre, él participará junto a la esposa en la evaluación psicológica, se obtendrá su historia médica y examen físico, se le realizará un examen de semen y cultivo del mismo, se obtendrá el tipo de sangre y será sometido cada seis meses a exámenes de enfermedades infecciosas transmitidas sexualmente.

Criterios a considerar en las pacientes receptoras:

- Antecedentes personales y médicos
- Hábitos:

Es importante investigar si la paciente es fumadora habitual o no, ya que las mujeres que fuman más de 10 cigarrillos al día tienen las tasas de implantación y de gestación menor que las no fumadoras y la tasa de aborto está incrementada en los ciclos de FIV o ICSI. La tasa de implantación era significativamente inferior (34,1% vs 52,2%), probablemente por una disminución de la receptividad uterina (Soares *et al.* 2008).

Exploración general:

Exploración física: Peso y talla para calcular el índice de masa corporal. (IMC) Hay que considerar que en los casos de IMC superior a 30 Kg/m², las tasas de implantación están disminuidas de manera significativa, y las tasas de abortos aumentadas (Bellver *et al.* 2010). En cuanto mayor es el grado de obesidad, mayor es la alteración endocrina y metabólica asociada. En este tipo de mujeres obesas existe mayor riesgo de infertilidad, siendo ésta tres veces superior que en la mujer con normopeso. Existen teorías que explican la disminución de la implantación, como la acción negativa del hiperinsulinismo o de las proteínas de fase aguda en el endometrio.

Exploración ginecológica:

Útero:

Cavidad endometrial excluir la presencia de:

Miomas submucosos representan menos del 10% de la totalidad de los miomas, está claro que los miomas submucosos disminuyen significativamente las tasas de gestación en los ciclos de FIV. En un estudio se compararon los resultados de la FIV de pacientes con miomas submucosos con las pacientes sin miomas y se evidenció el importante efecto negativo sobre las tasas de implantación (3 frente a 11,5%), las tasas de embarazo clínico (14 frente a 30,4%) y las tasas de aborto espontáneo (46,7% frente a 21,9%).

Pólipos endometriales: El pólipo como causa única de esterilidad es muy discutida, la presencia de pólipos endometriales no explica en todos los casos la posible infertilidad, aunque si se encuentran próximos al canal cervical, pueden ocasionar problemas durante la transferencia de embriones. El mecanismo por el que los pólipos se asocian a

esterilidad es una alteración del mecanismo de transporte de los espermatozoides o bien en ofrecer una superficie de anidación poco favorable.

Sinéquias son adherencias intrauterinas que resultan de la cicatrización endometrial. Generalmente son secundarias a un trauma endometrial por legrado, infecciones endometriales etc. La lisis quirúrgica de estas adherencias mejora notablemente la fertilidad y la posibilidad de un embarazo normal.

Cuerpo uterino excluir la presencia de:

Miomas uterinos, se estima que un mioma e infertilidad están asociados, aproximadamente, en el 10% de las mujeres, y se estima que en un 1-2,4% de la pacientes infértiles tiene como única causa de infertilidad el mioma uterino. Los mecanismos por los que el mioma puede afectar la fertilidad son varios: por distorsión de la cavidad endometrial, dificultades en la fecundación, alteraciones en la vascularización, contractilidad uterina disfuncional que puede alterar la migración de los espermatozoides y la nidación del embrión. etc.

Miomas intramurales/ subserosos afecta, aproximadamente, al 20-40% de las mujeres en edad reproductiva y al mayoría son asintomáticos.

La tasa de concepción es menor en las mujeres con miomas comparada con las mujeres con infertilidad inexplicada. Según la localización, la tasa de concepción después de una miomectomía por miomas intramurales o subserosos oscila entre el 58 y 65%.

- Adenomiosis

Se ha postulado que la fertilidad puede empeorar en pacientes con adenomiosis debido a una alteración del mecanismo uterino de transporte espermático y a la destrucción de la arquitectura miometrial normal. La disperiostasis uterina de estas pacientes podría explicar la baja implantación tras un tratamiento de FIV. Se ha demostrado también que el ambiente endometrial en pacientes con adenomiosis tiene parámetros inmunitarios diferentes comparados con pacientes fértiles, que pueden ser responsables de reacciones que dificulten la implantación (Campo *et al.* 2012, Maheshwari *et al.* 2012).

En pacientes con patologías especiales, solicitaremos un informe de su médico especialista que no contraindique la gestación ni el tratamiento que conlleva la técnica de reproducción asistida.

1.3.4.4 - Resultados del programa de DO

En los primeros estudios que incluían un tamaño de muestra grande, concluyeron que la causa de infertilidad y la edad de la receptora no guardan relación con la tasa de éxito tras la ovodonación (Remohi *et al.* 1997), corroborando que la calidad ovocitaria juega un papel fundamental. El número de ovocitos donados debe ser el adecuado para que la transferencia embrionaria sea óptima. No existe un límite establecido en el número mínimo y máximo de óvulos que deban ser donados a una receptora, para que las posibilidades de embarazo sean consideradas como normales. Existen publicaciones que demuestran que las tasas de gestación son iguales con la donación de 4-8 ovocitos, si bien la posibilidad de congelar embriones pasa de 8% con 4 ovocitos al 53% en caso de donar 8 ovocitos en estadio de metafase II, aunque estos resultados pueden estar condicionados por factores como la calidad seminal.

En función del número de ovocitos metafase II que recibían las receptoras, observaron que cuando la pareja recibía 5-6 ovocitos, la tasa de gestación clínica se situaban en torno al 40%, mientras que si el número de ovocitos maduros se situaba en 8-9, las tasas de gestación clínica se elevaban a un 57-59%, observándose que por encima de este número de ovocitos recibidos no conseguíamos incrementar la tasa de gestación clínica en transferencia de embriones en fresco, aunque si la tasa de gestación acumulada, al conseguir mayor cantidad de embriones sobrantes para criopreservar.

Ovocitos maduros	Tasa de gestación %
5	39
6	41
7	43
8	50
9	59
>10	50

Tabla I Resultados en función del número de ovocitos Metafase II recibidos. Estudio realizado 2008-2010 (1.092 ciclos) (Lucas V. *et al* 2010)

La mejora en los resultados obtenidos con DO (Remohí *et al.* 1997, Budak *et al.* 2007) se comunican constantemente, pero ha habido pocos estudios fiables que hayan investigado tratamientos repetidos en casos de ciclos fallidos en general y las tasas acumuladas en concreto. Por otra parte, no todos los estudios publicados hasta la fecha han coincidido en considerar como dato la obtención de un recién nacido como el resultado principal. En el registro europeo de TRA del 2012 se analizaron los resultados de 33605 ciclos de DO y el porcentaje de embarazo era por transfer a fresco del 48,4% (Calhaz-Jorge *et al.* 2016)

Número de ovocitos inseminados - inyectados /gestaciones	
Transferencia fresca sola	16.9
Transferencia fresca + criopreservada (estimada)	8.6

Tabla II: Número de ovocitos inseminados/inyectados en DO para conseguir una gestación (Registro SEF 2014)

Seguramente es importante el número de ovocitos de una donación para facilitar al máximo una transferencia embrionaria de buena calidad y asegurar una buena tasa de gestación. En un reciente estudio de Cobo y cols (2015) se analizaron 6 años de actividad del programa de DO con la utilización de ovocitos vitrificados, la tasa de embarazo aumentaba progresivamente con el mayor número de ovocitos donados (Cobo *et al.* 2015).

En un análisis de Soares y cols (2008) de los factores que influyen sobre la receptividad endometrial se encontró un beneficio en la utilización de análogos de GnRH en la preparación endometrial de la receptoras (OR 1.26 95% IC 0.89-1.80) que permite la supresión hipofisaria para evitar riesgo de luteinización prematura. Se encontró una mayor incidencia de una luteinización endometrial precoz con suministros de estrógenos prolongados (> 20 días) (Soares *al.*, 2008).

En el trabajo de Budak y cols (2007) en el cual se analizaron 10 años de actividad de TRA de DO, se observó una disminución de la tasa de implantación y de la tasa de embarazo y un aumento de la tasa de abortos en edad materna avanzada (>45 años).

Por lo tanto comparando las tasas de implantación y de gestación en las distintas indicaciones de donación de ovocitos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).

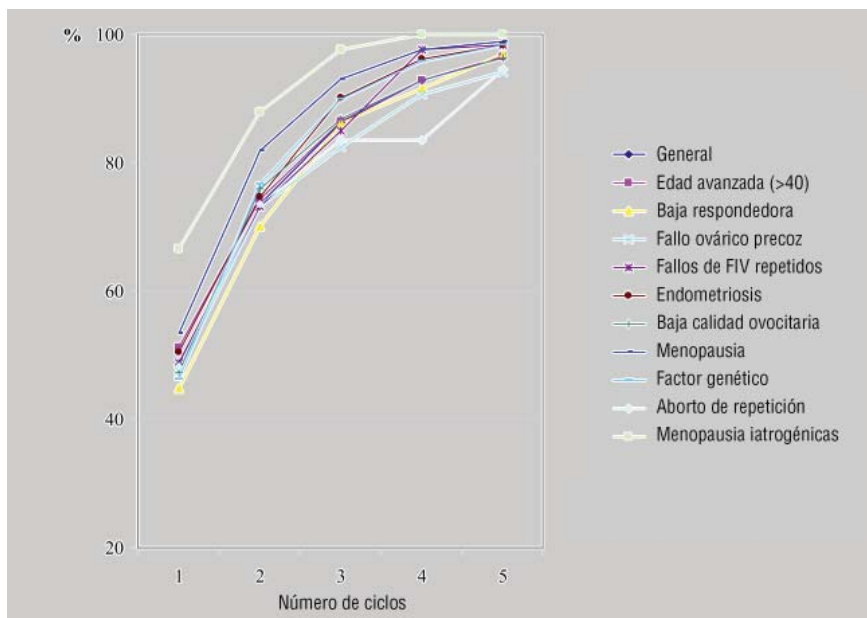


Figura 5. Tasa de gestación en las distintas indicaciones de donación de ovocitos (adaptado de Budak et al 2007).

A través de los años los resultados obtenidos en los programas de donación de ovocitos han mejorado considerablemente, debido en gran medida, a una mejora en las técnicas y condiciones de los laboratorios, lo que ha redundado en un incremento en la calidad embrionaria. En un estudio posterior publicado por Budak et al. así lo demuestra, este abarca la experiencia acumulada en 10 años de ovodonación e incluye más de 8.000 ciclos, muestra unas cifras globales de 54,9% de tasa de gestación, un 27% de tasas de implantación, el 50,3% de tasa de gestación clínica y un 19% de tasa de aborto (Budak *et al.* 2007). En España según el registro de 2014 de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en el caso de los tratamientos de FIV e inyección intracitoplasmática (ICSI), los porcentajes de gestación por ciclo iniciado son del 29% en ovocitos propios y del 50,9% utilizando ovocitos de donante. Dichos porcentajes disminuyen si valoramos el número de gestaciones a término por ciclo, siendo tan sólo del 17,3% utilizando ovocitos propios y del 32,9% con ovocitos de donante. (Registro de la sociedad Española de Fertilidad, Técnicas de Reproducción Asistida 2014).

En el trabajo de Cobo y col. (Cobo *et al.* 2015) se analizaron los resultados de 6 años de experiencia de ciclos de DO tras vitrificación ovocitaria. La tasa de implantación era del 39%,

de embarazo clínico del 48,4% mientras la tasa de embarazo evolutiva reconocida era del 39,9%. Mientras la tasa de embarazo cumulativa calculada por donación de ovocitos alcanzaba al 78,8%. El porcentaje de sobrevivencia de los ovocitos en media fue observado del 90%.

Número de ovocitos por niños en programa de DO y de ovocitos propios				
	N. de ovocitos utilizados	N. de partos vivos	Partos vivos / n. de ovocitos utilizados (%)	N. de ovocitos / partos vivos
Ciclos de ovodonación: total ciclos DO	32,460 (9.4 ± 4.1)	2,102	6,5	15,4
Ciclos con ovocitos propios de ovodonación: total ciclos DO	32,460 (9.4 ± 4.1)	2,102	6,5	15,4
≤ 35 Ciclos con ovocitos propios	697 (7.9 ± 2.1)	46	6,6	15,2
36 - 37 ≤ 35	312 (7.3 ± 0.7) 697 (7.9 ± 2.1)	1946	6,1 ^a 6,6 ^a	16.315, 2
≥ 38 - 39 36 - 37	284 (6.1 ± 4.2) 312 (7.3 ± 0.7)	1619	5,6 ^a 6,1 ^a	17.816,3
≥ 40 ≥ 38 - 39	220 (5.0 ± 2.8) 284 (6.1 ± 4.2)	416	1.8 ^b 5.6 ^a	55.517,8
Total ovocitos propios ≥ 40	1,513 (8.1 ± 2.1) 220 (5.0 ± 2.8)	854	5.61.8 ^b	17.855,5
Total ovocitos propios	1,513 (8.1 ± 2.1)	85	5.6	17,8

Nota: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticas (P < .05).
 Número de ovocitos utilizados = MII ovocitos utilizados + embriones usados en transferencia de congelados
^a Núm. de niños conseguidos por 100 ovocitos
^b Núm. de ovocitos necesarios para obtener un niño.

Tabla III Número de ovocitos para niño en programa de DO y de ovocitos propios (adaptada de Cobo et al. 2015)

Desde este trabajo reciente de Cobo y sus colaboradores se evidencia cómo un número ideal para obtener un embarazo evolutivo/ niño nacido sea alrededor de 15 ovocitos en un programa de DO. (Cobo *et al.*, 2015)

1.4 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación ha sido desde siempre una herramienta fundamental en los laboratorios de reproducción asistida, ofreciendo una oportunidad excelente para rentabilizar al máximo los ciclos de estimulación ovárica, a través por ejemplo de la transferencia de embriones congelados. De la misma manera, la disponibilidad de semen congelado ha permitido optimizar los tratamientos de infertilidad, ofreciendo resultados muy satisfactorios.

Durante los últimos años las diferentes estrategias en este campo han experimentado un grande cambio, mejorando las técnicas de criopreservación de las muestras biológicas y mejorando por tanto los programas de donación.

1.4.1 PROBLEMAS ASOCIADOS A LA CRIOPRESERVACIÓN

En general el almacenamiento a una temperatura igual o inferior a -150°C (la cual se alcanza mediante la inmersión de las muestras en nitrógeno líquido a su temperatura de ebullición, es decir a -196°C) es prácticamente inocuo y puede mantenerse, se puede afirmar, durante un largo tiempo, aunque se desconozca todavía el tiempo real máximo de conservación.

En particular los aspectos críticos de la criopreservación son la “subida” y “bajada” de temperatura. Existen diversos intervalos térmicos en los que se pueden ocasionar daños con mecanismos completamente distintos:

Daños por enfriamiento: aparece a temperatura alta, entre 15°C (o incluso a 20°C), y -5°C . Las estructuras biológicas más sensibles son las gotas lipídicas, las membranas ricas en lípidos y los microtúbulos. (Ghetler *et al.*, 2005). Los daños en los microtúbulos pueden ser reversibles pero un funcionamiento incorrecto puede dar lugar a la destrucción del huso meiótico y la creación de anomalías cromosómicas.

Los daños causados a las estructuras lipídicas parecen constituir un proceso irreversible que puede dar lugar a la desintegración gradual de la estructura y la funcionalidad celular.

Formación de cristales de hielo: el intervalo de temperatura de referencia es de -5°C y -80°C . Estos cristales pueden destruir todos los orgánulos y las membranas celulares, fundamentalmente a través de una fuerza mecánica que actúa a lo largo de su formación y su crecimiento. Este tipo de daño puede reducirse con la utilización de crioprotectores. La utilización de estos agentes químicos influye en los fenómenos que ocurren durante la congelación de células vivas, hasta ahora descritos. El papel de estas sustancias es proteger las células de los efectos ocasionados por el hielo y la elevada concentración de sales. En general los crioprotectores se pueden clasificar como permeables o no permeables. Los primeros tienen la propiedad de cruzar la membrana pasivamente desplazando el agua, por el contrario, los segundos son solutos que no son capaces de cruzar la membrana plasmática, y por lo tanto permanecen confinados en el medio extracelular. El mecanismo por el cual ejercen su efecto benéfico, depende de varias de sus propiedades. Gracias a la depresión molar del punto de congelación producida por la mezcla de solutos en una solución a una temperatura dada durante la congelación, las células experimentan menos estrés inducido por sales, en presencia de estos agentes. Los crioprotectores disminuyen el punto de congelación de la solución de 2°C o 3°C (alrededor de -50°C o menos) dando más tiempo para que la célula se deshidrate.

Otro enfoque empleado para minimizar la formación de estos cristales consiste en la aplicación de velocidades bien definidas tanto de enfriamiento como de calentamiento.

Fracturas mecánicas: este tipo de daño se puede desarrollar entre -50°C y -150°C . Estas fracturas pueden originar lesiones destructivas en los organismos. Casi todas estas lesiones se deben al crecimiento desigual de cristales de hielo y su posterior rotura entre dos masas sólidas. El efecto tijera de dos masas sólidas que se deslizan una sobre la otra se puede visualizar a través de las líneas afiladas de las fracturas.

Entre los factores que predisponen a esta clase de daños figuran las velocidades altas de enfriamiento y calentamiento, el tamaño de la muestra a congelar; cuanto más pequeño sea el tamaño de la muestra, más probable que sobreviva a la criopreservación. Sin embargo, el tamaño no constituye el único factor determinante. Por ejemplo, la criopreservación de cigotos humanos es más sencilla que la de los ovocitos no fecundados, la forma casi esférica de

los boicots puede suponer otro problema. Otro factor a tener en cuenta es la permeabilidad, este factor puede mostrar diferencias en distintos estadios del desarrollo y puede obligar a seleccionar parámetros correctos de equilibrado y dilución, así como la aplicación de compuestos crioprotectores más adecuados.

1.4.2 - ESTRATEGIAS DE CRIOPRESERVACIÓN

En general se puede hablar de dos tipos de estrategias de criopreservación: se habla de congelación convencional o congelación lenta cuando se utiliza un dispositivo de congelación a velocidad controlada para la criopreservación, mientras que el término vitrificación se aplica procesos muy rápidos de inmersión directa en nitrógeno líquido.

En la actualidad más y más laboratorios están utilizando la vitrificación como metodología de criopreservación debido a que en la última década se han publicado más de 400 artículos relativos a un mayor aumento de tasas de supervivencia y desarrollo en comparación con la congelación lenta. Aún así en este capítulo abordaremos los dos tipos de estrategias de criopreservación.

Congelación lenta: La congelación lenta pretende establecer un frágil equilibrio entre diversos factores que pueden resultar dañinos, como la formación de cristales de hielo, fracturas, daños tóxicos y osmóticos. Por lo general, los embriones y ovocitos se equilibran en soluciones 1 M a 2 M de compuestos crioprotectores permeables y no permeables, se introducen en pajuelas de 0,25 ml, se sellan y se enfrían con una velocidad relativamente alta hasta -7°C , por colocación de las pajuelas en un congelador de velocidad controlada. A esta temperatura, se induce la formación de cristales de hielo en la solución, preferiblemente en una posición alejada del embrión o el ovocito, mediante el contacto de la pajuela con una pinza o un paño frío. Posteriormente, se aplican velocidades de enfriamiento controladas de 0,3 a 1°C /minuto. El enfriamiento controlado se mantiene hasta unas temperaturas comprendidas entre -30°C y -40°C . Después las pajuelas se introducen en nitrógeno líquido para su enfriamiento y almacenamiento final.

Este método no logra eliminar la formación de cristales de hielo, pero la utilización de bajas concentraciones de crioprotectores hace que la toxicidad ocasionada por estas sea relativamente baja.

Vitrificación: se utilizó por primera vez en el ámbito de la Embriología alrededor de una década después de la congelación lenta convencional. Se puede clasificar como un abordaje más radical que la congelación lenta, ya que elimina por completo la formación de cristales de hielo. Pero existe una mayor probabilidad de aparición de otros daños relacionados con los compuestos crioprotectores. La vitrificación depende de un aumento drástico de la velocidad de enfriamiento y la concentración de agentes crioprotectores. En general, la vitrificación obliga a duplicar o cuadruplicar la concentración de crioprotectores empleada en la congelación lenta.

Una de las propiedades positivas de la vitrificación además de la eliminación por completo de la formación de cristales de hielo es la acusada disminución de las lesiones por enfriamiento, ya que la velocidad alta de enfriamiento y calentamiento permite que la muestra atraviese con rapidez los intervalos térmicos nocivos, a diferencia de la congelación tradicional.

Existen tres métodos para alcanzar velocidades altas de enfriamiento: en primer lugar, minimizar el espesor de la capa termo-aislante situada entre la muestra y el nitrógeno líquido; en segundo lugar, reducir el volumen de la solución que alberga a la muestra; y, por último, minimizar la formación de vapor líquido alrededor de la muestra.

Existen diferentes estrategias que se encargan de mejorar las velocidades de enfriamiento y calentamiento, una de las más utilizadas es el método de gota de mínimo tamaño (TMG) o enfriamiento de mínimo volumen celular (MVC) (Kuwayama M, *et al.*, 2007). Este método consiste en la colocación de una micro gota de solución de vitrificación que contiene el ovocito o el embrión en una superficie sólida que se sumerge en nitrógeno líquido. Kuwayama y cols (Kuwayama M, *et al* 2000) introdujeron posteriormente una versión sofisticada y práctica de este procedimientos través del método **Cryotop**, el cual emplea una delgada película de plástico unida a un soporte sólido de plástico, así como una caperuza protectora en la película con el fin de proteger a la muestra de daños mecánicos ocasionados a lo largo del periodo de almacenamiento.

1.5- CRIOPRESERVACIÓN OVOCITARIA.

Los avances realizados en diferentes campos científicos han dado lugar a la creación de bancos de tejidos como médula ósea, piel, etc. Asimismo la congelación ha sido incorporada con éxito en los laboratorios de fecundación in Vitro, hasta el punto de convertirse en una herramienta fundamental. Así es muy habitual la existencia de bancos de semen y de embriones. Sin embargo, si se trata de ovocitos no ocurre lo mismo. A pesar del considerable esfuerzo invertido en la consecución de un método eficiente, los avances conseguidos en este campo han sido aleatorios y en su mayoría insuficientes. Esta es la causa del desequilibrio existente a la hora de evaluar las ventajas que ofrece la criobiología aplicada a la preservación de la fertilidad en el varón o la mujer.

Hoy en día la necesidad de criopreservar ovocitos humanos no solo obedece a requerimientos específicos del tratamiento de infertilidad sino que existen otras motivaciones clínicas donde constituye una opción muy atractiva para la preservación de la fertilidad.

Entre las indicaciones del porqué criopreservar ovocitos en clínica podemos encontrar:

- 1) *Paciente infértil*: ausencia de semen de la pareja, ya sea por patología seminal como en casos de azoospermia o falta de espermatozoides móviles en la biopsia testicular, o simplemente por cuestiones meramente circunstanciales como el que la pareja sea ausente el día de la punción ovárica.

Otro grupo de pacientes que podemos incluir en la lista, son las bajas respondedoras, en las que la acumulación de ovocitos en metafase II (MII) provenientes de 2 o 3 ciclos de estimulación puede aumentar la capacidad de selección embrionaria y por tanto las posibilidades de gestación.

Por último pueden incluirse pacientes en las que la transferencia de embriones a fresco sea contraindicada (pacientes a riesgo de hiperestimulación ovárica, pacientes con un endometrio inadecuado, presencia de pólipos, etc.).

2) *Paciente oncológica*. En la actualidad las terapias oncológicas están aumentando la supervivencia al cáncer, hecho que también ha aumentado la población de adultos jóvenes que una vez superada la enfermedad, desean ser madres. No obstante, estas terapias son responsables frecuentemente de un fallo gonadal e infertilidad. En estos casos, podemos ofrecer la criopreservación de ovocitos previamente al tratamiento oncológico, para afrontar el nuevo reto de preservar la fertilidad en pacientes con cáncer. Existe otra opción como la criopreservación de tejido ovárico pero es considerada todavía en fase experimental.

3) *Paciente sana*. Mujeres sanas que voluntaria o involuntariamente posponen su maternidad. Esta opción es cada vez más frecuente, observándose una elevada proporción de mujeres que desean hacerlo a edades reproductivas avanzadas, con el riesgo de ver una gran disminución de la fertilidad como consecuencia del proceso natural de la pérdida del número y calidad de los ovocitos.

4.- *Donación de ovocitos*. En los programa de TRA de DO, sobre todo en centros de infertilidad con un gran número de ciclos, a menudo se utiliza la vitrificación como técnica de almacenamiento de ovocitos procedentes de donantes.

1.5.1. EFECTOS DE LA CONGELACIÓN DE OVOCITOS

Existen varios factores específicos del ovocito que pueden comprometer el resultado de la congelación. En primer lugar, está el gran tamaño de esta célula (150 μ de diámetro), siendo una de las células más grandes del cuerpo humano, otro factor importante es su gran contenido en agua.

Por tanto podemos decir que los ovocitos son células con una gran sensibilidad a cualquier proceso de criopreservación, y esto se puede traducir en efectos muy específicos: el “*chilling injury*”, la formación de hielo y la criofractura.

- **Efecto “chilling”**: ocurre entre +15°C y -5°C y afecta principalmente a los lípidos, microtúbulos del huso y ocasiona también un endurecimiento de la zona pelúcida.

- **Formación de hielo:** ocurre entre -5°C y -80°C y presenta un grave efecto mecánico sobre las estructuras celulares. La formación de hielo ocurre cuando la célula no se ha deshidratado lo suficiente, ya que gracias a su gran volumen, el ovocito tiene mayor dificultad para alcanzar el equilibrio. Este efecto nocivo se presenta principalmente durante la recristalización que ocurre con la descongelación y puede tener consecuencias drásticas desde el punto de vista de la viabilidad.

- **La criofractura:** el efecto mecánico de la solidificación o la ruptura ocasional de la solución puede generar daño por criofractura, especialmente en estructuras biológicas grandes como los ovocitos. Se presenta principalmente entre -50°C y -150°C y afecta principalmente la zona pelúcida (Liebermann *et al.*, 2002)

1.5.2. – PRINCIPALES MÉTODOS DE CONGELACIÓN OVOCITARIA

1.5.2.1.- Protocolo de congelación lenta para ovocitos:

Este tipo de protocolo consta de diferentes fases: Adición y Equilibrio con el crioprotector, Congelación, Almacenamiento, Descongelación y Dilución de los Crioprotectores.

1.- Adición y Equilibrio con el Crioprotector. Para ovocitos humanos, el crioprotector permeable de elección es el PROH. En la fase inicial de equilibrio se utiliza este agente en una concentración de 1,5 M. En un paso subsiguiente, con el fin de potencial la deshidratación y el doble flujo de crioprotector permeable y agua a través de la membrana, se añade a la solución crioprotectora el agente no permeable. El más empleado es la sacarosa, en una concentración que varía desde 0,1 M hasta 0,3 M.

2.- Enfriamiento a Temperaturas de congelación: Para esta fase es imprescindible el uso de un congelador programable que permita controlar la velocidad de la congelación. Usualmente el protocolo empieza a temperatura ambiente y se reduce la temperatura a una velocidad relativamente rápida $2-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -6 a -8°C . Durante 5-10 minutos, no se modifica la temperatura programada para permitir que crezca uniformemente el frente de hielo creado con el *seeding*. Tras este intervalo, prosigue el descenso de

temperatura, a $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -30°C o -50°C . Durante este periodo se termina el proceso de intercambio a través de la membrana y se congela tanto el medio extracelular como el intracelular, en teoría libre de cristales de hielo. Posteriormente, se puede programar una rampa de descenso de temperatura adicional a -30 o $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -150°C o -180°C , antes de sumergir las muestras en nitrógeno líquido. El almacenamiento se realiza a -196°C en nitrógeno líquido.

3.- Descongelación. Un ovocito congelado en condiciones favorables para que consiga sobrevivir, puede no hacerlo si no se descongela correctamente. Tras la descongelación el crioprotector permeable debe abandonar el compartimento intracelular y al mismo tiempo el ovocito debe rehidratarse, así pues, se establece un doble flujo de agua y crioprotector a través de la membrana en sentido inverso al que se produjo durante la congelación. La descongelación debe ser rápida para evitar la recristalización. El paso de -196°C a 22°C supone una velocidad de descongelación de $200-300^{\circ}\text{C}/\text{min}$, suficiente para garantizar el máximo de supervivencia. Los ovocitos descongelados para evitar el choque osmótico se someten a pasos sucesivos en soluciones con concentraciones decrecientes de crioprotectores.

1.5.2.2.- protocolo de vitrificación:

Como ya hemos mencionado en capítulos anteriores, cabe destacar que la inmensa mayoría de métodos de mínimo volumen requieren la inmersión directa de las muestras en nitrógeno líquido para asegurar la velocidad de enfriamiento deseada. Este aspecto genera otra clasificación de los métodos de vitrificación en abiertos y cerrados. Por sistemas abiertos se conocen los que las muestras entran en contacto directo con el nitrógeno líquido durante la vitrificación. Estos dispositivos cuentan con elementos adicionales destinados a la protección de las muestras durante el almacenaje (pajuelas, criotubo, etc.). Los sistemas cerrados son aquellos en los que tras someter las muestras a la solución de vitrificación se cargan en un dispositivo que ha de ser sellado herméticamente antes de la inmersión en nitrógeno líquido de esta forma las muestras nunca entran en contacto con éste, lo que por otra parte penaliza la velocidad de enfriamiento.

El protocolo de la vitrificación consiste en equilibrar los ovocitos en una solución que contiene una concentración equimolar de etilenglicol (EG) y de dimetilsulfóxido (DMSO) durante un tiempo que depende del tipo celular y de la calidad y repuesta de las mismas al medio de equilibrio. Durante esta fase los ovocitos se deshidratan e intercambian el agua del citoplasma por crioprotector permeable. A continuación, el material se expone a la solución de vitrificación que consiste en una mezcla de los mismos crioprotectores empleados en el equilibrio, pero más concentradas, y a ésta se añade sacarosa como crioprotector no permeable. La exposición a la solución vitrificada no debe exceder 1 min y se realiza a temperatura ambiente. Finalmente, los ovocitos se cargan en el dispositivo destinado a tal fin y se sumergen en nitrógeno líquido.

1.5.3.- EXPERIENCIA CLÍNICA

El verdadero éxito de cualquier técnica de criopreservación de ovocitos se encuentra en la posibilidad de lograr nacidos vivos en una proporción similar a la alcanzada con ovocitos frescos. La aplicación clínica de la vitrificación utilizando la técnica del Cryotop ha demostrado ser altamente eficiente.

Realizar un análisis acertado de la eficiencia de la criopreservación de ovocitos con el método lento o la vitrificación es una tarea muy difícil debido a la gran variedad de técnicas aplicadas y al tipo de material empleado. Recientemente se ha publicado una *Cochrane Library* (Glujovsky *et al.*, 2014) comparando la vitrificación y la congelación lenta en mujeres bajo tratamiento de fecundación *in vitro*. En este estudio se han incluido solo estudios controlados aleatorizados, y se han comparado la efectividad y la seguridad de ambos protocolos. En conclusión se ha observado un incremento en la tasa de embarazo (*Pregnancy rate*) en la vitrificación comparada con la congelación lenta (RR 3.85, 95% CI 1.63 - 9,11 p=0.0002). También se ha observado un incremento de la sobrevivencia de los ovocitos y un aumento de la tasa de fecundación en el grupo de vitrificación (Glujovsky *et al.*, 2014).

Por último, el grupo de Rienzi y colaboradores han publicado un estudio de meta-análisis (Rienzi *et al.*, 2017). El objetivo de este estudio fue realizar un meta-análisis de los resultados clínicos del protocolo de vitrificación versus congelación lenta. Para ellos solo estudios

controlados aleatorizados han sido seleccionados. En este estudio la superioridad de la vitrificación comparada con la congelación lenta ha sido confirmada, desde el punto de vista de la supervivencia. También ha sido demostrado un aumento en la tasa de nacidos vivos en un ciclo en el caso de la vitrificación y un alto tasa de nacidos vivos/ transferencia embrionaria en el caso del grupo de vitrificación (Rienzi *et al.*, 2017).

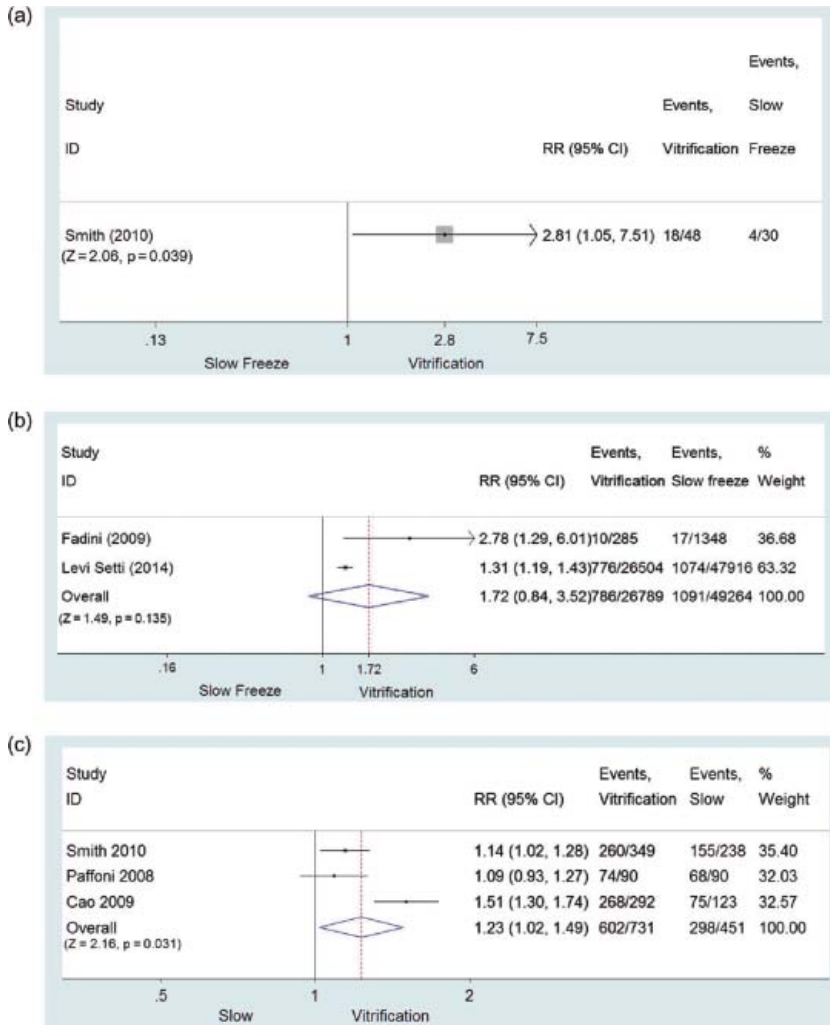


Figura 6 Comparación entre congelación lenta y vitrificación ovocitaria.

(a) Comparación basada en PGC/ciclo por ovocitos: RCT;

(b) Comparación entre PGC/ciclo por ovocitos: estudios de cohortes;

(c) Comparación entre porcentaje de supervivencia: RCTs. CPR, clinical pregnancy rate (Rienzi *et al.*, 2016)

Por estas razones, muchos laboratorios han completamente sustituido el método de la criopreservación lenta por la vitrificación y lo que se busca ahora es que la vitrificación ovocitaria tenga los mismos resultados clínicos que el empleo de ovocitos frescos.

Desde este punto de vista el grupo de Cobo y cols. (2008a) realizaron un estudio evaluándole potencial de la vitrificación de ovocitos utilizando el método Cryotop a través de la comparación de los resultados obtenidos simultáneamente al inseminar ovocitos vitrificados y frescos de una misma cohorte y utilizando la misma muestra de semen. Tras obtener una tasa de supervivencia del 97% no se detectaron diferencias significativas en las tasas de fecundación (76,3 y 82,2%), división en día 2 (94,2 y 97,8 %); día 3 (77,6 % y 84,6%) o las tasas de formación de blastocistos entre ovocitos vitrificados y frescos, respectivamente. Así mismo la morfología fue similar entre los dos grupos (Cobo *et al.*, 2008). Resultados similares se han obtenido en un estudio prospectivo aleatorizado de Rienzi y cols. (2010), donde no observan ninguna diferencia entre ovocitos vitrificados y frescos en el tasa de fertilización y el desarrollo embrionario posterior. Tampoco muestran diferencias significativas en la tasa de embarazos clínicos (Rienzi *et al.*, 2010).

Por ultimo ha sido recientemente publicado el registro estadounidense HOPE (Human oocyte cryopreservation experience), registro de datos de diferentes clínicas como estudio multicéntrico, prospectivo, observacional sobre la comparación de resultados de primer ciclo de TRA con ovocitos con criopreservación lenta vs ovocitos vitrificados, propios o donados y se confirmaron los resultados observados en los estudio anteriores. El porcentaje de embarazo clínico era mayor en el grupo con ovocitos vitrificados, con respecto a la congelación lenta, se encontró un porcentaje mayor de embarazos en el grupo de ovocitos donados vitrificados (Nagy et al 2017).

1.6 COMPLICACIONES OBSTÉTRICAS DE LOS EMBARAZOS TRAS TRA

Unas de las incógnitas que se han planteado en relación a la seguridad de la reproducción asistida han sido si los resultados perinatales tras la utilización de TRA han presentado más problemas que en las gestaciones de concepción natural. Existe la creencia de que el pronóstico obstétrico es sustancialmente peor en las gestaciones obtenidas con TRA. Sin embargo, las diferencias quizás sólo residan en la mayor tasa de gestaciones múltiples. Con el incremento de la utilización de la transferencia de un único embrión (*single embryo transfer, SET*) en más y más países las gestaciones múltiples se están reduciendo dramáticamente (Sullivan *et al* 2012). Otros factores que pueden estar asociados al incremento de la incidencia de complicaciones obstétricas y perinatales puede ser la edad de la paciente, los factores asociados a la infertilidad o factores asociados a los medicamentos utilizados para la estimulación ovárica (Palomba *et al.* 2016, Levi Setti *et al* 2016).

Dentro de las complicaciones obstétricas que se han visto incrementadas o han sido estudiadas en embarazos conseguidos con TRA encontramos principalmente las siguientes:

- Amenazas de aborto y abortos clínicos:

La tasa de aborto tras TRA no está aumentada con respecto a los embarazos naturales, seguramente la tasa de aborto aumenta en los ciclos con ovocitos propios con la edad materna avanzada, en gran parte relacionado con el aumento de aneuploidías en los ovocitos.

En el trabajo de Xiang y cols en 2014, la población de embarazos tras TRA con hematoma intrauterino en el I trimestre, ha sido confrontada con otros embarazos tras TRA sin hematoma. En el grupo de estudio se encontró una mayor incidencia de HTG (OR 2.6) de preeclampsia (OR 2.8) y de hemorragia postparto (OR 3.1). Con respecto al grupo de control la incidencia de placenta previa (OR 8.7) y de oligodramnios (OR 5.6) fue notablemente mayor (Xiang *et al* 2014)

Se describió una incidencia mas elevada de embrión evanescente en embarazos tras TRA con sangrado en el primer trimestre (8,7%) (De Sutter *et al.* 2006) .

En los embarazos gemelares tras TRA el sangrado de primer trimestre se ha relacionado con un bajo peso al nacimiento (Eaton *et al* 2016)

1.6.1 HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR EL EMBARAZO

La preeclampsia sigue siendo hoy por hoy uno de los principales factores de mortalidad y morbilidad, tanto materna como fetal. En un meta-análisis reciente de cinco estudios de cohortes de Qin y cols (2016) compararon las complicaciones de embarazos conseguidos tras TRA (N= 161.370) con embarazos con concepción natural (N= 2.280.41). Los embarazos únicos tras TRA tienen un aumentado riesgo de HTG (RR 1.30), de desprendimiento prematuro de placenta normoinserta (R.R.1.83), de hemorragia ante parto (RR 2.11). En otro meta-análisis de Pandey y cols (2012) se confirmaba un riesgo aumentado de HTG (RR1.4) en los embarazos tras TRA comparado con embarazos de concepción natural. La incidencia de HTG y de preeclampsia está aumentada aún más en los embarazos conseguidos con TRA tras OD (Savasi et al 2016) con un RR entre 2-3 según las diferentes publicaciones.

La preeclampsia, sigue siendo hoy un enigma desde el punto de vista etiológico. Se puede concluir que no está causada por un solo factor sino que tiene una etiología multifactorial. Entre los factores podemos encontrar aquellos relacionados con la placenta y otros de tipo materno.

Entre los factores maternos podemos encontrar, la edad de la paciente (parece ser que el riesgo se incrementa en un 30% por cada año adicional desde los 34 años), la gestación múltiple, la presencia de enfermedades previas, como enfermedades autoinmunes o el síndrome antifosfolipídico.

Existen diferentes estudios que evalúan la aparición de estados hipertensivos durante el embarazo tras TRA. Algunos trabajos observan una mayor incidencia de aparición de hipertensión gestacional (HTG) y preeclampsia en las gestaciones únicas conseguidas por TRA, frente a las gestaciones sin TRA (Thomson *et al* 2005, Jackson, *et al.* 2004) Otros trabajos comparan la técnica de reproducción asistida con la aparición de HTG, demostrando un

aumento del desarrollo de trastornos hipertensivos durante embarazos conseguidos tras FIV o ICSI frente a las tratadas con inseminación artificial (Chen *et al.*, 2009). En particular se ha considerado el riesgo de hipertensión en embarazo tras DO, en un metanálisis donde se estudiaron 28 trabajos, el riesgo calculado de HTG era de 2.57 (IC al 95%:1,91-3,47) comparado con los TRA con ovocitos propios; mientras si se calculaba el riesgo de HTG comparado con el grupo control era 6,6 (IC al 95%: 4,55-9,57) (Pecks *et al.*, 2011).

Más recientemente se han publicado diferentes estudios de meta-análisis que hacen referencia a la aparición de HTG en embarazos tras TRA. Es el caso del trabajo de Pandey et al (2012) que incluyendo 15 estudios diferentes observa un aumento significativo del riesgo de HTG tras TRA comparado con los embarazos de concepción natural (Tabla IV).

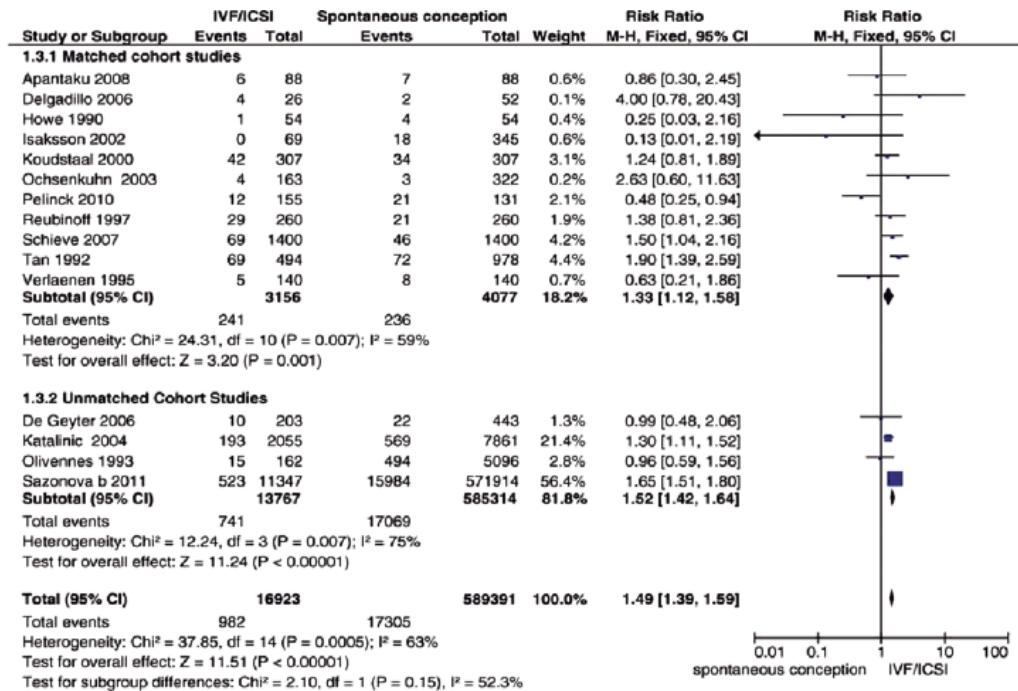


Tabla IV Enfermedades hipertensivas durante el embarazo (FIVET/ICSI vs embarazos naturales (Pandey et al, 2012)

1.6.2 DIABETES GESTACIONAL:

No existen muchos estudios que describen si existe un aumento del riesgo de DG en un embarazo tras TRA. Uno de los más recientes meta-análisis (Pandey *et al.*, 2012) observan un incremento de riesgo de DG en pacientes que han sido tratadas con alguna técnica de reproducción asistida frente a pacientes con embarazo de concepción natural (riesgo relativo de 1.48 [IC al 95%: 1.33-1.66]). En esta meta-análisis solo 6 estudios fueron incluidos con un total de 13399 embarazos tras TRA. Una de las posibles explicaciones sería la mayor prevalencia en el grupo TRA de pacientes con síndrome de ovario poliquístico, asociado a la esterilidad y a la resistencia a la insulina (Thatcher *et al.*, 2006). En otro metanálisis recién publicado el riesgo de diabetes gestacional fue calculado (RR 1.31, [IC al 95%: 1.13-1.53]) siempre considerando embarazos tras TRA comparados con embarazos naturales (Qin *et al.*, 2016)

1.6.3.- PATOLOGÍA PLACENTARIA:

Clásicamente se describen entre los factores de riesgo del desprendimiento prematuro de la placenta normoinserta (DPPNI) la edad materna avanzada, los embarazos múltiples, y la TRA.

El riesgo de patologías placentarias en gestaciones conseguidas mediante TRA podría estar aumentado. Si el riesgo se debe a factores propios de TRA o a factores de origen materno todavía es una cuestión desconocida. Existen algunos trabajos que indican una mayor prevalencia de placenta previa en las gestantes con TRA (Romundstad *et al.* 2006). También se ha visto aumentado el riesgo de DPPNI en embarazos únicos tras TRA (Sebastiani , *et al.* 2009).

Resultados diferentes se han observado en trabajos de metanálisis más recientes como el estudio de Pandey *et al.* (2012) donde valorando seis estudios (n=14141) no observa un aumento significativo de DPPNI en embarazos TRA comparando con embarazos naturales (RR 1,16 [IC al 95%: 1,07-1,26]). En otro metanálisis recién publicado por Qin y cols (2016) el riesgo de DPPNI fue moderadamente aumentado (R.R. 1.83 [IC al 95%:1.49-2.24])

1.6.4. ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS

Las membranas fetales normalmente se rompen de forma espontánea durante el trabajo de parto, probablemente debido a los efectos de las contracciones uterinas repetidas. La rotura espontánea de las membranas fetales antes del comienzo del parto se denominada rotura prematura de membranas y es independientemente de la edad gestacional. La RPM pretérmino se define como la RPM que se produce antes de las 37 semanas de gestación.

El riesgo de RPM en gestaciones conseguidas mediante TRA podría estar aumentado, aunque existen pocos trabajos científicos al respecto. En un reciente estudio de metanálisis de Pandey et al (2012), tras considerar la gran heterogeneidad entre los trabajos incluidos, no encontraron ninguna diferencia significativa entre el riesgo de sufrir RPM en embarazos con TRA y embarazos naturales. Más recientemente en un meta-análisis realizado por Qin y colaboradores (2016), analizando solo los embarazos únicos, encontraron un aumento del riesgo de RPM en embarazos únicos tras TRA (n= 3028) comparando con embarazos naturales (n=28.306) con un RR de 1.31 (0.72–2.38), aunque reconocían que la heterogeneidad de los estudios incluidos en este meta-análisis fue muy elevada.

1.6.5. AMENAZA DE PARTO PRETÉRMINO:

Se ha descrito un incremento en la incidencia de recién nacidos prematuros y recién nacidos con bajo peso en TRA (Doyle *et al.*, 1992, Olivennes *et al.*, 1993).

Existe un gran número de estudios que establecen una mayor incidencia de prematuridad en gestaciones conseguidas con técnicas de reproducción asistida.

Algunos autores postulan como factor etiopatogénico las gonadotropinas utilizadas para la estimulación ovárica como un factor determinante de la prematuridad asociada a TRA (Mushayandebvu *et al.*, 1998). Una de las causas es la formación de múltiples cuerpos lúteos, los cuales producen relaxina. La relaxina regula la actividad metaloproteínásica en la arquitectura del tejido conectivo, produciendo elevación de la procolagenasa MMP-1 y la protomielina MMP-3, ambos de gran importancia en el metabolismo de degradación del

colágeno. En la mujer embarazada, la degradación del colágeno normalmente desempeña un importante papel en el incremento de la elasticidad necesaria para la dilatación de la cervix durante el parto. Así mismo, se ha visto que la relaxina contribuye a la estimulación y contractilidad uterina. Se ha observado que los niveles de relaxina en las embarazadas con TRA persisten elevados durante todo el embarazo. Estos niveles elevados pueden ser los responsables de los cambios cervicales precoces anteparto y la subsiguiente predisposición a un parto prematuro (Mushayandevu *et al.*, 1998).

En general, como ya se ha comentado anteriormente, en los estudios publicados existe un incremento del riesgo relativo de Prematuridad en gestaciones conseguidas con TRA (Pandey *et al.*, 2012). No obstante, existe una gran variabilidad en los resultados publicados por los distintos autores.

En un meta-análisis reciente (McGovern *et al.*, 2014) se compara el incremento de prematuridad considerando solo gestaciones únicas conseguidas con TRA vs gestaciones naturales y se observa un aumento de RR de 1,98 (IC al 95%: 1,77-2,22). En un estudio previo (McDonald *et al.*, 2005), el OR de riesgo de prematuridad es de 1,93 (IC al 95%: 1,36-2,74). En este estudio se observa también un incremento del riesgo de grandes prematuros (< 33 semanas): OR 2,99 (IC al 95%: 1,54-5,80) (McDonald *et al.* 2005). En este último meta-análisis (McDonald SD *et al.*, 2005), se hace una revisión sistemática incluyendo 31.032 gestaciones únicas concebidas tras FIV/ICSI y 81.119 gestaciones espontáneas. Los autores concluyeron que existía un aumento del riesgo de prematuridad en gestaciones tras TRA del orden de RR 1,52 (IC al 95%: 1,01-2,30) en gestaciones entre 32-36 semanas y del orden de RR 2,27 (IC al 95%: 1,73-2,95) en gestaciones <32 semanas. Resultados muy parecidos encuentra el meta-análisis realizado por Pandey y cols. (2012) que observa un mayor riesgo de prematuridad (< 32 semanas) con un RR 1,68 (IC al 95%: 1,48-1,91) en gestaciones tras FIV/ICSI comparando con concepciones espontáneas (Pandey *et al.*, 2012).

Uno de los últimos estudios de meta-análisis que han analizado el incremento del riesgo de prematuridad en niños tras TRA es el estudio de Qin *et al.* (2016). En este estudio han sido incluidos 161.370 niños nacidos tras TRA comparándolos con 2.280.241 niños concebidos de forma natural. Al igual que los anteriores trabajos, la fuerza de este estudio de meta-

análisis es que ha incluido solo estudios donde se analizan las gestaciones de un único niño por tanto el error debido a la presencia de embarazos múltiples es descartado. En conclusión, encuentran un incremento significativo del riesgo de parto pretérmino < de 37 semanas de embarazo y de parto muy prematuro (< de 32 semanas de gestación) en niños nacidos post-TRA comparando con los concebidos de forma natural (Qin *et al.*, 2016).

Pero también encontramos en la bibliografía estudios donde no hay diferencias significativas en las tasas de prematuridad asociadas a las gestaciones tras TRA respecto a las gestaciones espontáneas (Ombelet W., *et al* 2005, De Neubourg D. *et al.*, 2006). Uno de los últimos estudios donde no se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos es el estudio de Sanchis Calvo y cols (2009): estudio prospectivo que recoge 7.008 nacidos de los cuales 113 correspondían a gestaciones tras TRA. Uno de los puntos débiles de estos últimos estudios es el pequeño número de nacidos vivos incluidos en el estudio. Así mismo, no podemos olvidar que el factor esterilidad *per sé* conlleva a un riesgo intrínseco asociado de mayor tendencia de parto pretérmino.

En un ultimo estudio reciente de Sunkara y sus colaboradores (Sunkara *et al.*, 2016) en el cual fueron analizados todos los nacimientos tras TRA entre el 1991 y 2011 registrados por parte del *Human Fertilisation and Embryology Authority*

Tabla V Resultados obstétricos en embarazos únicos tras TRA (Qin et al., 2016)

Meta-analysis of association between ART and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies.						
Adverse pregnancy outcome	No. of studies	ART singletons (n)	SC singletons (n)	RR (95% CI)		Measure of heterogeneity
				from fixed-effects models	from random-effects models	
				Q	P	I ² (%)
Preterm birth	36	133,338	1,289,549	1.70 (1.67-1.74)	1.71 (1.59-1.83)	171.67 < .00001
Very preterm birth	25	128,547	1,253,013	2.75 (2.62-2.88)	2.12 (1.73-2.59)	234.52 < .00001
Low birth weight	36	130,147	1,062,445	1.69 (1.64-1.73)	1.61 (1.49-1.75)	175.76 < .00001
Very low birth weight	30	127,088	980,322	2.18 (2.06-2.30)	2.12 (1.84-2.43)	88.63 < .00001
Small for gestational age	14	81,090	753,771	1.49 (1.44-1.54)	1.35 (1.20-1.52)	72.20 < .00001
Perinatal mortality	22	106,267	1,262,997	1.57 (1.46-1.70)	1.64 (1.41-1.90)	38.24 .01
Congenital malformations	28	77,697	724,300	1.32 (1.27-1.36)	1.37 (1.29-1.45)	45.43 .01
Intrauterine growth restriction	2	708	1,240	1.08 (0.60-1.97)	1.11 (0.32-3.94)	4.49 .03

Qin. *Poor outcomes in assisted pregnancies. Fertil Steril* 2015.

(HFEA), (N= 591.003 ciclos FIV frescos ± ciclos de ICSI de los cuales , N=584 835 ciclos de FIV estimulados y N=6168 ciclos de FIV no estimulados) . Cada resultado perinatal fue corregido según posibles factores de confusión con regresión logística (edad materna, causa de infertilidad, número de antecedentes ciclos de FIV y paridad), pero no se corrigió según las características de las pacientes con respecto al IMC, tabaquismo y a los antecedentes médicos. No hubo diferencia en la incidencia de parto pretérmino o recién nacidos de bajo peso (<2500 g) entre los embarazos de FIV estimulados y no estimulados (OR 1.27 [IC al 95%:0.80-2.00] y OR 1.48 [IC al 95%:0.90-2.42], respectivamente). Ajustando los datos por posible factores de confusión el riesgo de parto pretérmino y de recién nacidos de bajo peso (aOR 1.43 [IC al 95%:0.91-2.26] y aOR 1.58 [IC al 95%: 0.96-2.58], respectivamente) tampoco mostró diferencias significativas entre embarazos tras FIV estimulados y no estimulados.

Por tanto, y a pesar de todos estos estudios, la asociación del mayor riesgo de parto pretérmino y la utilización de técnicas de fecundación asistida debe ser todavía corroborada a través de más estudios.

1.6.6 EMBARAZO MÚLTIPLE:

Los partos múltiples continúan siendo hoy por hoy el mayor riesgo de las parejas que necesitan tratamientos de fertilidad. Las gestaciones múltiples espontáneas ocurren en 1 de cada 90 embarazos, en cambio en la era de los tratamientos de reproducción asistida e ha incrementado el número de partos múltiples, y así, la incidencia de gemelos es actualmente de 1 por cada 45 partos en los Estados Unidos. En el caso del Reino Unido casi la mitad (46 %) de los recién nacidos que nacen con TRA provienen de una gestación múltiple.

Cada vez existe una mayor consciencia sobre este riesgo en las clínicas de fecundación asistida y se aboga por una reducción del número de embriones transferidos. Actualmente debido a las complicaciones obstétricas y perinatales que acarrear los embarazos múltiples sobre todo en pacientes de edad avanzada, se está tratando de transferir un solo embrión (SET), que sea de gran calidad en parejas con un buen pronóstico. Además, mediante la transferencia de un solo embrión también se evitarían los riesgos derivados de los fenómenos de embriorreducción o evanescencia embrionaria de las gestaciones múltiples.

1.6.7 OTRAS COMPLICACIONES OBSTÉTRICAS:

- *Retraso de crecimiento intrauterino (RCIU):*

En el trabajo de Hu y colaboradores (2014), se ha relacionado el nivel aumentado de estrógenos (>2500 pg/ml) al final de la estimulación ovárica para TRA con una alteración mayor de la placenta que podría explicar la mayor tasa de RCIU (Hu *et al* 2014). En una análisis de 402.185 ciclos de FIV entre 1991 y 2008 con 65.868 embarazos únicos se analizaron los resultados perinatales, registrados en la base de datos del *Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA)*. Se encontró un riesgo aumentado de bajo peso al nacimiento y de parto pretérmino en aquellos embarazos tras TRA con mayor número de ovocitos recuperados (>20) (Sunkara *et al.*, 2015). En un estudio retrospectivo reciente se evaluó la incidencia de RCIU en una población de mujeres infértiles (N= 748) sometidas a TRA o simplemente a inducción de la ovulación, respecto a pacientes fértiles (N=200), el RCIU estuvo significativamente aumentado en las pacientes infértiles (aOR 1.9) vs inducción de la ovulación (aOR 2.7) vs FIV/ICSI (aOR 2.6). Esta asociación se mantuvo estadísticamente significativa incluso cuando se ajustó por edad materna y embarazos múltiples (Valenzuela-Alcaraz *et al.*, 2016)

- *Colestasis intrahepática del embarazo*

Esta complicación del embarazo se verifica normalmente en el segundo o tercer trimestre, posiblemente esta condición esta relacionada con los niveles elevados de estradiol. En literatura han sido comentados algunos casos de colestasis intrahepática como complicación de estimulación ovárica para FIV en una condición de SHO moderato (Mutlu *et al.*, 2017). En un trabajo previo con informe de dos casos de colestasis intrahepática en el primer trimestre, por Zamah y cols (2008) las dos pacientes de 32 años de edad, mostraban una condición de insulino resistencia por la cual eran en tratamiento durante la estimulación ovarica con metformina, la primera paciente empezó tratamiento con ursodeoxicólico ácido para mejorar el picor, durante el primer trimestre por la colestasis llegando al parto, la segunda hubo un aborto del primer trimestre, tras una condición de SHO leve-moderado tardío a la positivización del test de embarazo. En confirmación del hecho que esta complicación está relacionada con

niveles de estrógenos elevados basta con observar que su incidencia aumenta hasta 5 veces más en los embarazos múltiples. Seguramente está descrita una predisposición genética familiar y algunas etnias con mayor incidencia.

- Anemia gestacional

En el estudio prospectivo de cohortes de Qin y cols (2017) se analizaron desde 2013 al 2016, los resultados perinatales de 1260 pacientes de ciclos de FIV/ICSI, 1899 de mujeres infértiles y de 2480 pacientes fértiles, se encontró una mayor incidencia de anemia durante el embarazo (aOR = 2.17) [IC al 95% 1.42-3.31] (Qin et al. 2017)

- Infección del tracto urinario

En la literatura no se encuentran muchos trabajos recientes que analicen la relación entre las infecciones urinarias y los TRA. En un estudio de Reubinoff y cols (1997) se analizaron 206 embarazos únicos tras FIV y 260 embarazos naturales emparejados 1:1 por la edad materna, la paridad, la raza, y la edad gestacional en el momento del parto. La infección del tracto urinario fue la única complicación diagnosticada con una incidencia mayor tras FIV (7.3% versus 1.2%), pero si se consideraban los casos de infección urinaria grave que necesitaron de ingreso hospitalario fueron similares (Reubinoff *et al.*, 1997).

1.6.8 ANOMALÍAS CONGÉNITAS:

Desde que nació la fecundación asistida gradualmente ha sido aceptada como una técnica segura generalmente debido a la información básica que existe en diferentes registros (Cohen *et al.*, 1988, Beral V. *Et al* 1990; Medical Research International, Society for Assisted Reproductive Technology (SART) and the American Fertility Society, 1992; Lancaster *et al.*, 1996).

Desde el inicio la preocupación por la seguridad ha sido importante y se han publicado diferentes estudios para valorar si estas técnicas determinan una incidencia aumentada de malformaciones congénitas con respecto a los recién nacidos vivos tras gestación espontánea.

La incidencia de malformaciones congénitas es diferente según los diferentes estudios publicados.

Antes de entrar en detalle con los estudios realizados en este ámbito conviene hacer algunas observaciones sobre los problemas metodológicos que se encuentran en la mayoría de estos estudios (Chian *et al.*, 2008; Noyes *et al.*, 2009).

- La mayoría de los estudios son observacionales
- La muestra estudiada resulta insuficiente para evaluar con fiabilidad posibles diferencias en la aparición de anomalías congénitas de muy baja prevalencia en la población general.
- Los grupos de estudio no son homogéneos: algunos estudios incluyen gestaciones tras FIV, otros incluyen ICSI solo, otros ambos.
- No se especifica en algunos estudios si se han incluido embriones congelados, frescos o sometidos a diagnóstico genético preimplantacional, etc.
- Por último, no existe consenso para la clasificación de las anomalías congénitas en malformaciones mayores y menores.

Por tanto, la evaluación de si las técnicas de TRA incrementan el riesgo de anomalías congénitas es extremadamente difícil. Aun así, en la bibliografía encontramos diversos estudios que han intentado evaluar este efecto.

Uno de los primeros estudios que evidenció un aumento de malformaciones en recién nacidos después de fecundación asistida fue el estudio de Lancaster (1987) que observó un incremento estadísticamente significativo de dos tipos de defectos congénitos: defectos en el tubo neural y la transposición de grandes vasos sanguíneos, en recién nacidos tras reproducción asistida comparados con nacidos vivos tras gestación de concepción natural.

Otros estudios han confirmado un aumento del riesgo de defectos en el tubo neural (por ejemplo hidrocefalia o anencefalía) y un aumento de atresia esofágica, en recién nacidos tras FIV (Bergh *et al.*, 1999).

La problemática se presenta con la duda de si la mayor incidencia de malformaciones congénitas evidenciada en estos artículos puede ser debido al uso de la reproducción asistida o a otros factores que pueden alterar estos resultados como la edad materna, diferente paridad, a la infertilidad en sí, enfermedades crónicas, etc. (factores que más adelante trataremos en profundidad).

Estudios de meta-análisis más recientes han tenido en cuenta la introducción de la ICSI en los centros de reproducción asistida. Uno de los más recientes el estudio de Rimm y colaboradores (2011) que tiene en cuenta el efecto de la subfertilidad en los datos extraídos, concluyendo que el aumento del riesgo de malformaciones en recién nacidos post TRA no es estadísticamente significativo. Diferentes resultados los encontramos en un estudio de meta-análisis de Wen y colaboradores (2012) que concluyen que existe un aumento significativo del riesgo de defectos congénitos en recién nacidos post TRA pero no encuentran ninguna diferencia significativa comparando las dos técnicas utilizadas (FIVET e ICSI). Resultados similares encontramos en los trabajos de Bonduelle (2002) y Lie (2005) que no demuestran un aumento significativo del riesgo de malformaciones en neonatos concebidos con la técnica estándar FIVET comparándolos con la ICSI.

Otro aspecto que merece mencionar por su actualidad, es si las TRA influyen los fenómenos de impronta genómica (*imprinting*). La impronta genómica es un fenómeno de silenciamiento de determinados genes por el cual solo se expresa un alelo parental en el nuevo individuo. La expresión anómala de algunos de estos genes se ha relacionado con diferentes trastornos genéticos como los síndromes de Prader-Willi, de Angelmanm o de Beckwith-Wiedmann. Cambios en la epigenética, en la función del ADN sin cambios en la secuencia nucleotídica se producen durante dos momentos muy importantes de la fecundación y de la implantación. Durante la gametogénesis algunos genes específicos con un papel en el crecimiento y en la diferenciación están sometidos a metilación que bloquea la transcripción alélica. Alteraciones en la expresión uniparental necesaria de estos genes clave del crecimiento y del desarrollo han sido reproducidas en modelos animales, determinando una aberración del crecimiento y del desarrollo. Algunos genes con expresión paterna e *imprinting* materno, como PLAGL1, PEG, MEST, IGF2, PEG3 favorecen el crecimiento fetal, mientras otros genes con expresión materna e *imprinting* paterno como IGF2R, GRAB10, H19, CDKN1C, TSSC3, MASH2, MEG3 facilitan el control del crecimiento fetal. El diferente momento de *imprinting* de los gametos masculinos (durante el desarrollo embrionario) y femeninos (durante la ovulación y la fertilización) podría ofrecer una interpretación de las condiciones específicas de *imprinting* durante los tratamientos de fecundación *in vitro*. Cómo la incidencia absoluta de trastornos de la impronta genómica es muy baja (< 1/12000 nacimientos) actualmente no se recomienda

el cribado rutinario de estas enfermedades en los niños nacidos por TRA y más teniendo en cuenta que esta asociación sigue siendo controvertida (Manipalviratn *et al.* 2009), sobre todo porque las evidencias apuntan a que la asociación es debido más a la propia infertilidad que a los tratamientos de reproducción asistida.

Estudios más recientes (Gentilini *et al.*, 2015) sobre la metilación del ADN de muestras de sangre, de los niños nacidos tras técnica de fecundación *in vitro* aparentemente no demuestran un nivel más elevado de metilación del ADN comparados a niños nacidos tras embarazos de concepción natural. Este dato reduciría la responsabilidad de las técnicas de reproducción asistida como FIV, ICSI y criopreservación de los gametos en aumentar la tasa de anomalías congénitas. En general, los estudios de epigenética asociada a TRA son muy pocos. Por tanto, se necesitan más estudios para poder establecer si existe en realidad un papel de las TRA en los fenómenos epigenéticos del recién nacido (Palermo *et al.*, 2008).

Por último, podemos concluir que la gran problemática de estos estudios, como ya se ha mencionado, es la gran variabilidad entre ellos, la problemática de la corrección de los datos estadísticos por diferentes factores de confusión que no siempre se tienen en cuenta y sobre todo la identificación de un grupo control apropiado resulta crucial para establecer comparaciones fiables (Fauser *et al.*, 2014).

Se puede introducir un sesgo si el grupo de control es reducido y presenta una incidencia de malformaciones mayores inferior a la esperada en la población general. Otros estudios realizan comparaciones entre diversas TRA y no comparan la incidencia de defectos congénitos con los embarazos concebidos de forma natural. (Neri *et al.* 2008). Además, existen muchas dudas en la actualidad sobre si es la propia infertilidad que constituye un factor de riesgo y no la TRA *per se* (Bukulmez 2009). La única forma de averiguar si esto es así, sería estableciendo un grupo control compuesto por población infértil que queda gestante espontáneamente (sin necesidad de recurrir a ningún tratamiento de infertilidad o TRA) o alternativamente, el grupo control podría constituirse entre población fértil que se somete a TRA por otros motivos (ej. Pacientes con ligadura tubárica, vasectomizados, o portadores del virus de inmunodeficiencia humana) (Olivennes, 2005).

También deberíamos analizar el nivel de atención y vigilancia pre y post natal que reciben los

embarazos post-TRA en comparación con los cuidados recibidos por los embarazos concebidos de forma natural. La vigilancia más intensiva favorecería la detección de defectos mínimos. Si así fuera, estaríamos introduciendo un sesgo importante que dificultará enormemente la correcta interpretación de los resultados por la posible sobreestimación del riesgo de anomalías congénitas en TRA e infraestimación en embarazos naturales (Olivennes, 2005).

En general, el análisis de defectos congénitos requiere el estudio de poblaciones más amplias. Por ello, es extraordinariamente difícil diferenciar el papel de la condición de ser infértil y de los tratamientos de la infertilidad respecto al riesgo de anomalías congénitas. Por tanto, podemos concluir que estudios con un mejor control, más amplios, multicéntricos, de tipo prospectivo y con seguimientos a largo plazo son todavía necesarios para evaluar la posible implicación de la fecundación asistida en la incidencia de anomalías en los recién nacidos post-TRA.

Existen diversos trabajos en los que se ha observado un aumento del riesgo de anomalías congénitas estructurales en los embarazos conseguidos con TRA (Anthony *et al.*, 2002, Rimm *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2005). En un metanálisis reciente (Wen *et al.* 2012) se analizaron los resultados de diferentes estudios (56 estudios) sobre la tasa de malformaciones de los niños tras TRA versus el embarazo espontáneo, se encontró un riesgo mayor de 1,37 (95%CI 1,26-1,48) mientras no se encontraron diferencias estadísticamente significativa entre las dos técnicas de TRA (ICSI vs FIVET).

En general, se desconoce qué factores podrían explicar la asociación entre TRA y los defectos congénitos pero se han descrito una serie de hipótesis aunque ninguna ha sido confirmada (Bukulmez *et al.* 2009, Farhi *et al.* 2007):

1.6.8.1 La técnica de reproducción asistida

Podrían estar implicados diversos factores relacionados con la técnica de reproducción asistida: la selección artificial de espermatozoides, la manipulación de los gametos, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en ICSI; la manipulación de los embriones durante el proceso de congelación/descongelación (o más recientemente durante la vitrificación) o en

caso de realizarse una biopsia de trofocodermo para la realización de un diagnóstico genético preimplantacional; las condiciones de los medios de cultivo *in vitro* durante los estadios más precoces del desarrollo embrionario; etc.

1.6.8.2 La propia infertilidad

Esta la teoría más aceptada en la actualidad. Se piensa que las características de la población infértil, así como la duración y causa de la esterilidad, son las que pueden inducir un mayor riesgo de anomalías congénitas. En este apartado se incluyen varios factores posibles. En primer lugar la edad avanzada materna y paterna que, por si misma ya es un factor de riesgo de anomalías. Otros factores implicados son: las características del semen patológicos, un entorno intratubárico desfavorable, la alteración del microambiente intrauterino durante la implantación, etc.

1.6.8.3 El tratamiento de la infertilidad

Se ha comentado la posible influencia de la medicación utilizada durante la estimulación ovárica (las altas dosis de gonadotropinas podrían alterar el proceso de maduración de los ovocitos), la exposición a dosis suprafisiológicas de estradiol o tratamiento de soporte de la fase lútea.



Justificación

2

La necesidad de criopreservar ovocitos humanos no solo obedece a requerimientos específicos del manejo y tratamiento de la infertilidad, si no que constituye una opción muy atractiva para la preservación de la fertilidad tanto en pacientes con cáncer como en mujeres sanas.

En el caso de la paciente infértil, existen una serie de indicaciones en las que la criopreservación de ovocitos es de gran utilidad para resolver diferentes situaciones clínicas o incidencias acaecidas durante el ciclo de estimulación.

Algunas de estas indicaciones serían: ausencia de semen de la pareja, ya sea por patología seminal como en los casos de azoospermia o falta de espermatozoides móviles en la biopsia de testículo, o por cuestiones meramente circunstanciales como el que la pareja haya tenido que ausentarse el día de la punción ovárica.

Otro grupo de pacientes que se pueden beneficiar del almacenaje de sus propios ovocitos son las bajas respondedoras, en las que el escaso número de ovocitos recuperados tras la punción ovárica dificulta o merma las posibilidades de éxito. En estas pacientes la acumulación de

ovocitos metafase II (MII) provenientes de 2 o 3 ciclos de estimulación, en teoría aumentaría la capacidad de selección embrionaria y por tanto las posibilidades de gestación.

En líneas generales todas aquellas pacientes en las que esté contraindicada la transferencia de embriones en fresco son candidatas a criopreservación de ovocitos. Entre ellas encontramos las pacientes en riesgo de sufrir el síndrome de hiperestimulación ovárica, pacientes que presentan línea endometrial inadecuada o sangrado el día de la punción ovárica, presencia de pólipos, ovario poliquístico (PCO) etc.

La criopreservación de ovocitos es hoy por hoy la mejor opción para salvaguardar la fertilidad en pacientes en riesgo de presentar fallo ovárico ya sea de forma iatrogénica, generalmente por tratamiento oncológico, o como consecuencia de un proceso patológico que desemboque en un fallo ovárico precoz (FOP) o simplemente a causa del proceso natural de la pérdida de ovocitos.

Hasta hace algunos años la problemática del deseo reproductivo en pacientes oncológicas era casi inexistente, dada la baja supervivencia al cáncer. Sin embargo hoy en día la realidad es bien distinta, en la actualidad las diferentes terapias oncológicas, están aumentando la supervivencia al cáncer, hecho que también ha aumentado la población de adultos jóvenes, que una vez, superada la enfermedad, desean ser madres/padres. No obstante, estas terapias frecuentemente son responsables de fallo gonadal e infertilidad lo que a menudo genera angustia, baja autoestima y una merma considerable de la calidad de vida en estos pacientes (Yap et al., 2007).

El abordaje de este problema es posible hoy en día, gracias a los avances tecnológicos conseguidos a través de la criobiología aplicada a la reproducción asistida, podemos ofrecer la criopreservación de ovocitos previamente al tratamiento oncológico, para afrontar el nuevo reto preservar la fertilidad de las pacientes con cáncer.

Otro grupo de mujeres potencialmente beneficiarias de la criopreservación de ovocitos está conformado por aquellas mujeres sanas que voluntaria o involuntariamente posponen su maternidad. Esta opción es cada vez más frecuente, observándose una elevada proporción de mujeres que desean hacerlo a edades reproductivas avanzadas. Sin embargo, para la gran

mayoría de ellas, alcanzar la maternidad puede ser una tarea realmente difícil o incluso imposible debido a la disminución de la fertilidad como consecuencia del proceso natural de la pérdida de ovocitos.

Este proceso ocurre de manera espontánea desde la vida fetal hasta la menopausia y es consecuencia de la depleción natural de la reserva ovárica. Se estima que la atresia folicular acelerada comienza hacia la mitad de la treintena incrementándose hacia los 37 años (Lobo et al., 2003). Concomitantemente la calidad ovocitaria también se ve disminuida, de ahí que el potencial fértil de la mujer sufra una merma considerable.

Este proceso fisiológico, coincide en muchos casos con el periodo más crítico para establecer una carrera profesional, y en general para el desempeño de otros roles y el desarrollo de otras búsquedas. Podría decirse que la naturaleza deja en desventaja a las mujeres frente a los hombres, ya que un varón sano puede producir millones y millones de espermatozoides cada día, y además puede conservar su capacidad reproductiva hasta la madurez. Llegados a este punto, resulta una obviedad que en el caso de las mujeres se hace necesaria una estrategia que permita conservar sus gametos, de tal manera que puedan ser usados posteriormente cuando ella lo desee.

No obstante, el desequilibrio natural entre varones y mujeres no solo se manifiesta en la capacidad de producción de gametos sino también en la facilidad para criopreservarlos con éxito. Los espermatozoides pueden ser fácilmente obtenidos, congelados, almacenados y utilizados en pequeñas alícuotas. De hecho, los bancos de semen y el uso de semen autólogo congelado constituyen una herramienta de gran utilidad en reproducción asistida (RA) ofreciendo muy buenos resultados desde hace ya muchos años. En contraste, la obtención de gametos femeninos requiere la previa estimulación y punción ovárica y por otra parte, su almacenaje y uso ha planteado serios problemas biológicos técnicos e incluso legales en algunos países.

Pese a que se ha trabajado arduamente en esta área, durante casi 30 años no se habían conseguido resultados consistentes y que ofrecieran garantías para su aplicación rutinaria. El interés en esta materia ha crecido vertiginosamente durante los últimos años, lo que ha contribuido grandemente al desarrollo de la criopreservación de ovocitos. Avances recientes en

los métodos de vitrificación han hecho posible que se consiga una supervivencia por encima del 90% y tasas de gestación comparables a las conseguidas con ovocitos frescos (Antinori et al. 2007- Chian et al. 2005- Katayama et al. 2003- Kuwayama et al. 2007- Selman et al. 2006- Yoon et al. 2007).

Nuestra primera experiencia clínica con esta técnica fue obtenida a través de nuestro programa de ovo-donación (Cobo et al. 2008a). Gracias a las obvias ventajas que plantea el disponer de ovocitos almacenados en bancos para su posterior donación, esta estrategia resulta sumamente atractiva para satisfacer la gran demanda de este tipo de pacientes en nuestro centro, disminuyendo considerablemente e incluso eliminando las listas de espera, además de no requerir la sincronización donante receptora. Por otra parte, la adecuada cuarentena de los ovocitos en el banco, de manera análoga al funcionamiento de los bancos de semen, hace de éste un programa más seguro.

Con el fin de evaluar el potencial de los ovocitos vitrificados-desvitrificados, Cobo y sus colaboradores (2008) planificaron un estudio prospectivo aleatorizado de cohortes que incluyó 30 donantes con sus respectivas receptoras (Cobo et al. 2008). La técnica de vitrificación empleada, el método Cryotop, pertenece a las llamadas técnicas de mínimo volumen, debido a que la muestra es vitrificada en un volumen muy pequeño ($\sim 0,1 \mu\text{l}$). En este estudio hemos vitrificado la mitad de los ovocitos de una misma donante mientras que los otros permanecieron en la incubadora. Al cabo de una hora, se desvitrificaron los ovocitos. Al cabo de 2 horas tras la desvitrificación se realizó el ICSI simultáneamente en los dos tipos de ovocitos: frescos y vitrificados. Este modelo ofrece la gran ventaja de poder evaluar concomitantemente el potencial de ovocitos vitrificados y frescos de una misma cohorte, que además han sido inseminados simultáneamente con el mismo semen (Cobo 2008). Un total de 224 ovocitos de 234 sobrevivieron a la vitrificación, lo que implica un 97% de supervivencia, esta cifra es realmente sorprendente si se compara con la obtenida con otras técnicas de criopreservación incluida la vitrificación. Por otra parte, la tasa de fecundación (76,3%), división (77,6 vs. 84,6%), calidad embrionaria (80,8 vs 80,5%), desarrollo a blastocito (48,7 vs. 47,4%), fueron similares en ovocitos vitrificados y frescos respectivamente. Estos hallazgos indican que el desarrollo embrionario no se ha afectado tras la vitrificación, hecho que indica que los ovocitos vitrificados conservan intacto su potencial

para desarrollar embriones competentes. Por otra parte, los resultados clínicos conseguidos en este estudio aportan la mayor evidencia acerca de la viabilidad de los ovocitos vitrificados, ya que el objetivo final de cualquier técnica de criopreservación, no es solo obtener altas tasas de supervivencia, sino conseguir gestaciones capaces de evolucionar a término, con el resultado final de bebé en casa. Por otra parte, podemos decir que la máxima eficiencia de cualquier técnica de criopreservación está relacionada con la capacidad de equipar los resultados a los obtenidos con ovocitos frescos. Así pues, las tasas de gestación e implantación (65,2 y 40,8% respectivamente) obtenidas con ovocitos vitrificados, son similares a las obtenidas en nuestro programa de ovo-donación con ovocitos frescos. El resultado final de esta experiencia fue un total de 19 recién nacidos sanos, gestados a partir de ovocitos vitrificados. Por el contrario en un metanálisis de Oktay y sus colaboradores, se analizó la tasa de embarazo por transferencia embrionaria con tratamiento de ICSI con ovocitos frescos y criopreservados antes del 2005 (congelación lenta por la mayoría) fue respectivamente del 60%, del 4 y del 6,6%, (Oktay et al 2006, Oktay et al 2005)

En otra metanálisis del 2007 de Gook y Edgar, sobre la criopreservación ovocitaria, consideraron diferentes trabajos por la mayoría que trataban de criopreservación con congelación lenta, no describían resultados muy optimistas sobre la tasa de sobrevivencia y del porcentaje de embarazo. (Gook et al 2007)

Muy recientemente Cobo y colaboradores publicaron un ensayo clínico controlado aleatorizado cuyo objetivo fue evaluar los resultados de ovocitos vitrificados donados con respecto al procedimiento estándar con ovocitos frescos (Cobo et al. 2010). Este estudio fue diseñado como un ensayo de superioridad del fresco sobre el vitrificado (likely hood ratio test, expresado como odds ratio con intervalo de confianza al 95%). Una posible conversión de la superioridad de no inferioridad se estableció sobre la base de un límite de no inferioridad predefinido de 0,66 para O de ovocitos vitrificados *vs* frescos (que corresponde a los límites de -9 a -10% en la diferencia con un total de OPR 40-50%). Un total de 600 pacientes fueron incluidas en el estudio y fueron aleatorizadas 1:1 entre pacientes que recibieron ovocitos frescos y vitrificados. La tasa de gestación evolutiva por intención de tratar fue de 43.7% para el grupo de los vitrificado y 41.7% para el grupo de los frescos, no habiéndose encontrado diferencias significativas. Por otra parte, la OR de 0,921 (0,667-1,274) indicó que

no fue posible comprobar la superioridad del fresco sobre el vitrificado, y por otra parte, se pudo asumir la no inferioridad del vitrificado con un margen de 0,667. Estos datos indican que a través de este ensayo clínico controlado aleatorizado, se comprobó la efectividad de la vitrificación de ovocitos como herramienta válida para el funcionamiento de los programas de ovo-donación mediante la creación de bancos de ovocitos, ya que se obtienen los mismos resultados que con el procedimiento estándar de donación con gametos frescos. Además de esta incuestionable ventaja, el banco de ovocitos también proporciona otra serie de beneficios, arriba mencionados, como la eliminación de las listas de espera, permitiendo asimismo el periodo de cuarentena previo a la donación.

Cada vez son más abundantes las publicaciones poniendo de manifiesto la eficiencia de esta técnica no solo en los programas de ovo-donación (Nagy et al. 2008) sino también con ovocitos propios (Antinori et al. 2007, Chang et al. 2008, Kuwayama et al. 2005, Lucena et al. 2006, Rienzi et al. 2010)

A pesar de las cada vez más crecientes evidencias que ratifican que la vitrificación no altera la capacidad de los ovocitos para generar embriones viables, existe aún una falta de estudios que demuestren la ausencia de un incremento de anomalías en los niños nacidos de ovocitos vitrificados con relación a los ovocitos frescos o a las gestaciones espontáneas. A este respecto, existen tres publicaciones en las que se analizan los resultados obstétricos y perinatales tras la criopreservación de ovocitos (Chian et al. 2008, Grifo et al. 2010, Noyes et al. 2009). La conclusión presentada en estos análisis preliminares, es que la criopreservación de ovocitos no está asociada a un incremento en el riesgo de presentar alteraciones obstétricas o perinatales.

La criopreservación de ovocitos, en diferentes centros, constituye una técnica que permite mejorar las modalidades de trabajo y de resultados en un centro de reproducción asistida. Tratándose de una técnica nueva, tenemos un bajo conocimiento de la evolución obstétrica y perinatal de los recién nacidos vivo tras vitrificación ovocitaria y al mismo tiempo sabemos que en literatura no existen muchos trabajos al respecto. Por esta razón hemos decididos desarrollar esta análisis que nos aclare el estado de salud de los recién nacidos procedentes de esta técnica, por lo que el resultado de esta investigación va a ser relevante biomédicamente y de una gran aplicación clínica.



Objetivos

3

El objetivo de este estudio fue describir los resultados obstétricos y perinatales de los embarazos conseguidos tras técnicas de fecundación en vitro con ovocitos frescos y ovocitos vitrificados (bien procedentes de donación de óvulos o propios). Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la tasa de anomalías congénitas presentada por los recién nacidos gestados a partir de ovocitos vitrificados, respecto a TRA con ovocitos frescos.
- Comparar la patología obstétrica entre embarazos de ovocitos vitrificados vs ovocitos frescos, valorando las siguientes complicaciones:
 - Hipertensión gestacional
 - Restricción de crecimiento intrauterino
 - Colestasis gravídica
 - Diabetes gestacional
 - Ruptura prematura de las membranas
 - Parto pretérmino
 - Complicaciones del puerperio

OBJETIVOS

- Comparar los resultados perinatales, entre embarazos de ovocitos vitrificados vs ovocitos frescos, valorando los siguientes aspectos:
 - Edad gestacional al nacimiento
 - Peso al nacimiento
 - Puntuación de APGAR
 - Ingreso en UCI neonatal

4

Este estudio es de tipo cohorte retrospectivo basado en los resultados obstétricos y perinatales de los ciclos de trasferencias embrionarias de donación de ovocitos o propios, tanto frescos o vitrificados que finalizaron en un embarazo único o gemelar entre Enero 2007 y Mayo 2012 en el Instituto Universitario IVI Valencia España.

Estudio retrospectivo de cohortes.

Las gestaciones serán discriminadas entre únicas o múltiples dependiendo del número de sacos gestacionales y del origen de los ovocitos (propios o donados). Como grupo control se seleccionarán gestaciones conseguidas con ovocitos frescos en el mismo periodo de tiempo y se equilibrarán con los grupos de estudio de acuerdo a la naturaleza de la gestación (única o múltiple) y al origen de los ovocitos (propios o donados).

Se ha considerado un recién nacido vivo cualquier nacimiento de un neonato vivo después de la semana 23.

4.1. PACIENTES

Descripción de la muestra

Debido a la naturaleza retrospectiva de este estudio, se contó con la aprobación de la Comisión de Investigación del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

El estudio comprende el análisis de todos los nacimientos que ocurrieron entre Enero 2007 y Mayo 2012, estas informaciones llegaron tras la compilación de un cuestionario (Anexo 1).

La información a la pareja fue recibida por el médico de referencia en el 50,8 % de los casos de ovocitos frescos, y del 81,6% de los vitrificados. Fueron analizados los resultados perinatales de 2281 niños (N= 1823 partos). Entre estos nacimientos 1233 niños eran procedentes de ovocitos frescos, mientras 1048 niños eran de embriones tras fecundación asistida con ovocitos vitrificados.

La muestra final analizada (figura 7) fue de 1224 niños nacidos (N= 966 partos) en el grupo de control y 1027 niños (N= 804 partos) en el grupo de estudio (Figura 9).

El criterio de inclusión fue: niños nacidos vivos o abortos/muerte intrauterina (still birth) desde la semana 24, embarazo único o múltiple, concepciones con ovocitos propios o donados. El único criterio de exclusión fue la presencia de aborto antes de la semana 24.

En todos los casos, el ciclo de fecundación in vitro y la transferencia embrionaria se desarrollaron en el Instituto Universitario IVI Valencia España. El seguimiento de los embarazos fue conducido en el lugar de residencia de la paciente: España (55,2 % ovocitos frescos y 39% ovocitos vitrificados), Países europeos (43,8 % y 58,7% cada grupo) otros Países (1%y 2,1% respectivamente).

La mitad de las mujeres españolas (52,7% y 50,4% de cada grupo) fueron monitorizadas y controladas en Valencia. Todos los embarazos y los partos fueron controlados según los protocolos de gestión conformes con las directrices nacionales de conducta obstétrica.

Definición de los grupos

La muestra ha sido analizada considerando ocho grupos. Los dos primeros se caracterizan por incluir embarazos únicos obtenidos tras TRA con ovocitos propios: ovocitos vitrificados (grupo de estudio, N=81) y ovocitos frescos (grupo de control, N=252).

Los grupos tres y cuatro incluyen casos de embarazos gemelares tras TRA con ovocitos propios vitrificados (grupo de estudio, N=19) y frescos (grupo de control, N=68).

El quinto y sexto grupo incluyen los embarazos únicos tras TRA de DO con ovocitos vitrificados (grupo de estudio, N=503) y ovocitos frescos (grupo de control, N=516). Los últimos dos grupos se caracterizan incluir embarazos múltiples tras TRA de DO con ovocitos vitrificados (grupo de estudio, N=201) y de ovocitos frescos (grupo de control, N=160).

Criterios de inclusión y exclusión

El estudio analiza exclusivamente los nacimientos, obtenidos gracias a TRA efectuada en el Centro IVI de Valencia, entre la fecha de Enero 2007 y Mayo 2012. El muestreo se refiere únicamente a los nacimientos respecto a los cuales se recibió la encuesta complementada.

Casos perdidos

Durante el análisis se perdió la información de 23 embarazos (30 niños perdidos durante el tiempo de observación, 9 niños en el grupo de control y 21 niños en el grupo de estudio).

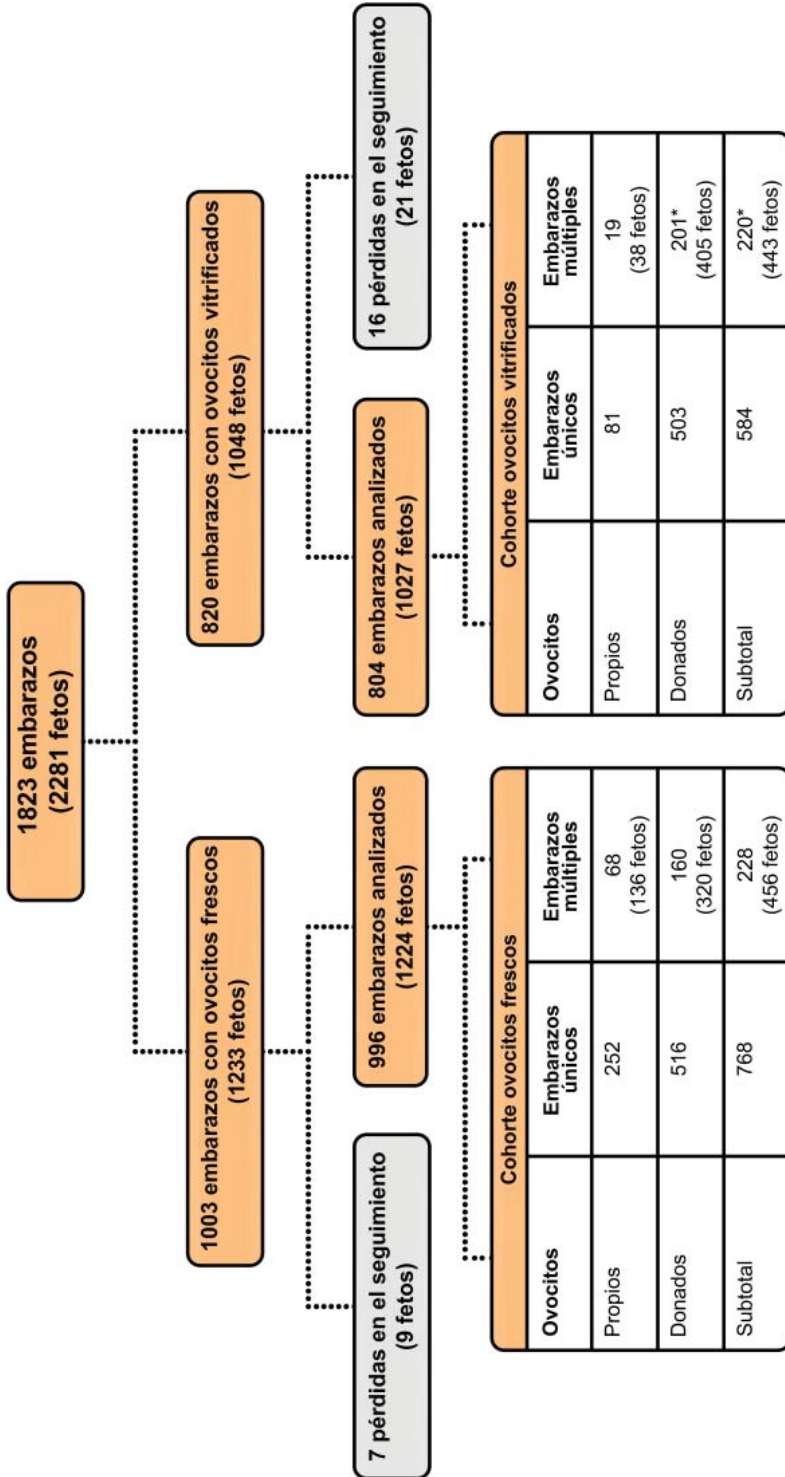


Figura 7: Descripción de la muestra analizada. Grupo de estudio: embarazos obtenidos con ovocitos vitrificados. Grupo control: embarazos usando ovocitos frescos (asterisco).

4.2 MÉTODO

Tipo de estudio

El estudio es de tipo cohorte retrospectiva que ha sido escogido con el intento de alcanzar la mayor representatividad de embarazos y nacimientos de pacientes tratadas con TRA de ovocitos vitrificados y compararlos con los casos de embarazo con ovocitos frescos.

Metodología

Toda la información de la historia obstétrica y médica de las pacientes, así como los datos de cada ciclo, se obtuvieron de la base de datos y programa de gestión clínica del IVI. Los datos correspondientes a los embarazos y partos fueron enviados por los Centros de referencia (85% del grupo de ovocitos frescos y el 88% del grupo de vitrificación). El resto de los datos de tipo obstétrico/perinatal fue recogido mediante un cuestionario enviado a las pacientes (Anexo 1). Los datos fueron anonimizados, de forma que se ocultó la información que pudiese usarse para identificar pacientes concretos en los listados.

Los principales datos recogidos desde el punto de vista del ciclo de TRA fueron: dosis total de gonadotropinas, los niveles séricos de estradiol (E2) el día de la administración de la hCG, los ovocitos obtenidos por cada ciclo, tipo de protocolo seguido (natural, estimulado, etc.), el tipo de inseminación (FIV y/o ICSI), número de embriones transferidos, los embriones criopreservados y los resultados en cuanto a embarazos, aborto espontáneos y recién nacidos. Los datos fueron exportados a Excel 2013, donde se realizaron las acciones pertinentes para revisar la calidad de los mismos y corregir posibles errores.

Los resultados principales fueron, el género de los recién nacidos, peso al nacer, puntuación de Apgar, admisión en la unidad de cuidados intensivos del recién nacido, mortalidad perinatal, complicaciones del recién nacidos y la incidencia de malformaciones congénitas. Se consideraron malformaciones mayores, las que podían determinar séquelas en los nacidos, mientras menores eran las que no determinaban séquelas a largo plazo. Se seleccionó la clasificación europea de Eurocat.

El bajo peso al nacer fue definido como el peso al nacer por debajo del décimo percentil y menos de 2.500 g al nacer. El parámetro de muy bajo peso al nacer se definió como menos

de 1.500 g al nacer. La mortalidad perinatal incluyó los niños no nacidos de menos de 28 semanas de embarazo y la muerte del recién nacido que se presenta antes de los 7 días después del parto.

Todos los datos fueron calculados en toda la población analizada y fueron estratificados basándose en el número de fetos (embarazo único o múltiple) y el tipo de ciclo de fecundación asistida (ovodonación o ciclo con ovocitos propios).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete Statistical Pack age for Social Sciences 17 (SPSS, Inc.). Las variables categóricas y continuas fueron expresadas como proporciones y medias con el 95% de intervalo de confianza (CI). Los Odds Ratio (OR) y el 95% de CI fueron calculados para las variables categóricas.

Los datos categóricos se compararon usando el test de análisis Chi cuadrado (X^2) y el test exacto de Fisher. Los datos continuos se compararon con el test t de Student. Un valor de $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Las variables de confusión fueron seleccionados en base a la importancia clínica. Las variables que se utilizaron para ajustar los ORs fueron la edad materna, la edad de las donantes de ovocitos, la paridad, abortos previos, infertilidad debida a un factor del hombre, tipo de protocolo utilizado, origen de los ovocitos (propios o donados), el día de la transferencia embrionaria, embarazo único o múltiple. El factor de infertilidad masculino fue analizado incluyéndolos en cuatro categorías diferentes: donante de esperma, infertilidad severa (incluyendo casos de azoospermia o con un número menor de 5 millones de espermatozoos móviles en el eyaculado), un factor masculino no severo pero por debajo de las parámetros de normalidad definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la última categoría fue la de un espermograma normal según el criterio de la OMS.

ANEXO 1: Cuestionario utilizado en el estudio para la recogida de los datos

ENCUESTA EVALUACION OBSTETRICA Y PERINATAL

I. DATOS MATERNOS

- 1) Tuvo usted algún aborto previo a su embarazo actual: SÍ NO
i. ¿En qué semana se produjo el aborto? _____
- 2) ¿Tuvo Cesáreas previas? SÍ NO
i. En qué semana de embarazo se realizó la cesárea: _____
- 3) ¿Tuvo partos previos? SÍ NO
i. ¿En qué semana de embarazo ocurrió el parto? _____
- 4) Enfermedades Previas: SÍ NO
i. En caso afirmativo ¿qué enfermedad? _____
- 5) Le han realizado alguna cirugía previa: SÍ NO
i. ¿Qué tipo de cirugía? _____
- 6) ¿Utilizó alguna medicación durante el embarazo además de vitaminas, hierro y ácido fólico? SÍ NO
i. ¿Qué tipo de medicación? _____
- 7) ¿Fumaba durante el embarazo? SÍ NO
i. ¿Cuántos cigarrillos al día? _____
- 8) ¿Presentó vómitos durante el embarazo? SÍ NO
Si su respuesta es afirmativa nos podría especificar en qué trimestre del embarazo los presentó:
i. Primer trimestre
ii. Segundo trimestre
iii. Tercer trimestre
- 9) ¿Presentó sangrado durante el primer trimestre del embarazo? SÍ NO
- 10) ¿Se realizó la medida del pliegue nucal (translucencia nucal) en semana 12 asociada o no a una analítica para valorar el riesgo de síndrome de Down? SÍ NO
i. Según el resultado el bebé estaba: NORMAL ANORMAL
- 11) ¿Le realizaron una biopsia corial? SÍ NO
i. ¿Cuál fue el resultado? NORMAL ANORMAL
- 12) ¿Le realizaron amniocentesis? SÍ NO

- i. ¿Cuál fue el resultado? NORMAL ANORMAL
- 13) ¿Se detectó alguna malformación en el bebé en las ecografías practicadas?:
SÍ NO
- i. ¿Qué tipo de malformación presentaba? _____
- 14) Se encontró alguna alteración en el cordón o la placenta SÍ NO
- i. ¿Qué tipo de alteración presentaba? _____
- 15) ¿Presentaba su bebe menor tamaño de lo que le correspondía en las ecografías?
SÍ NO
- 16) ¿Presentó diabetes durante el embarazo? SI NO
- Qué tipo de tratamiento recibió:
- i. Dieta
- ii. Antidiabéticos (hipoglucemisantes orales)
- iii. Insulina
- a. Cuántas unidades al día se aplicaba: _____
- 17) ¿Presentó anemia? (hemoglobina baja) SÍ NO
- 18) ¿Durante el embarazo desarrolló colestasis (es una patología del hígado que se desarrolla durante el embarazo y que produce picores por todo el cuerpo asociado a un aumento de ácidos biliares y transaminasas)?
SÍ NO
- 19) ¿Presentó sangrado durante el segundo o tercer trimestre?
SÍ NO
- 20) ¿Tuvo rotura de membrana antes de la semana 37 de embarazo?
SÍ NO
- i. ¿En qué semana del embarazo? _____
- 21) ¿Presento amenaza de parto pretermo (contracciones antes de las 37 semanas?)
SÍ NO
- ¿En qué semana del embarazo la presentó? _____
- ¿Le dieron progesterona? SÍ NO
- ¿Le dieron medicación para parar las contracciones (tocolíticos)?
SÍ NO
- ¿Le pusieron un gotero para parar las contracciones? SÍ NO
- Durante cuánto tiempo? _____
- 22) ¿Le administraron corticoides para madurar los pulmones del bebé?
SÍ NO NO SABE

- 23) ¿Presentó hipertensión arterial durante el embarazo (elevación de la presión arterial mayor o igual a 140/90)? SÍ NO
- i. ¿En qué semana se detectó?
- ii. ¿Requirió tratamiento? SÍ NO
- 24) ¿Detectaron proteínas en la orina asociado a la hipertensión? SÍ NO
- 25) ¿Tuvo infección de las vías urinarias durante el embarazo? SÍ NO
- 26) ¿En qué semana ocurrió el parto? _____
- 27) ¿Cómo se inició el parto?
- i. Espontáneo (se puso sola de parto): SÍ NO
- ii. Inducido (Le provocaron el parto): SÍ NO
- iii. Cesárea programada SÍ NO
- 28) ¿Cómo finalizó el parto?
- i. Parto Vaginal: SÍ NO
- ii. Cesárea: SÍ NO
- 31) ¿Cuál fue la indicación para realizar la cesárea programada? _____
- 32) ¿Se encontró alguna alteración en el cordón o en la placenta al nacimiento? SÍ NO
- i. ¿Qué alteración? _____
- 33) ¿Presentó alguna patología materna en el posparto (puerperio)? SI NO
- i. Qué tipo de patología _____
- 34) Qué edad tenía usted cuando dio a luz? _____

II DATOS DEL BEBE:

1. Sexo

Único:

Varón _____ Mujer _____

Gemelos:

Mujer-Mujer: _____ Varón-Varón: _____ Mujer-Varón _____

2. Peso: _____g _____g

3. En caso de gemelos marcar para cada niño:

Talla _____cm

Perímetro craneal: _____cm

Talla _____cm

Perímetro craneal: _____cm

4. Evaluación APGAR al minuto (en caso de gemelos marcar para cada niño) (0-10) :

0 2 4 6 8 10

0 2 4 6 8 10

5. Evaluación APGAR a los 5 minutos (en caso de gemelos marcar para cada niño) (0-10):

0 2 4 6 8 10

0 2 4 6 8 10

6. ¿Presentó alguna malformación al nacer: (en caso de gemelos especificar si se presentó la malformación en uno o en los dos niños)?

SÍ NO

Qué tipo de malformación: _____

7. ¿Tuvo algún problema tras el nacimiento?

(En caso de gemelos especificar si se presentó la patología en uno o en los dos niños)

SÍ NO

Qué patología? _____

8. Requirió admisión a la Unidad de Cuidados Intensivo: (en caso de gemelos especificar si sólo uno o los dos niños ingresaron a cuidado intensivo)

SÍ NO

¿Cuál fue el motivo del ingreso? _____

¿Por cuánto tiempo? _____

9. ¿Cuál fue la evolución del bebe?

Nació muerto SÍ NO

Vivo Sano: SÍ NO

Vive con algún problema: SÍ NO

¿Cuál problema? _____

Se murió tras el nacimiento: SÍ NO

¿Cuándo? _____



5

5.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Las características basales de la población estudiada de las pacientes eran parecidas. La edad de las pacientes que vitrificaron ovocitos en ciclo de estimulaciones era más elevada y está relacionado con una reserva ovárica inferior y de consecuencia con la necesidad de vitrificar para acumular ovocitos en diferentes estimulaciones.

Todas las donantes tanto en el grupo de ovocitos frescos como vitrificados tenían la misma edad. En cuanto a los factores de riesgo, no se observó ninguna diferencia significativa, excepto en la edad materna en el momento del embarazo ($p < 0,001$) y en la mayor incidencia de abortos previos en el grupo de vitrificación ($p < 0,02$).

Se observó también una más alta proporción de mujeres con antecedentes de partos pretérmino en el grupo de ovocitos frescos ($p < 0,02$).

RESULTADOS

Como se demuestra en la Tabla VI, en general no existen diferencias significativas en las características basales de las pacientes de los dos grupos:

	Ovocitos frescos (n=996)	Ovocitos vitrificados (n= 804)	OR (95% CI)	P
Edad materna	38,5 (38,1 -38,8)	40,2 (39,9-40,5)	-	<0,001
Edad donantes	26,4(26,0-26,7)	26,2 (25,9-26,5)	-	NS
BMI de la paciente(Kg/m2)	23,1 (22,8-23,5)	23,2 (22,7-23,6)	-	NS
BMI de la donante (Kg/m2)	22,8 (22,5-23,1)	22,6 (22,4-22,9)	-	NS
Abortos previos	334 (33,5)	331 (41,2)	1,4 (1,15-1,70)	<0,002
Mujeres multiparas	207 (20,8)	174 (21,6)	1,0 (0,96-1,16)	NS
Partos pretermino previos	37 (3,7)	14 (1,7)	0,46 (0,25-0,86)	<0,02
Enfermedades anteriores	185 (18,6)	133 (16,6)	0,87 (0,68-1,12)	NS
Interventos quirúrgicos anteriores	481 (48,3)	308 (48,3)	1,00 (0,83-1,21)	NS
Tabaquismo	60 (6,0)	46 (5,7)	0,95 (0,63-1,41)	NS

Tabla VI: Características basales de los ciclos y de la población estudiada en esta tesis.

Los motivos principales de la infertilidad fueron: aborto espontáneo recurrente, baja respuesta a hiperestimulación ovárica, endometriosis, factores genéticos y/o inmunológicos, factor masculino, ovario poliquístico, factor tubario, y en mayor medida una avanzada edad materna

RESULTADOS

En el grupo de pacientes con ovocitos vitrificados fueron más altos los porcentajes de bajas respondedoras ($p<0,001$) y edad avanzada (> 38 años) ($p<0,001$) respecto al grupo de pacientes con ovocitos propios frescos, en cambio se encontraron un menor número de casos de ovario poliquístico ($p<0,001$), factor tubario ($p<0,0001$) y factor masculino ($p<0,05$) en el caso de ovocitos vitrificados comparado con ovocitos frescos. (Tabla VII)

	Ovocitos frescos (n=996)	Ovocitos vitrificados (n= 804)	OR (95% CI)	P
Aborto recurrente	14 (1,4)	14 (1,7)	1,24 (0,59-2,62)	NS
Baja respuesta	196 (19,7)	269 (33,5)	2,05 (1,66-2,54)	<0,001
Edad materna avanzada	492 (49,3)	525 (65,3)	1,93 (1,59-2,33)	<0,001
Endometriosis	83 (8,3)	36 (4,5)	0,52 (0,35-0,77)	NS
Genética/ Inmunológica	13 (1,3)	10 (1,2)	0,95 (0,41-2,18)	NS
Infertilidad masculina	45 (4,5)	21 (2,6)	0,57 (0,33-0,96)	<0,05
Ovario policístico	58 (5,8)	8 (1,0)	0,16 (0,07-0,34)	<0,001
Factor tubárico	66 (6,6)	11 (1,4)	0,20 (0,10-0,37)	<0,0001
Otras causas	49 (4,9)	35 (4,4)	0,88 (0,56-1,37)	NS

Tabla VII: Causas de la infertilidad de la población estudiada en esta tesis

La dosis total de gonadotropinas utilizada en los ciclos de estimulación ovárica tampoco fue diferente: con un 2.300 IU (2.173-2.428) y 2.272 IU (1.832-2.711) en el grupo de ovocitos frescos y vitrificados respectivamente. En el caso de la estimulación ovárica en las donantes

RESULTADOS

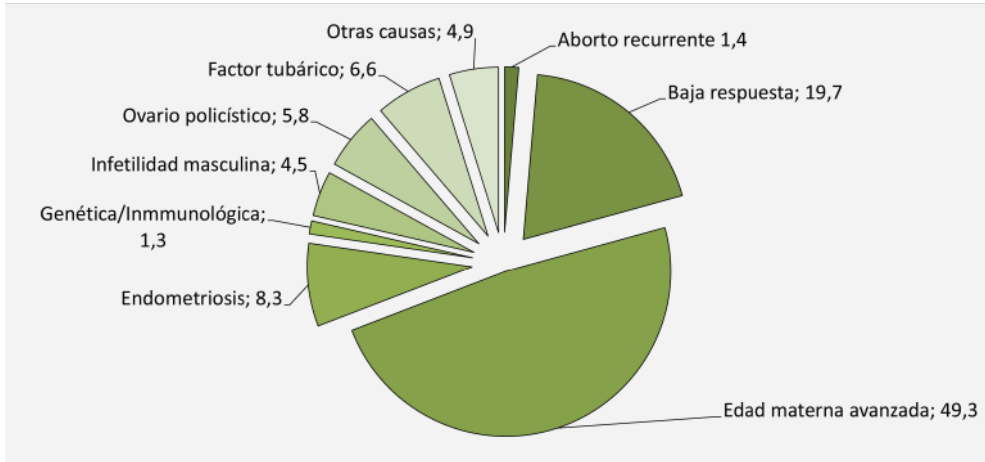


Figura 8: Características de las pacientes en los embarazos con ovocitos frescos

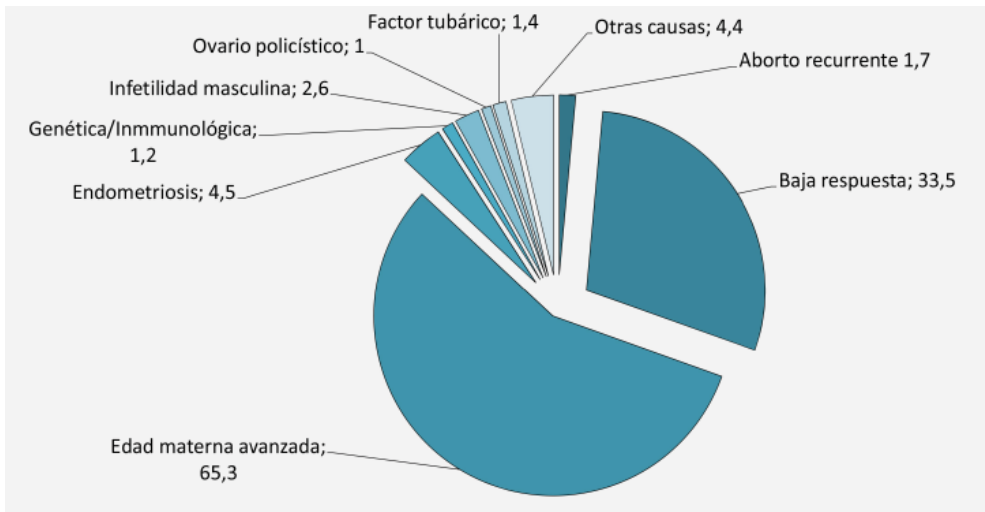


Figura 9: Características de las pacientes en el grupo de ovocitos vitrificados

de ovocitos tampoco se observó ninguna diferencia significativa. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la duración de la estimulación y los niveles de estrógenos tanto en las donantes como en las receptoras de ovocitos, ni entre las pacientes que usaron ovocitos propios (Tabla VIII).

En cuanto a la duración para la preparación del endometrio, fue más corta en el grupo de vitrificación, debido a la disponibilidad de tener los ovocitos vitrificados listos para el TRA

RESULTADOS

	Ovocitos frescos (n=996)	Ovocitos vitrificados (n= 804)	OR (95% CI)	P
Estimulación ovárica				
Días de estimulación (pacientes)	11,1 (9,6-12,6)	12,3 (10,8-13,8)	-	NS
Días de estimulación (donantes)	11,2 (10,8-11,6)	10,6 (10,3-10,9)	-	NS
Dosis de gonadotropina (pacientes) (IU)	2.300 (2.173-2.3428)	2.272 (1.832-2.711)	-	NS
Dosis de gonadotropina (donadoras) (IU)	2.220 (2.164-2.275)	2.260 (2.211-2.309)	-	NS
E2 al pico de hCG (pacientes)	1.911(1.764- 2.057)	no disponible	-	NA
E2 al pico de hCG (donantes)	2.582 (2.486-2.678)	2.618 (2.526-2.711)	-	NS
Días de preparación endometrial (receptoras)	25,6 (24,6-26,5)	18,4 (17,8-19,0)	-	<0,05
Tipo de ciclo				
Ovocitos propios	320 (32,1)	100 (12,4)	0,28 (0,23-0,35)	<0,001
Ovocitos donados	676 (6,9)	704 (87,5)		
Número de ovocitos				
MII	12,4 (12,1-12,8)	10,0 (9,7-10,4)	-	< 0,05
Ovocitos MII (propios)	12,5 (11,6-13,4)	4,5 (3,3-5,8)	-	<0,001
Ovocitos MII (donados)	12,4 (12,1-12,7)	13,0 (11,1-14,9)	-	NS
Tipo de transferencia				
Fresco	949 (95,3)	763 (94,9)	0,91 (0,63-1,35)	NS
Congelado	47 (4,7)	41 (5,1)		
Día de la transferencia				
3° día	683 (68,6)	378 (47,0)	0,41 (0,33- 0,50)	<0,001
Blastocisto	313 (31,4)	426 (53,0)		
Número de embriones transferidos	1,91 (1,88 -1,93)	1,90 (1,87-1,93)	-	NS

Tabla VIII Características de las estimulaciones de los ciclos estudiados

RESULTADOS

para las pacientes. La proporción de ciclos con ovocitos propios y frescos fue estadísticamente significativa más alta que aquellos ciclos que se hicieron con ovocitos propios pero vitrificados ($p < 0,001$). Por último, se observó que la media del número de ovocitos en metafase II y la proporción de transferencia al tercer día fue más alta en el grupo de ovocitos frescos ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente).

5.2. RESULTADOS OBSTÉTRICOS

5.2.1 RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE EMBARAZOS ÚNICOS CON OVOCITOS PROPIOS

En general (Tabla IXa) no se encontraron diferencias significativas en los parámetros estudiados, excepto en:

-Edad materna mayor en el grupo de ovocitos vitrificados ($p < 0,001$)

-Una mayor proporción de partos por cesárea en el grupo de ovocitos vitrificados ($p < 0,007$)

	Ovocitos frescos (N=252)	Ovocitos vitrificados (N=81)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado del embarazo				
Edad materna	35.6 (35.1 - 36.0)	37.4 (36.6-38.6)	-	<.001
Sangrado en el primer trimestre	65 (25.8)	20 (24.7)	0.98 (0.55 - 1.75)	NS
Procedimientos invasivos	30 (11.9)	12 (14.8)	1.29 (0.63 - 2.65)	NS
Anémia (Hb<11 g/dL)	19 (7.5)	1 (1.2)	0.64 (0.85 - 5.0)	NS
Colestásis gravídica	0	1 (1.2)		NS
Diabetes	15 (5.9)	8 (10.0)	1.83 (0.74 - 4.54)	NS
Sangrado en el 2 y 3 trimestre	14 (5.6)	9 (11.1)	2.13 (0.89 - 5.13)	NS
RPM < 37 semanas	10 (4.0)	0	-	NS
Hipertensión gestacional	10 (4.0)	4 (4.9)	1.37 (0.41 - 4.58)	NS
Infección urinaria	24 (9.5)	6 (7.4)	0.77 (0.30 - 1.97)	NS

Tabla IXa: Resultados obstétricos del seguimiento de los embarazos únicos con ovocitos propios

RESULTADOS

Considerando la tipología del parto (Tabla IXb) se encontró una mayor tasa de Cesárea en el grupo de ovocitos vitrificados propios (60,5%) comparado con el grupo de ovocitos frescos.

	Ovocitos frescos (N=252)	Ovocitos vitrificados (N=81)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado del parto				
Semana del parto	39.1 (38.9-39.4)	39.3 (39.0 - 39.7)	-	NS
Partos prematuros (<37 sem)	20 (7.9)	4 (4.9)	0.60 (0.20 - 1.82)	NS
Partos muy prematuros (<34 sem)	7 (2.8)	0	-	NS
Cesárea	93 (36.9)	49 (60.5)	2.85 (1.69 - 5.0)	< .007
Complicaciones puerperales	11 (4.4)	4 (4.9)	1.11 (0.34 - 3.56)	NS

Tabla IXb: Resultados obstétricos del parto de los embarazos únicos con ovocitos propios

5.2.2 RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE EMBARAZOS ÚNICOS CON OVOCITOS DONADOS

En general los resultados obstétricos en los embarazos mediante TRA utilizando ovocitos propios son buenos. Sin embargo, la mayoría de investigadores encuentran una incidencia más alta de ciertas complicaciones en las gestaciones con ovocitos donados. Estas complicaciones pueden ser explicadas principalmente por la avanzada edad materna, la alta incidencia de gestaciones múltiples y quizás el hecho de que el embrión es totalmente extraño desde un punto de vista inmunológico a la receptora (Martínez-Varea A.et al 2014). Por esto y otros factores en nuestro estudio se han analizado los resultados teniendo por separado el grupo de ovocitos donados.

En el caso de los embarazos únicos de ovocitos donados no se encontraron ningún parámetro estadísticamente significativo entre los dos grupos de estudio (ovocitos frescos vs ovocitos vitrificados), (Tabla Xa) excepto:

- Un mayor número de casos en los que se utilizó técnicas como la biopsia corial / amniocentesis en el grupo de ovocitos vitrificados ($p < 0,001$).

Tampoco se evidenció una diferencia entre las variables anotadas de las características del parto.

Tabla Xa: Resultados obstétricos del seguimiento de los embarazos únicos con ovocitos donados

Resultado del embarazo	Ovocitos frescos (N=516)	Ovocitos vitrificados (N=503)	OR (95% CI)	Valor P
Edad materna	41.1 (40.7 - 41.5)	41.6 (41.2 - 42.0)	-	NS
Sangrado en el primer trimestre	147 (28.5)	165 (32.8)	1.23 (0.93 - 1.61)	NS
Procedimientos invasivos	43 (8.3)	82 (16.3)	2.14 (1.45 - 3.17)	< .001
Anémia (Hb<11 g/dL)	25 (4.8)	32 (6.4)	1.36 (0.78 - 2.39)	NS
Colestásis gravídica	12 (2.3)	10 (2.0)	0.78 (0.32 - 1.86)	NS
Diabetes	56 (10.8)	50 (9.9)	0.91 (0.60 - 1.38)	NS
Sangrado en el 2 y 3 trimestre	25 (4.8)	34 (6.8)	1.41 (0.82 - 2.42)	NS
RPM < 37 semanas	22 (4.3)	15 (3.0)	0.68 (0.34 - 1.35)	NS
Hipertensión gestacional	78 (15.1)	59 (11.7)	0.75 (0.51 - 1.08)	NS
Infección urinaria	34 (6.6)	21 (4.2)	0.63 (0.35 - 1.13)	NS

Tabla Xb: Resultados obstétricos del parto de los embarazos únicos con ovocitos donados

Resultado del parto	Ovocitos frescos (N=516)	Ovocitos vitrificados (N=503)	OR (95% CI)	Valor P
Semana del parto	38.2 (38.0 - 38.4)	38.2 (38.0 - 38.4)	-	NS
Partos prematuros (<37 sem)	65 (12.6)	55 (10.9)	0.85 (0.58 - 1.25)	NS
Partos muy prematuros (<34 sem)	19 (3.7)	13 (2.6)	0.69 (0.34 - 1.42)	NS
Cesárea	324 (62.8)	302 (60)	0.89 (0.69 - 1.15)	NS
Complicaciones puerperales	38 (7.4)	29 (5.8)	0.79 (0.47 - 1.31)	NS

5.2.3 RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE EMBARAZOS MÚLTIPLES CON OVOCITOS PROPIOS

Observando los embarazos múltiples con ovocitos propios, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de ovocitos frescos y vitrificados, en el seguimiento del embarazo y/o la tipología del parto, se evidenció una alta tasa de Cesárea en los dos grupos (Tabla XI a e XI b).

	Ovocitos frescos (N=68)	Ovocitos vitrificados (N=19)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado del embarazo				
Edad materna	33.8 (33.0 - 34.7)	35.8 (34.1 - 37.6)	-	NS
Sangrado en el primer trimestre	14 (20.9)	1 (5.3)	0.21 (0.3 - 1.71)	NS
Procedimientos invasivos	7 (10.3)	5 (26.3)	3.11 (0.86 - 11.36)	NS
Anémia (Hb<11 g/dL)	6 (8.8)	3 (15.8)	1.94 (0.44 - 8.71)	NS
Colestásis gravídica	2 (2.9)	0	NA	NS
Diabetes	10 (14.7)	3 (15.8)	1.09 (0.27 - 4.43)	NS
Sangrado en el 2 y 3 trimestre	8 (11.8)	1 (5.3)	0.42 (0.05 - 3.56)	NS
RPM < 37 semanas	8 (11.8)	1 (5.3)	0.40 (0.05 - 3.44)	NS
Hipertensión gestacional	4 (5.9)	2 (10.5)	1.91 (0.32 - 11.35)	NS
Infección urinaria	5 (7.4)	0	NA	NS

Tabla XIa: Resultados obstétricos del seguimiento de embarazos múltiples con ovocitos propios

	Ovocitos frescos (N=68)	Ovocitos vitrificados (N=19)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado del parto				
Semana del parto	35.7 (35.1 - 36.3)	36.2 (35.5 - 36.8)	-	NS
Partos prematuros (<37 sem)	43 (63.2)	13 (68.4)	1.26 (0.43 - 3.73)	NS
Partos muy prematuros (<34 sem)	12 (17.6)	0	NA	NS
Cesárea	54 (85.3)	18 (98.7)	4.03 (0.49 - 33.33)	NS
Complicaciones puerperales	8 (11.8)	2 (10.5)	0.88 (0.17 - 4.56)	NS

Tabla XIb: Resultados obstétricos del parto de embarazos múltiples con ovocitos propios

5.2.4 RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE EMBARAZOS MÚLTIPLES CON OVOCITOS DONADOS

En este grupo de pacientes con embarazos múltiples con ovocitos donados no se encontraron diferencias estadísticamente significativa en el seguimiento del embarazo.

	Ovocitos frescos (N=160)	Ovocitos vitrificados (N=201) ¹	OR (95% CI)	Valor P
Resultado del embarazo				
Edad materna	40.9 (40.2 - 41.6)	40.9 (40.4 - 41.5)	-	NS
Sangrado en el primer trimestre	61 (37.9)	81 (40.4)	1.12 (0.73 - 1.74)	NS
Procedimientos invasivos	14 (8.8)	25 (12.4)	1.63 (0.15 - 18.20)	NS
Anémia (Hb<11 g/dL)	11 (6.9)	16 (8.0)	1.24 (0.54 - 2.85)	NS
Colestásis gravídica	4 (2.5)	8 (4.0)	1.65 (0.49 - 5.58)	NS
Diabetes	14 (8.7)	14 (6.9)	0.81 (0.36 - 1.79)	NS
Sangrado en el 2 y 3 trimestre	15 (9.4)	25 (12.4)	1.29 (0.65 - 2.57)	NS
RPM < 37 semanas	24 (15.0)	28 (13.9)	0.92 (0.50 - 1.69)	NS
Hipertensión gestacional	30 (18.8)	38 (18.9)	1.03 (0.60 - 1.79)	NS
Infección urinaria	14 (8.8)	11 (5.5)	0.62 (0.27 - 1.47)	NS
Notas: ¹ Han habido tres casos de trillizos dicigóticos				

Tabla XIIa: Resultados obstétricos del seguimiento de embarazos múltiples con ovocitos donados

	Ovocitos frescos (N=160)	Ovocitos vitrificados (N=201) ¹	OR (95% CI)	Valor P
Resultado del parto				
Semana del parto	36.0 (35.6 - 36.3)	36.2 (36.0 - 36.6)	-	NS
Partos prematuros (<37 semanas)	98 (61.3)	103 (51.2)	0.66 (0.44 - 1.01)	NS
Partos muy prematuros (<34 semanas)	23 (14.4)	24 (11.9)	0.81 (0.44 - 1.49)	NS
Cesárea	133 (85.1)	177 (88.1)	0.83 (0.62 - 1.64)	NS
Complicaciones puerperales	12 (7.5)	16 (8.0)	1.03 (0.74 - 2.27)	NS
Notas: ¹ Han habido tres casos de trillizos dicigóticos				

Tabla XIIb: Resultados obstétricos del parto de embarazos múltiples con ovocitos donados

5.2.5. RESULTADOS OBSTÉTRICOS GLOBALES

La proporción de partos únicos en el grupo de ovocitos frescos fue del 77.1 % (768 de un total de 996 embarazos) y 72,6 % (584 de un total de 804 embarazos) en el grupo de ovocitos vitrificados ($p < 0,04$). (Figura 7, *Materiales y Métodos*). Además encontramos 3 casos de trillizos en el grupo de ovocitos vitrificados (0,4 %), mientras que en el grupo de ovocitos frescos no resultó ningún embarazo de este tipo. Los tres embarazos de trillizos provenían de una transferencia de dos embriones por tanto, eran gemelos idénticos. La proporción del síndrome del mellizo desaparecido (*vanishing twins*) fue de 9,1 % en el grupo de ovocitos frescos y de 7,8% en el grupo de ovocitos vitrificados (OR de 0,85; 95 % IC 0,61-1,20).

Los datos correspondientes al embarazo y parto han sido resumidos en la Tabla XIIIa e XIIIb:

	Ovocitos frescos (n=996)	Ovocitos vitrificados (n= 804)	P
Embarazo			
Sangrado en 1er trimestre	287 (28,8)	267 (33,2)	0,45
Procedimientos invasivos	94 (9,4)	124 (15,4)	<0,001
Anemia (Hb<11 g/dl)	61 (6,1)	52 (6,5)	NS
Colestasis gestacional	18 (1,8)	19 (2,4)	NS
Diabetes	94 (9,4)	75 (9,3)	NS
Sangrado en el 2 o 3 trimestre	62 (6,2)	69 (8,6)	NS
RPM < 37 semanas	64 (6,4)	44 (5,5)	NS
Hipertensión gestacional	122 (12,2)	103 (12,8)	NS
Infecciones urinarias	77 (7,7)	38 (4,7)	<0,03

Tabla XIIIa: Resultados obstétricos globales del seguimiento de la población estudiada

	Ovocitos frescos (n=996)	Ovocitos vitrificados (n= 804)	P
Parto			
Semanas al parto	38,2 (38,0-38,4)	38,2 (38,0-38,4)	NS
Parto prematuro (<37 sem)	226 (22,7)	175 (21,8)	NS
Parto muy prematuro (< 34 sem)	61 (6,1)	37 (4,6)	NS
Cesárea	608 (61,0)	546 (67,9)	<0,001
Problemas post-parto	69 (6,9)	51 (6,4)	NS

Tabla XIIIb: Resultados obstétricos globales del parto de la población estudiada

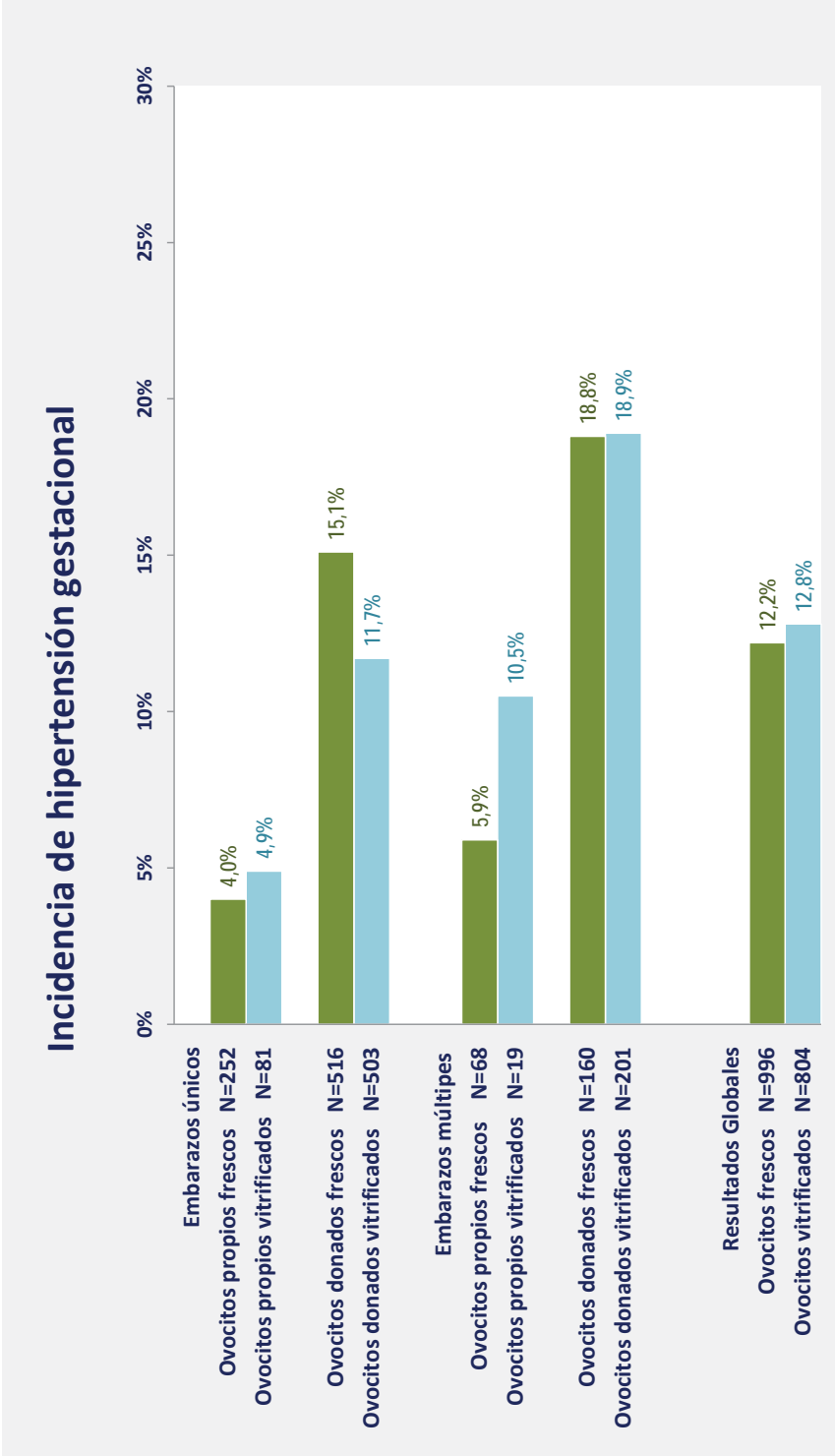


Figura 10: Incidencia de hipertensión gestacional en la población de estudio

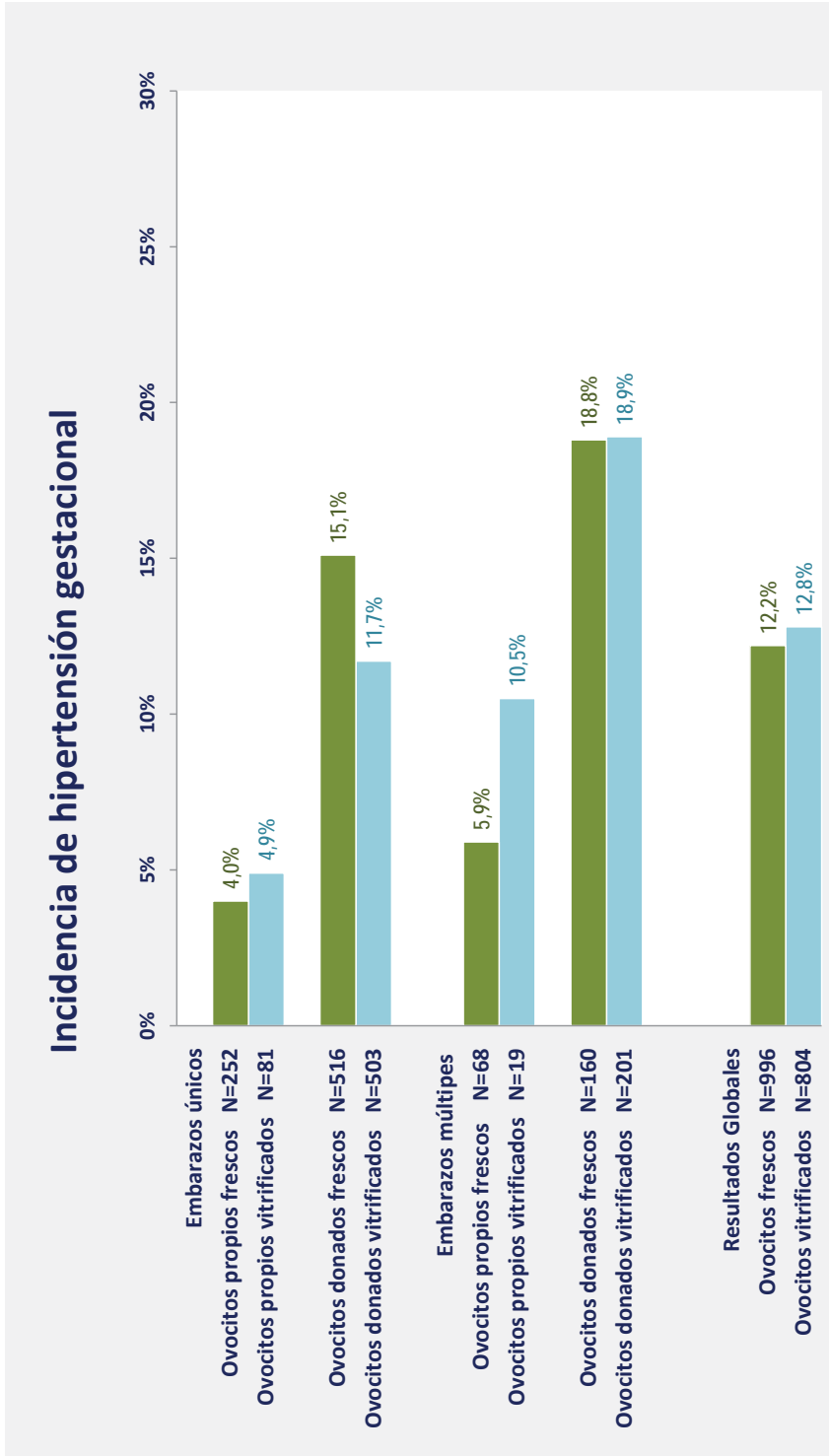


Figura 11: Incidencia de parto pretérmino en la población estudiada

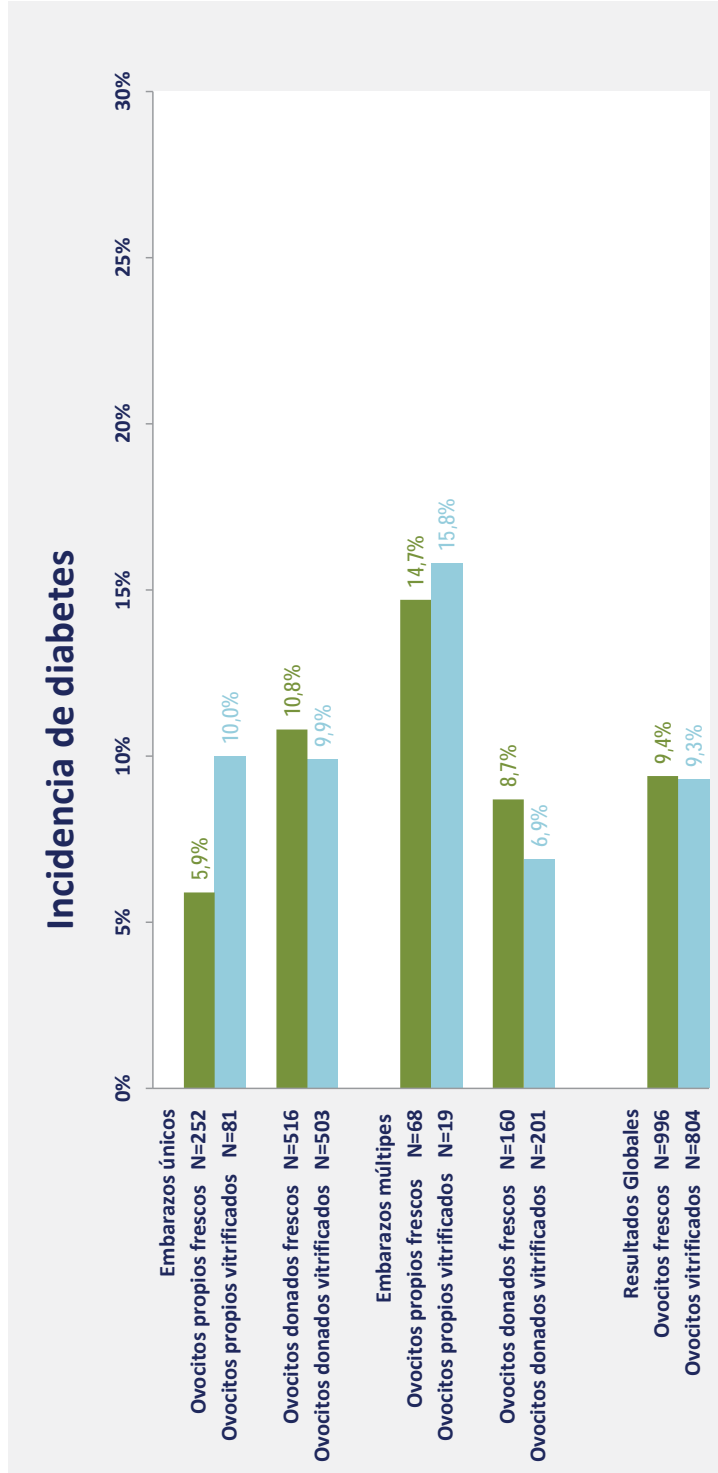


Figura 12: Incidencia de diabetes gestacional en la población estudiada

RESULTADOS

En este caso encontramos diferencias significativas en el número de casos de sangrado en el primer trimestre del embarazo, siendo mayores en el grupo de ovocitos vitrificados ($p= 0,045$). Mayor también fue la incidencia de casos en los que se recurrió a test invasivos (biopsia corial/ amniocentesis) en el grupo de ovocitos vitrificados ($p<0,001$), y en el número de partos por cesárea ($p<0,001$). Se encontraron menos casos de infecciones del tracto urinario en el grupo de ovocitos vitrificados comparándolo con el grupo de ovocitos frescos ($p<0,03$) (Tabla XIII a).

En las características del parto se encontró una mayor tasa de Cesárea en el grupo de paciente con ovocitos vitrificados. (Tabla XIIIb)

Podemos ver en detalle la incidencia de las más relevantes complicaciones obstétricas (Figuras 10, 11, 12) que han sido estudiadas y como se observa en los gráficos no se percibe una diferencia significativa éntrelos embarazos obtenidos con ovocitos frescos o vitrificados.

5.3. RESULTADOS PERINATALES

Los datos que corresponden a los resultados neonatales muestran como en la gran mayoría de las variables estudiadas no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, como por ejemplo en:

- Momento del parto,
- El peso al nacer del recién nacido
- El porcentaje de recién nacidos con bajo peso o muy bajo peso al nacer
- Número de recién nacidos pequeños al nacer.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en:

- Puntuación de APGAR,
- Altura del recién nacido
- Malformaciones congénitas, tanto menores como mayores
- Casos de ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos

5.3.1 RESULTADOS PERINATALES DE EMBARAZOS ÚNICOS CON OVOCITOS PROPIOS

Analizando los resultados perinatales en el grupo de embarazos únicos, no se encontró diferencias en ninguna variable excepto el porcentaje de neonatos de sexo femenino y respecto a la malformaciones neonatales, encontramos una diferencia significativa en el grupo de ovocitos vitrificados con la aparición de 4 casos en este grupo comparado con un solo caso en el grupo de ovocitos frescos ($p < 0,02$). (Tabla XVI)

RESULTADOS

	Ovocitos frescos (N=252)	Ovocitos vitrificados (N=81)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado neonatal				
Neonatos femeninos	114 (45.2)	51 (63.0)	2.6 (1.23 - 3.44)	<.006
Peso al nacimiento (g)	3,188 (3,119 - 3,257)	3,209 (3,104 - 3,314)	-	NS
Bajo peso al nacimiento (< 2,500 g)	23 (9.1)	5 (6.2)	0.67 (0.27 - 1.72)	NS
Muy bajo peso al nacimiento (<1,500 g)	2 (0.8)	0	-	NS
Peso al nacimiento < 10° percentil	33 (13.1)	10 (12.3)	0.93 (0.43 - 1.99)	NS
Altura neonatal (cm)	49.8 (49.5 - 50.2)	49.8 (49.1 - 50.5)	-	NS
Valor Apgar a 1 minuto	9.1 (8.8 - 9.3)	9.0 (8.9 - 9.1)	-	NS
Valor Apgar a los 5 minutos	9.8 (9.7 - 9.9)	9.7 (9.5 - 9.8)	-	NS
Valor Apgar a los 10 minutos	9.7 (9.2 - 10)	9.7 (9.5 - 9.8)	-	NS
Malformaciones fetales	3 (1.2)	4 (4.9)	4.31 (0.94 - 19.7)	NS
Malformaciones mayores	2 (0.8)	0	-	NS
Malformaciones menores	1 (0.4)	4 (4.9)	13.0 (1.43 - 118.4)	<.02
Ingreso a UCIN	20 (7.9)	5 (6.2)	1.29 (0.47 - 3.55)	NS
Días en UCIN	6.7 (2.3 - 11.1)	2.1 (0.4 - 3.9)	-	NS
Mortalidad perinatal	0	0	-	NS

Tabla XIV: Resultados perinatales de los embarazos únicos con ovocitos propios

5.3.2 RESULTADOS PERINATALES DE EMBARAZOS ÚNICOS CON OVOCITOS DONADOS

Analizando el grupo de embarazos únicos con TRA de DO, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos por todas las variables analizadas. Se dio un caso de muerte neonatal en el grupo de ovocitos frescos (Tabla XV).

	Ovocitos frescos (N=516)	Ovocitos vitrificados (N=503)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado neonatal				
Neonatos femeninos	257 (48.9)	296 (53.5)	1.15 (0.90 - 1.47)	NS
Peso al nacimiento (g)	3,159 (3,111 - 3,207)	3,128 (3,170 - 3,267)	-	NS
Bajo peso al nacimiento (< 2,500 g)	49 (9.5)	36 (7.2)	0.73 (0.47 - 1.15)	NS
Muy bajo peso al nacimiento (<1,500 g)	6 (1.2)	5 (1.0)	0.85 (0.26 - 2.81)	NS
Peso al nacimiento < 10° percentil	44 (8.5)	49 (9.7)	1.16 (0.76 - 1.77)	NS
Altura neonatal (cm)	49.9 (49.6 - 50.2)	50.1 (49.8 - 50.4)	-	NS
Valor Apgar a 1 minuto	8.9 (8.8 - 9.1)	8.9 (8.8 - 9.0)	-	NS
Valor Apgar a los 5 minutos	9.5 (9.5 - 9.6)	9.6 (9.6 - 9.7)	-	NS
Valor Apgar a los 10 minutos	9.7 (9.5 - 9.8)	9.7 (9.6 - 9.8)	-	NS
Malformaciones fetales	7 (1.4)	6 (1.2)	0.89 (0.30 - 2.70)	NS
Malformaciones mayores	4 (0.7)	2 (0.4)	0.52 (0.09 - 2.86)	NS
Malformaciones menores	3 (0.6)	4 (0.8)	0.73 (0.16 - 3.23)	NS
Ingreso a UCIN	43 (8.3)	38 (7.6)	0.89 (0.56 - 1.41)	NS
Días en UCIN	10.3 (6.7 - 14.8)	13.4 (7.1 - 19.8)	-	NS
Mortalidad perinatal	1 ¹	0	-	NS
Notas: ¹ Muerte neonatal				

Tabla XV: Resultados perinatales de los embarazos únicos con ovocitos donados

5.3.3 RESULTADOS PERINATALES DE EMBARAZOS MÚLTIPLES CON OVOCITOS PROPIOS

Los datos fueron además estudiados en los embarazos múltiples conseguidos con ovocitos propios, y en este caso no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros perinatales. Se dio un caso de muerte fetal (*stillbirth*) en el grupo de ovocitos frescos (Tabla XVI).

	Ovocitos frescos (N=136)	Ovocitos vitrificados (N=38)	OR (95% CI)	Valor P
Resultado neonatal				
Neonatos femeninos	74 (54.4)	22 (57.9)	1.14 (0.56 - 2.32)	NS
Peso al nacimiento (g)	2,330 (2,251 - 2,409)	2,380 (2,215 - 2,546)	-	NS
Bajo peso al nacimiento (< 2,500 g)	87 (64.0)	24 (63.2)	0.97 (0.46 - 2.03)	NS
Muy bajo peso al nacimiento (<1,500 g)	5 (3.7)	1 (2.6)	0.71 (0.08 - 6.24)	NS
Peso al nacimiento < 10° percentil	42 (30.9)	12 (31.6)	1.03 (0.48 - 2.24)	NS
Altura neonatal (cm)	46.2 (45.6 - 46.7)	46.8 (45.8 - 47.8)	-	NS
Valor Apgar a 1 minuto	8.8 (8.6 - 9.0)	9.0 (8.7 - 9.2)	-	NS
Valor Apgar a los 5 minutos	9.7 (9.6 - 9.8)	9.7 (9.5 - 9.9)	-	NS
Valor Apgar a los 10 minutos	9.3 (8.8 - 9.9)	9.7 (9.5 - 9.9)	-	NS
Malformaciones fetales	2 (1.5)	0	NA	NS
Malformaciones mayores	1 (0.7)	0	NA	NS
Malformaciones menores	1 (0.7)	0	NA	NS
Ingreso a UCIN	31 (22.8)	9 (23.7)	1.05 (0.45 - 2.45)	NS
Días en UCIN	19.2 (11.7 - 26.7)	9.3 (5.0 - 13.6)	-	NS
Mortalidad perinatal	1° (0.7)	0	-	NS

Tabla XVI: Resultados perinatales de embarazos múltiples con ovocitos propios

5.3.4 RESULTADOS PERINATALES DE EMBARAZOS MÚLTIPLES CON OVOCITOS DONADOS

Igualmente en el caso de los embarazos múltiples conseguidos con ovocitos donados, no se encontraron diferencias significativas en ningún parámetro neonatal entre los dos grupos de estudio. Se observaron tres casos de embarazo trillizos en el grupo de ovocitos vitrificados. Se dio un caso de muerte neonatal en el grupo de ovocitos vitrificados. (Tabla XVII)

Resultado neonatal	Ovocitos frescos (N=320)	Ovocitos vitrificados (N=405) ¹	OR (95% CI)	Valor P
Neonatos femeninos	135 (42.2)	211 (52.1)	1.49 (1.11 - 2.04)	< .02
Peso al nacimiento (g)	2,372 (2,317 - 2,426)	2,412 (2,363 - 2,462)	-	NS
Bajo peso al nacimiento (< 2,500 g)	182 (56.9)	212 (52.3)	0.83 (0.62 - 1.12)	NS
Muy bajo peso al nacimiento (<1,500 g)	17 (5.3)	18 (4.4)	0.83 (0.42 - 1.64)	NS
Peso al nacimiento < 10º percentil	89 (27.8)	130 (32.1)	1.23 (0.89 - 1.69)	NS
Altura neonatal (cm)	46.8 (46.4 - 47.3)	47.0 (46.6 - 47.3)	-	NS
Valor Apgar a 1 minuto	8.8 (8.7 - 8.9)	8.6 (8.5 - 8.7)	-	NS
Valor APAGAR a los 5 minutos	9.5 (9.4 - 9.6)	9.4 (9.3 - 9.5)	-	NS
Valor APGAR a los 10 minutos	9.4 (9.2 - 9.7)	9.5 (9.3 - 9.7)	-	NS
Malformaciones fetales	5 (1.6)	7 (1.7)	1.10 (0.34 - 3.52)	NS
Malformaciones mayores	3 (0.9)	5 (1.2)	1.34 (0.32 - 5.67)	NS
Malformaciones menores	2 (0.6)	2 (0.5)	0.79 (0.11 - 5.63)	NS
Ingreso a UCIN	81 (25.3)	83 (20.5)	0.76 (0.54 - 1.09)	NS
Días en UCIN	13.3 (10.5 - 16.0)	13.2 (10.5 - 15.9)	-	NS
Mortalidad perinatal	0	2 ² (0.5)	-	NS

Notas: 1 Han habido tres casos de trillizos dicigóticos
2 una muerte neonatal y una muerte intrauterina

Tabla XVII: Resultados perinatales de embarazos múltiples con ovocitos donados

5.3.5 RESULTADOS PERINATALES GLOBALES

Se compararon todos los datos recogidos de los embarazos y complicaciones en el momento del parto de los dos grupos teniendo en cuenta también si los embarazos fueron únicos o gemelares, ya que como ha sido comentado en la sección de *Introducción*, los partos múltiples continúan siendo hoy por hoy el mayor riesgo de las parejas que necesitan tratamientos de fertilidad, además los riesgos de las gestaciones múltiples, son bien conocidos, por ejemplo, mayor índice de mortalidad perinatal, parto pretérmino, cesárea, bajo peso al nacimiento, preeclampsia, diabetes gestacional, desprendimiento de placenta, placenta previa y hemorragia postparto. El tipo de parto y el porcentaje de problemas post-parto fueron también comparables entre los dos grupos (Tabla XVIII).

	Ovocitos frescos (n=1224)	Ovocitos vitrificados (n= 1027) ¹	P
Recién nacidos niñas	580 (47,4)	553 (53,8)	<0,003
Peso al nacer (g)	2.871 (2.834-2.908)	2.859 (2.818-2.901)	NS
Peso niñas (g)	2.843 (2.816-2.870)	2.823 (2.810-2.876)	NS
Peso niños (g)	2.893 (2.851-2.934)	2.843 (2.816-2.871)	NS
Bajo peso (<2.500g)	341 (27,8)	277 (27,0)	NS
Muy bajo peso (<1.500g)	30 (2,5)	24 (2,3)	NS
Pequeño tamaño (<10º percentil)	208 (17,0)	201 (19,6)	NS
Altura (cm)	48,8 (48,7-49)	48,9 (46,6-49,1)	NS
Puntuación Apgar 1 min	8,9 (8,8-8,9)	8,8 (8,7-8,9)	NS
Puntuación Apgar 5 min	9,6 (9,5-9,7)	9,6 (9,5-9,6)	NS
Puntuación Apgar 10 min	9,6 (9,5-9,7)	9,6 (9,5-9,7)	NS
Defectos al nacer	17 (1,4)	17 (1,7)	NS
Malformaciones mayores	10 (0,8)	7 (0,7)	NS
Malformaciones menores	7 (0,6)	10 (1,0)	NS
Entrada a cuidados intensivos	175 (14,3)	145 (13,1)	NS
Días en cuidados intensivos	12,6 (10,5-14,7)	12,3 (10,0-14,5)	NS
Mortalidad perinatal ²	2 ² (0,2)	2 ² (0,2)	NS

Notas: 1 Ha habido tres casos de embarazos de trillizos dicigóticos
2 Un caso de muerte neonatal y de muerte intrauterina en cada grupo

Tabla XVIII: Resultados globales neonatales de la población estudiada.

RESULTADOS

En las tablas XIX y XX se reportan las malformaciones mayores y menores en los dos grupos de embarazos con ovocitos frescos o vitrificados, únicos o múltiples.

Ovocitos frescos			
Único / Múltiple	DO - Propio	Malformaciones mayores N=10	Malformaciones menores N=6
Múltiple	DO	Síndrome de Russell-Silver	
Múltiple	DO	Onfalocele	
Múltiple	DO	Malformación de Chiari tipo I	
Múltiple	Propio	Agenesia renal unilateral	
Único	DO	Hernia diafragmática	
Único	DO	Agenesia renal unilateral	
Único	DO	Valvulopatías	
Único	DO	Estenosis del tronco pulmonar	
Único	DO	Atresia intestinal	
Único	Propio	Malformación de Dandy Walker	
Único	Propio	Agenesia de la mano derecha (falta de tres dedos)	
Múltiple	Propio		Hipospadias
Único	DO		Comunicación interauricular
Único	DO		Comunicación interauricular
Múltiple	DO		Escoliosis infantil
Múltiple	DO		Comunicación interauricular
Único	Propio		Displasia congénita de cadera
Múltiple	DO		Sindactilia

Tabla XIX: Malformaciones en el grupo de embarazos con ovocitos frescos

RESULTADOS

Ovocitos vitrificados			
Único / Múltiple	DO - Propio	Malformaciones mayores N=7	Malformaciones menores N=10
Múltiple	DO	Riñón izquierdo hipoplásico	
Múltiple	DO	Agenesia renal	
Múltiple	DO	Agenesia del cuerpo caloso	
Múltiple	DO	Espina bífida	
Múltiple	DO	Malformación de Chiari tipo I	
Único	DO	Cataratas congénita	
Único	DO	Craneosinostosis, trigonocefalia, pulgar en resorte.	
Único	DO		Polidactilia
Único	DO		Comunicación interauricular
Único	DO		Hidronefrosis
Único	DO		Laringomalacia
Único	Propio		Laringomalacia leve, Reflujo vesicoureteral
Único	Propio		Hidronefrosis derecha
Único	Propio		Displasia congénita de cadera
Múltiple	DO		Polidactilia
Múltiple	DO		Comunicación interauricular
Múltiple	DO		Sindactilia

Tabla XX: Malformaciones en el grupo de embarazos con ovocitos vitrificados

Todos estos resultados fueron analizados teniendo en cuenta los posibles factores de confusión que pueden alterar los resultados finales. Se tuvieron en cuenta los siguientes factores:

- Origen de los ovocitos (propios o donados)
- Embarazos únicos o múltiples
- Transferencia a fresco o de embriones congelados
- Abortos anteriores
- Edad materna
- Edad de la donante al momento de la punción ovocitaria,
- Día de la transferencia
- Paridad,
- Tipo de protocolo (natural, estimulado, terapia hormonal sustitutiva)
- Factor masculino (donante, normozoospermia, infertilidad masculina no severa, factor masculino severo)
- *Vanish embryo*

Se observó que después de ajustar todos los datos con regresión logística multivariable por estos potenciales factores que pueden influir negativamente (edad materna, etc.), el proceso de vitrificación no tiene ningún efecto sobre ningún parámetro estudiado excepto en dos casos:

- Mayor uso de técnicas de diagnosis invasivas (biopsia corial y la amniocentesis), (*adjusted* OR = 2.12; 95 % CI 1,41- 3,20):
- Menor incidencia de infecciones del tracto urinario (*adjusted* OR = 0.51; 95 % CI 0,28-0,91); ambos en el grupo de ovocitos vitrificados

Desde el punto de vista de las complicaciones del embarazo, no se encontraron diferencias en:

- Casos de sangrado en el primero, segundo o tercer trimestre el embarazo
- Anemia
- Colestasis gestacional,
- Diabetes,
- Hipertensión gestacional,
- Desprendimiento prematuro de la placenta
- Partos prematuros

RESULTADOS

	OR ajustado (95%)	Valor P
Embarazo		
Sangrado en 1er trimestre	1,24 (0,94 - 1,63)	NS
Amniocentesis /Villocentesis	2,12 (1,41 - 3,20)	<0,001
Anemia (Hb<11 g/dl)	1,23 (0,71 - 2,12)	NS
Colestasis gestacional	1,47 (0,62 - 3,50)	NS
Diabetes	0,86 (0,56 - 1,31)	NS
Sangrado en el 2 o 3 trimestre	1,59 (0,97- 2,62)	NS
RPM < 37 semanas	1,07 (0,62 - 1,84)	NS
Hipertensión gestacional	0,84 (0,59 - 1,20)	NS
Infecciones urinarias	0,51 (0,28 - 0,91)	<0,0018
Parto		
Parto prematuro (< 37 sem)	0,70 (0,50 - 1,00)	NS
Parto muy prematuro (<34 sem)	0,85 (0,49 - 1,49)	NS
Cesárea	1,26 (0,93 - 1,69)	NS
Problemas post-parto	0,76 (0,47 - 1,21)	NS
Recién nacidos		
Recién nacidos niñas	1,15 (0,48 - 1,42)	NS
Bajo peso (< 2500 g)	1,06 (0,78 - 1,42)	NS
Muy bajo peso (1500 g)	1,04 (0,49 - 2,23)	NS
Pequeño tamaño (<10º percentil)	1,21 (0,88 - 1,65)	NS
Defectos al nacer	0,81 (0,53 - 1,20)	NS
Malformaciones mayores	1,21 (0,39 - 3,61)	NS
Malformaciones menores	0,32 (0,06 -1,64)	NS
Entrada a cuidados intensivos	1,10 (0,79 - 1,52)	NS

Tabla XXI: Análisis de regresión logística que presenta los ORs ajustados con los principales factores de confusión



Discusión

6

La vitrificación de ovocitos es una técnica que fue introducida hace poco tiempo en los laboratorios de reproducción asistida. En nuestro caso, fue introducida en el programa de ovodonación en el 2007. Esta técnica, como ya hemos comentado, tiene mejores resultados que el protocolo de congelación lenta de los ovocitos y por tanto se está implementando como técnica de rutina en la mayoría de los laboratorios de fecundación asistida. Gracias a ella, se está incrementando el número de recién nacidos que nacen tras TRA con ovocitos vitrificados y por tanto ha sido necesario realizar un estudio como el que presentamos con esta tesis, ya que el número de estudios publicados en los que se analizan los resultados tanto obstétricos como perinatales de estos recién nacidos es mínimo.

6.1 - CONSIDERACIONES GENERALES

Este trabajo es uno de los pocos trabajos que existen en donde han sido evaluados, en una amplia población, los resultados obstétricos y neonatales de embarazos obtenidos tras criopreservación ovocitaria.

Como todo trabajo científico, nuestro estudio tiene una serie de puntos fuertes y puntos débiles. Comenzando por los puntos fuertes del estudio, podemos mencionar los siguientes:

- La casuística aportada es la más amplia publicada hasta la fecha.
- Todos los datos han sido generados en un solo centro de esterilidad, por tanto el protocolo utilizado para la vitrificación de los ovocitos ha sido siempre el mismo, así como el protocolo de la estimulación ovárica y otras variables que pueden influir en los resultados de los ciclos de reproducción asistida han sido iguales en los dos grupos de estudio (ovocitos frescos versus ovocitos vitrificados).
- Todos los análisis estadísticos fueron realizados sobre la muestra global y también separando en subgrupos según el origen de los ovocitos (ovocitos propios/donados) y el número de fetos (embarazos únicos/múltiples). No hemos encontrado diferencias relevantes en los resultados obstétricos y neonatales en ninguno de los subgrupos analizados. Hasta la fecha éste es el único estudio publicado que compara estos subgrupos.
- Nuestro estudio tiene a su favor que es uno de los pocos estudios realizados sobre vitrificación ovocitaria a dos brazos, es decir con un grupo control de ovocitos frescos que tiene las mismas condiciones que el grupo de estudio.
- Todas las mujeres incluidas en el estudio son infértiles, así que el error debido a la infertilidad ha sido mínimo o ausente, ya que, si existe, está presente en los dos grupos de población estudiados.
- Otro de los puntos de fuerza de este estudio fue el uso apropiado del análisis estadístico que ha permitido eliminar potenciales factores de confusión que pudieran

haber influido en los resultados obstétricos y neonatales con respecto a las características basales de los dos grupos de estudio. Así, ha sido posible excluir factores de confusión como: la edad materna avanzada, el tipo de estimulación ovárica, el uso de ovocitos donados, embarazos múltiples, etc.

Ahora bien, tenemos que reconocer que nuestro estudio también tiene una serie de limitaciones:

- Al proceder nuestras pacientes de diversos países y haberse llevado el control gestacional en diferentes hospitales y tratarse de un estudio retrospectivo, se analizaron sólo aquellos embarazos en los que tenemos constancia de su devenir obstétrico y perinatal, no habiéndose podido evaluar aquellos embarazos que se perdieron en el seguimiento.
- En el análisis se observa que tenemos una mayor proporción de embarazos obtenidos utilizando ovocitos vitrificados comparado con los embarazos obtenidos con ovocitos frescos. Esto puede ser considerado un sesgo potencial, pero fue realizado para obtener el máximo número de casos posible en el grupo con menor información disponible, en este caso el grupo de ovocitos vitrificados. Podemos de todas formas afirmar que los resultados obtenidos en el grupo de ovocitos frescos son similares a los obtenidos en estudios publicados anteriormente (Van Heesch et al., 2014).
- Aunque la información del devenir obstétrico y neonatal ha sido recogida en su mayoría a partir de los datos contenidos en la historia clínica, en algunos casos hemos tenido que basarnos en un cuestionario remitido por las propias pacientes. Sin embargo, en caso de duda, se contactó con los médicos responsables para contrastar la información recibida.
- En nuestro estudio han sido analizados sólo los embarazos que han llegado a las 24 semanas de gestación. Por tanto, se ha perdido la información con respecto a los abortos precoces, embarazos ectópicos o interrupciones del embarazo debido a malformaciones fetales. Aun así, un trabajo previo de nuestro grupo ya ha analizado parcialmente esta cuestión, observándose una tasa similar de abortos en embarazos conseguidos tras TRA

con ovocitos frescos comparado con ovocitos criopreservados, concluyendo que la tasa de aborto precoz no parece estar afectada por el proceso de vitrificación ovocitaria (Cobo et al., 2010).

Aun teniendo en cuenta estos puntos débiles, no podemos olvidar los puntos fuertes de nuestro estudio. Uno de ellos, como ya se ha comentado anteriormente, es la gran casuística incluida en el estudio.

Después de analizar nuestros resultados de embarazos tras vitrificación ovocitaria, no hemos observado ningún efecto negativo a nivel obstétrico o perinatal. A pesar de la heterogeneidad de los grupos, las características basales del grupo de estudio y el grupo control son bastante similares, salvo pequeñas diferencias, que pensamos no han influido en nuestros resultados gestacionales. Así, hubo un número menor de ovocitos en metafase II en el grupo de los vitrificados, quizás debido a que existe una más alta proporción de bajas respondedoras en este grupo. Una edad materna más avanzada en el grupo que concibió utilizando ovocitos vitrificados provenientes de ovodonación que está relacionado con una más alta proporción de ciclos con ovocitos donados en este grupo. A pesar de estas diferencias, nuestros resultados no desvelan un aumento del riesgo ni de los resultados obstétricos ni perinatales en el grupo de ovocitos vitrificados (Tablas IX a,b, X a,b, XIa,b, XIIa,b, XIII a,b, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII)

Como se puede observar, la Tabla V recoge las principales causas de infertilidad en ambos grupos. En particular vemos un aumento significativo de mujeres con baja respuesta y con edad materna avanzada en el grupo de ovocitos vitrificados. Este resultado era de esperar, debido a que estos grupos de pacientes necesitan por normal general repetir varios ciclos de estimulación para poder tener un número óptimo de ovocitos. En cambio, encontramos un menor número de casos de ovario poliquístico, factor tubárico y factor masculino en el grupo de ovocitos vitrificados, en este caso es debido a que estos subgrupos de pacientes, por norma general, son buenas respondedoras y el número de ovocitos que se recuperan después de una estimulación es suficiente.

Otros factores que pueden influir en la calidad ovocitaria y en los resultados obtenidos no han resultado significativos, incluyendo entre ellos: dosis total de gonadotropina utilizada en los ciclos de estimulación, duración de la estimulación y los niveles de estrógenos. Por último,

DISCUSIÓN

podemos observar que en el grupo de ovocitos propios la media del número de ovocitos en metafase II es mayor y estadísticamente significativo en el grupo de ovocitos frescos con respecto a los ovocitos vitrificados (diferencia que no se observa en el grupo de ovocitos donados), siempre debido a que las pacientes del grupo de ovocitos vitrificados eran en mayor número pacientes con mayor edad y bajas respondedoras.

Como resultado de todos estos análisis podemos concluir que no existe un incremento del riesgo en cuanto a resultados obstétricos adversos en embarazos conseguidos tras TRA provenientes del uso de ovocitos vitrificados comparado con el uso de ovocitos frescos, especialmente si consideramos que en el grupo de ovocitos vitrificados analizado existía un mayor número de factores que podían aumentar este riesgo (las mujeres tiene una edad más avanzada, existe una mayor proporción en el uso de ovocitos donados, mayor tasa de embarazos múltiples, incluidos algún embarazo de trillizos). Estos resultados nos llevan a la conclusión de que el uso de ovocitos vitrificados no tiene ningún efecto negativo sobre fenómenos como la placentación, el desarrollo fetal o la progresión normal del embarazo.

6.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA VITRIFICACIÓN OVOCITARIA E INFLUENCIA SOBRE LOS RESULTADOS DE TRA

En años recientes, el desarrollo del proceso de vitrificación ha tenido como resultado en los programas de reproducción asistida una tasa de éxito similar a los ciclos que utilizan ovocitos frescos en cuanto a tasa de fertilización, formación de embriones y blastocistos, implantación y embarazo (Rienzi et al., 2010; Cobo y Díaz, 2011; García et al., 2011; Parmegiani et al., 2011, Trokoudes et al., 2011, Goldman et al., 2013). En el caso del estudio de Trokoudes y colaboradores (2011), utilizan ovocitos donados, por tanto este estudio tiene una gran ventaja ya que los ovocitos tanto del grupo en fresco como del grupo vitrificado son de una calidad homogénea ya que fueron obtenidos de donantes jóvenes.

Importante destacar el estudio de metanálisis de Cobo y Díaz (2011) donde analizan los pocos estudios aleatorizados controlados que utilizan ovocitos humanos (congelados y frescos). En este estudio de metanálisis fueron incluidos 5 estudios hasta la fecha publicados (Cobo et al., 2008; Cao et al., 2009; Cobo et al., 2010; Rienzi et al., 2010; Smith et al. 2010). Se estudió un total de 4282 ovocitos vitrificados, 3524 ovocitos frescos y 361 ovocitos criopreservados con método lento. Los resultados desde el punto de vista clínico (supervivencia ovocitaria, tasa de fertilización, calidad embrionaria) fueron mejores en el grupo de ovocitos vitrificados comparados con aquellos congelados con el método de congelación lenta. Como conclusión se observó que la tasa de embarazos evolutivos, de embriones de buena calidad y la tasa de fertilización fueron similares entre el grupo de ovocitos vitrificados y el de ovocitos frescos (Cobo y Díaz, 2011).

Aunque todos estos estudios son importantes a la hora de asegurar que el proceso de vitrificación no tiene efectos negativos sobre los recién nacidos es importante destacar que la mayoría de estudios han sido realizados en embriones/blastocistos vitrificados y es difícil extrapolar los datos recogidos en estos casos y compararlos con los obtenidos con ovocitos vitrificados. Esto es debido a que el ovocito es una única célula mucho más sensible a los procesos de vitrificación/descongelación que un embrión por diferentes motivos: en primer lugar todos los mecanismos celulares de defensa se concentran en una única célula, en segundo lugar como ha sido comentado en la introducción existen factores intrínsecos al ovocito que

hacen que sea una célula especial a la hora de criopreservar, por ejemplo: el gran tamaño de la célula, el gran contenido en agua, la presencia del huso mitótico, etc.

Por tanto, se ha intentado estudiar desde un punto de vista biológico los cambios que tienen lugar en el ovocito criopreservado. La mayoría de estudios han sido realizados en ovocitos de otras especies de mamíferos y se han estudiado los efectos de la criopreservación en diversas estructuras:

- La zona pelúcida (Khalili et al., 2012): en este trabajo los autores muestran como los ovocitos congelados muestran en general una estructura similar a los frescos. Pero muestran las células del cúmulo disgregadas y una alteración de la zona pelúcida con una reducción de las microvellosidades focales.
- Los filamentos de actina (Bogliolo et al., 2014): en este estudio se utilizaron ovocitos de oveja para ver los efectos de la vitrificación sobre la red de actina. Los autores concluyen que los efectos de la vitrificación pueden variar entre las diferentes especies. Por tanto, se requieren trabajos similares con ovocitos humanos para poder confirmar daños en la estructura del citoesqueleto de actina en los ovocitos humanos.
- La homeostasis mitocondrial (Chamayou et al., 2011): éste ha sido uno de los primeros estudios en evaluar los efectos de la criopreservación en la homeostasis mitocondrial de los ovocitos. En particular los autores muestran como la vitrificación produce un daño celular que se refleja en una reducción del contenido de RNA mensajero mitocondrial.

En el caso de los ovocitos humanos debido a una problemática ética y/o de legislación, existe poca disponibilidad de estudiarlos. Por tanto, los trabajos presentes en bibliografía son escasos. Uno de los primeros estudios realizados con ovocitos humanos ha sido el trabajo de Cobo y cols. (2008b), donde se comparaba el efecto en la repolimerización de los husos mitóticos de los ovocitos congelados con diferentes protocolos de criopreservación con ovocitos frescos. En este estudio se observó que el porcentaje de ovocitos crioconservados y después descongelados que muestran una configuración normal de huso no varía entre los diferentes protocolos utilizados (Cobo et al., 2008b). Resultados diferentes han sido publicados más recientemente por el grupo de Coticchio y cols. (2009). En este estudio, utilizando la microscopía confocal

de alto rendimiento, observaron los efectos de la vitrificación en el huso mitótico. Como resultado del estudio pudieron observar que en el grupo de ovocitos vitrificados, después de la descongelación un 32,6% de ellos poseía un huso mitótico intacto/normal. En cambio, en los ovocitos frescos encontraban un 59,1% de ellos con un huso mitótico normal (Coticchio et al., 2009).

Por último, Nohales-Corcoles y cols (2016) han estudiado el efecto de la vitrificación de ovocitos en la actividad mitocondrial. En este estudio un total de 359 ovocitos fueron vitrificados y descongelados, de ellos el 82,5% sobrevivió al proceso. Después fue evaluada la actividad mitocondrial, el estrés oxidativo, y la cantidad de especies reactivas de oxígeno en un total de 220 ovocitos. Para completar el estudio fueron evaluados también los niveles de los co-enzimas NADH y FAD, que se utilizan como biomarcadores de la función mitocondrial. En este estudio se concluye que el efecto de la vitrificación, después de dos horas de la descongelación no afecta el potencial de la membrana de la mitocondria de los ovocitos y tampoco se observó cambios significativos del estrés oxidativo entre los ovocitos frescos y los descongelados (Nohales-Corcoles et al., 2016).

Es bien conocido como la mitocondria juega un papel importante en conseguir la completa maduración del ovocito, es uno de los orgánulos celulares más importante para el ovocito ya que se encarga de la producción de energía y controla también la muerte celular programada y la formación del huso mitótico. El resultado de este estudio es importante ya que se conoce que los ovocitos que tienen una alteración de la función mitocondrial se relacionan con una falta de desarrollo de los futuros embriones (Thouas et al., 2004). Una de los puntos débiles de este estudio es que fue realizado con ovocitos que no han sido fertilizados después de una ICSI o con ovocitos que han sido madurados in Vitro. Por tanto, podría no reflejar lo que realmente sucede en un ovocito MII completamente maduro. Por todo ello, se necesitarían estudios en los que se estudien estos mismos efectos en ovocitos MII completamente maduros.

Un último estudio que cabe destacar en este ámbito es el estudio realizado por Domínguez y cols. (2013) en el cual, desde un punto de vista diferente, estudia el efecto de la vitrificación de los ovocitos sobre el metabolismo de los embriones generados (Dominguez et al., 2013). Este es el único artículo publicado hasta la fecha, en donde se estudió el perfil metabólico de los embriones generados a partir de ovocitos vitrificados.

En este artículo los autores estudiaron el perfil metabólico del medio de cultivo donde crecían los embriones provenientes tanto de ovocitos frescos como de ovocitos criopreservados. Los ovocitos de ambos grupos provenían de donantes de entre 18 y 35 años. El perfil metabólico fue estudiado con la técnica de espectrofotometría de masas y el medio de cultivo analizado provenía de embriones en el tercer día de desarrollo. Uno de los puntos positivos del estudio es su relativa gran casuística con una $n=190$ (grupo de vitrificados $n=65$ y el grupo de ovocitos frescos de $n=59$ y un grupo de control de $n=66$). Estos autores concluyen que aunque encuentran pequeñas diferencias en algún metabolito en particular, entre ovocitos vitrificados y ovocitos frescos, analizando el medio de cultivo de los embriones generados, el resultado más importante de este estudio es que no encuentran ninguna diferencia en el desarrollo de los embriones ni en el perfil metabólico global de los mismos (Dominguez et al., 2013). Los autores concluyen el estudio con los datos clínicos: la tasa de embarazo e implantación fueron las mismas en ambos grupos. Cabe destacar que la edad gestacional y el peso al nacer fueron también iguales en ambos grupos (Dominguez et al., 2013), concluyendo que el protocolo de vitrificación es seguro y no altera el metabolismo general y el desarrollo de los embriones que proceden de ovocitos vitrificados.

Como conclusión podemos destacar que en general, se necesitan más estudios a nivel biológico para comprender desde un punto de vista celular el posible daño que puede ejercer el proceso de vitrificación en los ovocitos humanos, y si el ovocito es capaz, desde un punto de vista metabólico, de compensar estos efectos.

6.3 - INFLUENCIA DE LA OVODONACIÓN Y DE LA VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA EN LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES

Dada la escasez de publicaciones sobre los resultados obstétricos en embarazos conseguidos tras vitrificación ovocitaria, conviene repasar los datos provenientes de la ovodonación y la vitrificación embrionaria por estar también relacionado con el tema de esta tesis.

Recientemente en la bibliografía existen algunos trabajos de metanálisis en los que se estudian los resultados obstétricos/perinatales comparando ovodonación con embarazos con ovocitos propios y/o embarazos espontáneos (Savasi et al 2016). En este caso uno de los últimos metanálisis publicados demuestran un riesgo más elevado de HTG y PE en el grupo de ovocitos donados, tanto en embarazos únicos y múltiples, comparándolo con el grupo con ovocitos propios (Masoudian et al 2016, Storgaard et al 2016). Sin embargo, estos trabajos no estudian casos de vitrificación ovocitaria.

Existen una gran variedad de estudios donde se observan a los recién nacidos después de la transferencia de embriones congelados comparándolos con aquellos nacidos después de transferir embriones frescos (Wennerholm et al 1998, Maheshawari et al 2012, Maheshawari et al. 2013). En estos casos la conclusión general es que el proceso de criopreservación no afecta de forma adversa al desarrollo fetal y tampoco incrementa el riesgo perinatal.

Uno de los primeros trabajos fue el del grupo de Wennerholm y cols (1998), que estudió durante los 18 meses después del parto a los niños concebidos después de transferir embriones congelados y concluyó que la preservación no afectaba ni al desarrollo del recién nacido ni a la prevalencia de determinadas enfermedades (Wennerholm et al., 1998).

Otros en cambio muestran resultados diferentes, por ejemplo el trabajo de Belva y cols (2008), estudian los resultados neonatales de los niños concebidos tras transferencia de embriones frescos versus congelados teniendo en cuenta la técnica utilizada (ICSI o FIVET), y observan que en el grupo de los niños provenientes de embriones congelados el peso, la altura y el diámetro de la cabeza es mayor que en el grupo de embriones frescos ($p < 0,001$). En el caso de las malformaciones encontraron una mayor tasa de malformaciones en el grupo de embriones criopreservados (ICSI y FIVET) comparando con el grupo de embriones frescos (ICSI y

FIVET) (Belva et al., 2008), aun así hay que señalar que en este estudio no se consideró los diferentes momentos en los que han sido congelados de los embriones (día 3, 4, o 5) y la calidad de los mismos. La mayoría de los estudios publicados han sido realizados con embriones en día 3 de desarrollo embrionario, y después de congelación lenta. Sólo algunos de ellos han sido realizados sobre embriones vitrificados, tanto en día 3 como en estado de blastocisto (Pinborg et al 2013). Otros trabajos publicados muestran como los resultados de los niños nacidos tras transferencia de embriones congelados son similares o incluso mejores que de los niños nacidos tras transferencia de embriones en fresco (Pelkonen et al., 2010). En el primer estudio de Pelkonen y cols (2010) estudian una población finlandesa de niños nacidos tras una transferencia de embriones congelados (n=2293) y de embriones frescos (n=4151) y los comparan con una amplia población de embarazos espontáneos (n=31946). En este trabajo, el grupo de embriones congelados tenía una menor tasa de parto pretérmino y de bajo peso al nacer comparándolo con el grupo de embriones frescos (Pelkonen et al., 2010). Más recientemente el mismo grupo ha publicado un estudio similar al anterior de cohortes en el que se registran todos los nacimientos desde el 1995 hasta el 2006, para poder analizar así una población más numerosa. Como en el estudio previo, Pelkonen y cols (2014) encontraron una disminución del número de partos pretérmino en el grupo de embriones congelados comparado con el grupo de embriones en fresco, siempre considerando los embarazos únicos (Pelkonen et al., 2014).

El problema de algunos estudios es que no consideran el estado del embrión en el momento de la transferencia, si es al segundo, tercer día o al estadio de blastocisto. Existe un estudio reciente en el que tienen en cuenta este hecho y estudian solo los niños nacidos tras la transferencia de embriones congelados o frescos pero considerando el mismo estadio de desarrollo embrionario (día 3) (Liu et al., 2013). En este caso no observan ningún efecto negativo a nivel de resultados neonatales entre los grupos, la única diferencia es el mayor peso al nacer en los niños procedentes de embriones vitrificados comparado con el grupo de embriones frescos (Liu et al., 2013).

En el caso de estudios considerando solo transferencia de blastocistos, uno de los más recientes y con mayor casuística es el del grupo japonés de Ishihara y cols (2014), con un total de 277.042 niños nacidos. En este estudio observaron un mayor riesgo de placenta acreta y un

mayor riesgo de hipertensión en el grupo de blastocistos congelados, pero no fueron analizadas las tasas de malformaciones (Ishihara et al., 2014).

Por otro lado, en algunos estudios también se ha descrito una posible relación del proceso de congelación embrionaria con aumento del riesgo de acretismo placentario (Kaser et al 2015). En este estudio retrospectivo caso-control se valoraron los resultados de las transferencias embrionarias congelados (N= 1571) entre el 2005 y 2011 que dieron lugar a nacimientos y se consideró la tasa de placenta acreta. Los 50 casos encontrados fueron analizados por diferentes factores con regresión logística, y fueron encontrados como factores predisponentes: la raza no caucásica (OR 2,85), factores de infertilidad uterinos (OR 5,8), una miomectomía previa laparotómica o laparoscópica (OR 7,24), o una placenta previa persistente o resuelta (OR 4,25). El espesor endometrial y el nivel sérico de E2 en las transferencias de embriones congelados con acretismo placentarios eran en proporción más bajos. La placenta acreta es definida como la ausencia de la capa de decidua basal del endometrio, y como consecuencia las vellosidades se anclan directamente al miometrio. Si analizamos las alteraciones a nivel histológico e inmunohistoquímico, se ha descrito que las placentas tras DO muestran una deciduitis difusa crónica con una deposición fibrinoide en el plato basal, así como una infiltración aumentada de células mononucleares comparada con las placentas de embarazos tras FIV/ICSI autólogos (Gundogan et al., 2010, van der Hoorn et al., 2010). Este patrón inmuno-mediado está considerado como la única señal de la concepción con DO y ha sido postulado que sea representativo de algún tipo de reacción injerto contra huésped (Stoop et al., 2012).

En cambio en el último estudio de Belva y cols (2016), solo observaron un aumento del riesgo de hipertensión pero ningún efecto sobre la tasa de malformaciones congénitas en ambos grupos (Belva et al., 2016), en este caso también fueron analizados embriones (día 3 de desarrollo) y blastocistos.

En un metanálisis reciente que compara los resultados obstétricos de niños tras transferencia en estadio embrionario (día 3) frente transferencia a estadio de blastocisto se observa una mayor tasa de partos pretérminos (RR 1,27; 95%IC 1,22-1,31), y una disminución del riesgo de restricción del crecimiento (RR 0,82; 95% IC 0,77-0,88) (Maheshwari et al., 2013).

DISCUSIÓN

Estos resultados contradictorios entre los diversos trabajos publicados pueden ser atribuidos a diferencias metodológicas entre los estudios (Maheshwari et al., 2013, Fauser et al., 2014, Belva et al., 2016). Así, en cuanto a la recogida de los datos, por ejemplo, algunos estudios no recogen los datos de las diversas técnicas de TRA al mismo tiempo, o pueden perderse datos entre los diferentes grupos. También resulta muy común no descartar posibles factores de confusión. Otros problemas son la falta de datos epidemiológicos basales de las madres, o la falta de una definición explícita de “anomalía congénita”. Todo ello dificulta la comparativa entre estudios.

6.4 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE LA VITRIFICACIÓN OVOCITARIA

6.4.1 – ABORTOS Y ECTÓPICOS

Aunque la patología del primer trimestre no fue analizada en nuestro estudio, un trabajo previo de nuestro grupo ya ha analizado parcialmente esta cuestión, observándose una tasa similar de abortos en embarazos conseguidos tras TRA con ovocitos frescos comparado con ovocitos criopreservados, concluyendo que la tasa de aborto precoz no parece estar afectada por el proceso de vitrificación ovocitaria (Cobo et al., 2010).

6.4.2 – ANOMALÍAS CONGÉNITAS Y TÉCNICAS INVASIVAS

En las últimas décadas el número de estudios que incluyen nacidos tras la transferencia de ovocitos criopreservados ha ido en aumento. Claramente la parte más importante a considerar de una nueva técnica es la seguridad y aunque la incidencia de anomalías en los niños nacidos tras el uso de ovocitos criopreservados parece ser similar a la de los niños nacidos tras el uso de ovocitos frescos (Chian et al., 2008, Noyes et al., 2009, Scaravelli et al., 2010). Aun así, pensamos que es necesario continuar realizando un seguimiento a largo plazo de estos recién nacidos para confirmar estos resultados.

Uno de los primeros estudios publicados que evalúa la seguridad de la criopreservación ovocitaria (vitrificación) fue el trabajo de Chian y colaboradores (2008). En este estudio se analizaron los resultados obstétricos y perinatales de 165 embarazos con 200 niños nacidos tras TRA con ovocitos vitrificados incluyendo los datos de 3 diferentes centros de reproducción asistida (Canadá, Colombia y México), los resultados fueron similares a los resultados obtenidos en embarazos naturales y en embarazos tras TRA (Tan et al., 1992; Chian et al., 2008).

Más tarde Noyes y colaboradores (2009) realizaron una revisión comparando los nacimientos de concepción natural y los nacimientos provenientes de ovocitos criopreservados. En este

estudio se recogen 58 artículos (43 del método de congelación lenta, 12 con metodología de vitrificación y 3 con ambos métodos) con un total de 936 recién nacidos tras TRA con ovocitos criopreservados (tanto por congelación lenta como vitrificados) comparándolos con los datos de los nacimientos de concepción natural de la US National Statistics for Birth Outcome. El resultado fue que el porcentaje de malformaciones encontrada (1,3 %) en el grupo criopreservado tras TRA era comparable al grupo control, siempre teniendo en cuenta que tanto el factor criopreservación (cabe destacar que fueron incluidos ovocitos congelados con el protocolo lento y ovocitos vitrificados la mayoría autólogos) fue presente, como el factor TRA estaban incluidos porque fue comparado con un grupo de embarazos de concepción natural. Aún así los resultados fueron similares en ambos grupos (Noyes et al., 2009).

La mayoría de las malformaciones estructurales de los embarazos de concepción natural son las cardíacas, defectos del tubo neural, paladar hendido y labio leporino. En particular, los defectos del tabique interventricular ocurren en más de uno de cada 100 nacimientos. El paladar hendido ocurre en uno de cada 700 nacimientos (Bellis et al., 1999). El pie equino varo tiene una incidencia de uno cada 735 nacimientos naturales. (Center for Disease Control, 1997).

Otro parámetro obstétrico en el que se relevó una diferencia entre ambos grupos analizados en nuestro estudio fue el hecho de que en el grupo de ovocitos donados vitrificados se observó un mayor número de casos en los que se utilizaron técnicas como la biopsia corial o la amniocentesis, en este caso la edad de las pacientes resulta similar entre ambos. Este hecho puede ser explicado a que el efecto de la vitrificación sobre los ovocitos no es del todo conocido, por tanto el médico/paciente puede estar más predispuesto a realizar una de estas técnicas prenatales invasivas para asegurar la salud fetal.

6.4.3 – TRASTORNOS HIPERTENSIVOS

En el metanálisis de Pandey y cols (2012), los embarazos tras TRA presentan mayor riesgo de HTG que los embarazos de concepción natural, con una OR de 1,4 (Pandey et al., 2012). En nuestro trabajo encontramos una incidencia de HTG del 11,7% en los embarazos únicos

con TRA de DO con ovocitos vitrificados y del 18,9% en los embarazos múltiples de DO con ovocitos vitrificados. En el trabajo de Stoop y cols (2012), donde se analizaron los resultados de los embarazos tras DO con ovocitos frescos se encontró un riesgo de HTG en los embarazos únicos del 17% y del 24,6% en los embarazos múltiples (Stoop et al 2012). Si se considera el riesgo de sufrir cualquier trastorno hipertensivo (HTG, preeclampsia o HELLP), la incidencia fue del 27,9% en el grupo de embarazos únicos y del 42,1 % en el grupo de embarazos múltiples (Stoop et al., 2012). En el trabajo del mismo grupo donde se analizaron las complicaciones obstétricas tras DO con ovocitos vitrificados, la incidencia de HTG en los embarazos únicos fue del 20,9% y del 14,3% en los embarazos múltiples (De Munck et al., 2016).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el origen de la HTG y la preeclampsia. Una de estas teorías reconduce a la alterada y/o reducida invasión del trofoblasto y/o la insuficiente transformación de las arterias espirales uterinas. Esto determina una perfusión reducida del trofoblasto (Moffett-King et al., 2002). Debido a la hipoperfusión de la placenta, la madre compensa el flujo sanguíneo reducido aumentando la presión arterial determinando una hipertensión gestacional. La preeclampsia y la HELLP son de las enfermedades más graves de los embarazos que determinan un peso reducido fetal y un riesgo de finalización pretérmino del embarazo.

Otro punto importante de nuestros resultados ha sido comparar la tasa de malformaciones entre los dos grupos. En general, no hemos encontrado un incremento de la tasa de malformaciones entre los dos grupos, incluso tras ajustar los datos por los diferentes factores de confusión. Resultados similares han sido publicados con anterioridad (Noyes et al., 2009; Wennerholm et al., 2009), en los cuales se ha comparado la tasa de malformaciones de niños nacidos tras TRA con ovocitos criopreservados con el método lento de congelación y también con ovocitos vitrificados, con los niños nacidos de embarazos naturales, sin encontrar diferencias significativas. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos existe un grupo control (ovocitos frescos).

En nuestro estudio, de los 1027 niños nacidos tras TRA con ovocitos vitrificados, se encontraron 17 malformaciones fetales, de los cuales 7 fueron malformaciones mayores. No observamos diferencias significativas comparándolos con los ovocitos frescos.

En el caso de los embarazos únicos con ovocitos propios, observamos como la tasa de malformaciones menores (considerando el bajo número de casos presentes) es mayor desde un punto de vista estadísticamente significativo ($P < 0,2$), en el grupo de ovocitos vitrificados comparado con el grupo de ovocitos frescos. Este hecho puede estar relacionado con el hecho de que la edad materna es mayor en el grupo de ovocitos vitrificados.

Recientemente han sido publicados otros estudios. En 2010 el Registro Nacional Italiano publicó un estudio en el que se comparaban el grupo de ovocitos criopreservados (tanto siguiendo el protocolo de congelación lenta como tras vitrificación) con un grupo control compuesto por recién nacidos tras TRA utilizando embriones frescos o congelados provenientes de ovocitos frescos. En este caso la tasa de malformaciones fue más alta en el grupo de ovocitos criopreservados (1,4%) comparándolo con el grupo de ovocitos frescos (1,2%), pero no alcanzó significatividad estadística debido a que el número de ovocitos criopreservados era demasiado baja (solo 582 recién nacidos) (Scaravelli et al., 2010).

6.4.4 – HEMORRAGIA OBSTÉTRICA

Con respecto al sangrado vaginal durante los diferentes trimestres de embarazo, en nuestro trabajo encontramos una incidencia de sangrado del primer trimestre y del segundo tercer trimestre en embarazos únicos similar entre grupos de ovocitos frescos y vitrificados, tanto en los propios como tras DO. En los embarazos múltiples tras DO la incidencia de sangrado del primer trimestre fue del 37,9% en los frescos y del 40,4% en los vitrificados, más elevada si comparada con la incidencia en los embarazos múltiples con ovocitos propios donde era del 20,9 % en los frescos y del 5,3% en los vitrificados. Esto posiblemente se debe a la diferencia del tamaño de la muestra entre los dos grupos. En un estudio reciente que analiza las complicaciones obstétricas en embarazos tras DO con ovocitos frescos, el sangrado vaginal en primer trimestre fue del 21,8% en embarazos únicos y del 17,5% en los múltiples. La incidencia global de sangrado vaginal a lo largo del embarazo fue del 25% y del 22,8%, respectivamente (Stoop et al., 2012).

La presencia de sangrado del primer trimestre aumenta el riesgo de parto pretérmino y parto muy pretérmino (De Sutter et al., 2006) y también aumenta el riesgo de abortos (30,8%) (Pezeshki et al., 2000). La causa del sangrado vaginal puede deberse a trastornos de la placenta, y también se ha descrito que aumenta el riesgo de desprendimiento prematuro de la placenta y de preeclampsia (Weiss et al., 2004).

6.4.5 – DIABETES GESTACIONAL

La diabetes gestacional es la tercera complicación obstétrica que se relaciona con TRA y se ha descrito un mayor riesgo relativo (1,48) con respecto a los embarazos de concepción natural (Pandey et al, 2012). Estudios de cohortes demostraron una incidencia entre el 1,8 y 7,7% tras FIV/ICSI y entre el 1,5 y 5,8 % en los embarazos naturales. En nuestros embarazos con ovocitos propios, la incidencia de DG fue en embarazos únicos con ovocitos frescos del 5,9% y del 10% en embarazos únicos con ovocitos vitrificados, mientras en los embarazos múltiples fue del 14,7% con ovocitos frescos y del 15,8% con ovocitos vitrificados, sin diferencias estadísticamente significativas para ambos grupos. En nuestro grupo de embarazos tras DO con ovocitos vitrificados fue del 9,9% en los únicos, y del 6,9 % en los múltiples sin encontrar diferencias con el grupo de embarazos tras TRA con ovocitos frescos de DO. En el estudio de Stoop y cols (2012) en los embarazos únicos con ovocitos donados frescos la incidencia de diabetes gestacional fue más elevada con respecto al grupo de ovocitos propios (7,5% vs 2,7%), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el estudio de De Munck y cols (2016) sobre embarazos con DO tras vitrificación ovocitaria, la diabetes gestacional (DG) fue encontrado en 12,1% de los embarazos únicos y en el 9,5% de los embarazos múltiples.

La DG está caracterizada por una intolerancia a los carbohidratos consecuencia de una resistencia aumentada a la insulina que surge desde una combinación de una adiposidad materna aumentada y los efectos de las hormonas producidas por la placenta. Por esta razón, se propuso la hipótesis que la HTG y los otros desordenes hipertensivos del embarazo están relacionado con la resistencia a la insulina (Salzer et al., 2015). No está todavía claro si tienen una relación directa o si son enfermedades diferentes con un fenotipo común. De hecho, los problemas de angiogénesis, muy conocidos en la preeclampsia, también se han relacionado

con la DG (Huynh et al, 2015). Se debate también si estas complicaciones obstétricas son el resultado de los defectos de placentación y/o de la insulino-resistencia o si son las consecuencias de los resultados desfavorables de las mujeres con edad avanzada con un perfil hormonal premenopáusico o simplemente de la influencia de la donación ovocitaria. Se piensa que la comprobación de un estado de insulino-resistencia antes del embarazo y la adaptación del régimen dietético en aquellas mujeres más predispuestas a desarrollar una DG podría reducir algunos de estos resultados obstétricos adversos.

6.4.6 – OTRAS COMPLICACIONES GESTACIONALES

El resultado de un tratamiento exitoso es un embarazo sin complicaciones que lleva a un parto de un recién nacido sano. Hasta la fecha, existen datos opuestos sobre la posible influencia de las TRA en los resultados perinatales. Esto podría estar relacionado con el diseño de los estudios observacionales, los factores de confusión en los estudios de casos y controles o en la correcta selección del grupo control (Henningsen y Pinborg, 2014).

En nuestra casuística de embarazos múltiples no se encontraron diferencias significativas en la tasa de complicaciones gestacionales entre ovocitos frescos y vitrificados, tanto considerando ovocitos propios como donados. Este hecho puede ser debido al menor número de casos analizados y/o al hecho de que ambos grupos contienen embarazos de igual alto riesgo obstétrico.

En una revisión de 12 publicaciones de McDonald y cols (2014) , se encontró un mayor riesgo de parto pretérmino (R.R 1.23) y de bajo peso al nacimiento (RR 1.14) en los embarazos múltiples conseguidos tras TRA respecto a los embarazos múltiples naturales. En nuestro estudio encontramos una incidencia de parto pretérmino (< 37 semanas) similar entre ovocitos vitrificados y ovocitos frescos, tanto en embarazos únicos como en múltiples (tabla regresión logística).

En nuestros datos no hubo diferencia estadísticamente significativa en la incidencia de colestasis gravídica entre embarazos con ovocitos frescos y vitrificados. Como no hemos encontrado ningún trabajo que analice esta complicación en embarazos post vitrificación

ovocitaria, solo podemos mencionar un estudio retrospectivo recién publicado de Zhu y cols (2016) que analizaron las complicaciones en embarazos entre el 2006 y el 2014, tras TRA (N= 2641) frente los naturales (N= 5282), y encontraron una mayor incidencia de colestasis gravídica (RR 2.86) en los embarazos únicos tras TRA comparados con los naturales; sin embargo esta diferencia no fue significativa en los embarazos múltiples (Zhu et al 2016).

La presencia de una bacteriuria asintomática durante el embarazo puede determinar un mayor riesgo de pielonefritis (Kazemier et al. 2015). En las diferentes publicaciones sobre los resultados obstétricos en embarazos tras TRA esta problemática del embarazo viene poco citada/ estudiada. Sólo en el trabajo de Reubinoff y cols. (1997) se comenta una incidencia aumentada de infecciones del tracto urinario en la población de pacientes tras FIV (7.3% versus 1.2%), pero si se consideraban los casos de infección urinaria grave que necesitaron de ingreso hospitalario fueron similares.

Con respecto al acretismo placentario en el trabajo de Kaser y cols (2015) se encontró una mayor incidencia de alteraciones placentaria en caso de transferencia de embriones congelados en aquellas pacientes con un espesor endometrial y niveles de estrógenos inferiores. En un trabajo reciente retrospectivo de Royster y cols (2016) se analizó la relación de alteraciones placentarias en los embarazo tras TRA de ciclos en frescos con ovocitos propios y los niveles de estradiol a final de la estimulación ovárica y la utilización de ICSI frente la FIV. En los casos con niveles superiores a 3000 pg/ml de estradiol se encontró un aumento de las complicaciones obstétricas relacionadas con placentación anómala.

Con respecto a la anemia gestacional como ya comentamos en la introducción en el estudio de Qin y cols se encontró una mayor incidencia de anemia durante el embarazo en pacientes sometidas a ciclos de FIV/ICSI (aOR = 2.17) [IC al 95% 1.42-3.31] (Qin et al. 2017). No hemos encontrado ninguna referencia de esta complicación en trabajos previos sobre vitrificación ovocitaria.

6.4.7 – VÍA DEL PARTO

De entre los resultados obstétricos analizados, cabe destacar un aumento de cesáreas en el grupo de ovocitos vitrificados propios comparándolo con el grupo de ovocitos frescos, este resultado puede ser debido a que como anteriormente hemos dicho, en el grupo de ovocitos vitrificados existe un mayor número de pacientes con una edad materna avanzada. En estos casos la indicación de cesárea puede no ser debido a una indicación obstétrica/fetal sino simplemente a una elección por parte de la paciente/médico para asegurar el parto en la manera más segura. El mismo resultado fue obtenido analizando los resultados de forma global (ovocitos propios y donados) entre ovocitos frescos frente al grupo de ovocitos vitrificados. En la revisión de Stoorgaard y cols (2016) se encontró una mayor incidencia de cesáreas en los embarazos tras DO respecto a los conseguidos tras TRA propios (OR 2.2) o respecto a embarazos naturales (OR 2.38). En la revisión de Pandey y cols (2012) se encontró una mayor incidencia de cesáreas en los embarazos tras TRA respecto a naturales (RR 1.56). La mayoría de estudios analizados no distinguen entre cesárea de urgencia y de elección, por lo que no se puede analizar esta cuestión por separado.

6.4.8 - RESULTADOS NEONATALES

En los resultados perinatales no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de embarazos con ovocitos frescos y vitrificados en la puntuación de Apgar.

Como es lógico, observamos un porcentaje más elevado de parto pretérmino y en consecuencia de ingreso en cuidados intensivos neonatales en el grupo de embarazos múltiples. No encontramos diferencias en los resultados globales entre el grupo de ovocitos frescos y vitrificados con respecto al bajo peso al nacer (27,8% *vs.* 27%) y muy bajo peso al nacer (2,5% *vs.* 2,3%). Obviamente, la incidencia de bajo peso era mayor en los embarazos múltiples con respecto a los únicos.

En el caso de los resultados neonatales no observamos diferencias significativas entre ambos grupos (frescos y vitrificados) salvo en el número de niñas nacidas que fue estadísticamente mayor en el grupo con ovocitos propios y vitrificados comparado con el grupo de ovocitos

propios frescos, aunque sorprendentemente esta diferencia no la encontramos en el grupo de los ovocitos donados. Este hecho hasta la fecha no ha sido publicado anteriormente en ningún estudio.

Existen pocos estudios que evalúen el efecto de la vitrificación de ovocitos en los recién nacidos. Como anteriormente hemos mencionado, está bien documentado que para algunos autores los niños nacidos tras TRA presentan un riesgo aumentado de complicaciones perinatales como bajo peso al nacimiento y defectos congénitos comparados con los niños nacidos de embarazos de concepción natural (Pinborg et al, 2013). En otra revisión bibliográfica (Fauser et al, 2014) los niños nacidos de FIV/ICSI tuvieron un peso al nacimiento más bajo, y durante la infancia y adolescencia aparecían con más grasa periférica, presión sanguínea y nivel más elevado de glucemia en ayunas.

Más recientemente ha sido publicado un estudio (De Munck et al, 2016) en el que se compara los resultados obstétricos y neonatales de un grupo de embarazos únicos comparados con embarazos gemelares, ambos grupos provenientes de ovocitos criopreservados en TRA de DO. La conclusión final fue que la técnica de vitrificación ovocitaria con pajuelas cerradas era totalmente segura. Sin embargo, en este estudio tampoco existió un grupo de control de ovocitos frescos y los resultados obtenidos fueron comparados con resultados ya existentes en la literatura. Como conclusión de este estudio podemos decir que una de las mayores limitaciones es el escaso número de casos estudiados y sobre todo que es un estudio descriptivo de un solo brazo, por tanto falta el grupo control con las mismas condiciones para poder comparar.

Como ya comentado anteriormente, nuestro estudio tiene a su favor que es uno de los pocos estudios realizados sobre vitrificación ovocitaria a dos brazos, es decir con un grupo control que tiene las mismas condiciones que el grupo de estudio.

En conclusión, podemos decir que nuestros datos sugieren que el proceso de vitrificación de los ovocitos no afecta y/o no provoca un incremento del riesgo de daños tanto a nivel obstétrico como perinatal. Aun así, estudios con una mayor casuística, o estudios que contengan un seguimiento más amplio a nivel pediátrico deben ser realizados para estar seguros de esta conclusión. En estos estudios se debería incluir una evaluación psicomotora del niño, evaluación del desarrollo tanto mental como físico y el estudio de la prevalencia de determinadas enfermedades, todo esto sería de gran ayuda para confirmar definitivamente la falta de consecuencias a largo plazo de la vitrificación de los ovocitos.

7

1.-Los embarazos tras vitrificación ovocitaria presentaron resultados obstétricos y perinatales similares a los conseguidos en embarazos obtenidos con ovocitos frescos. Esto aplica tanto a embarazos únicos como a múltiples, y tanto a embarazos obtenidos usando ovocitos donados o propios.

2 - No se ha podido evaluar en este estudio la patología de primer trimestre y los embarazos que fueron interrumpidos por anomalías fetales graves.

3 - Los datos de este estudio sugieren, con la mayor casuística aportada hasta la fecha, que la vitrificación ovocitaria no parece provocar ningún aumento del riesgo obstétrico ni perinatal. Aun así, se precisan estudios más amplios, abarcando desde primer trimestre, y con más tiempo de seguimiento para confirmar estos hallazgos.



8

AA. VV In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1990 results from the IVF-ET Registry. Medical Research International. Society for Assisted Reproductive Technology (SART), The American Fertility Society. Fertil Steril. 1992 Jan;57(1):15-24.

ABDALLA HI, LEONARD T. Cryopreserved zygote intrafallopian transfer for anonymous oocyte donation Lancet. 1988 Apr 9;1(8589):835.

AIMAN J, SMENTEK C. Premature ovarian failure. Obstet Gynecol. 1985 Jul;66(1):9-14.

AL-INANY H, ABOULGHAR MA, MANSOUR RT, SEROUR GI. Optimizing GnRH antagonist administration: meta-analysis of fixed versus flexible protocol. Reprod Biomed Online. 2005 May;10(5):567-70.

ANDERSEN AN, GOOSSEN V, GIANAROLI L, FELBERBAUM R, DE MOUZON J, NYGREN KG. Assisted Reproductive Technology in Europe, 2003. Results Generated from European Registers by ESHRE. Human Reproduction (Oxford, England), 20070430, Jun, 2007, vol. 22, no. 6, pp. 1513-1525. ISSN 0268-1161; 0268-1161.

ANGELL RR., TEMPLETON AA., AITKEN RJ. Chromosome studies in human IVF. Human. Genet. 1986; 72: 333-337.

ANTHONY S, BUITENDIJK SE, DORREPAAL CA, LINDNER K, BRAAT DD, DEN OUDEN AL. Congenital malformations in 4224 children conceived after IVF. Hum Reprod. 2002 Aug;17(8):2089-95.

BIBLIOGRAFÍA

ANTINORI M, LICATA E, DANI G, CERUSICO F, VERSACI C, ANTINORI S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007;14:72-9.

AUSTIN GE, COULAM CB, RYAN RJ .A search of antibodies to luteinizing hormone receptors in premature ovarian failure. *Mayo Clin. Proc.* 1979; 54: 394-397.

AXELROD L, NEER RM, KLIMAN B. Hypogonadism in a male with immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: an exception to a venerable rule. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1979; 48(2): 279-282.

BAKER JW, MORGAN RL, PECKHAM MJ, SMITHERS DW. "Preservation of ovarian function in patients requiring radiotherapy for para-aortic and pelvic Hodgkin's disease." *En Lancet.* 1972 Jun 17;1(7764):1307-8.

BALMACEDA JP, GASTALDI C, REMOHI J, BORRERO C, ORD T, ASCH RH. Tubal embryo transfer as a treatment for infertility due to male factor *Fertil Steril.* 1988 Sep;50(3):476-9.

BARRI PN. Perdida embrionaria precoz. En: *Diagnóstico prenatal.* Carrera JM y cols. Ed. Salvat, Barcelona. 1987; p:101

BATEMAN BG, NUNLEY WC JR, KITCHIN JD 3RD. Reversal of apparent premature ovarian failure in a patient with myasthenia gravis. *En Fertil Steril.* 1983 Jan;39(1):108-10.

BELLIS TH, WOHLGEMUTH B. The incidence of cleft lip and palate deformities in the south-east of Scotland (1971-1990). *Br J Orthod.* 1999 Jun;26(2):121-5.

BELLVER J, AYLLÓN Y, FERRANDO M, MELO M, GOYRI E, PELLICER A, REMOHÍ J, MESEGUER M. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(2):447-54. Epub 2009 Jan 26.

BELVA F, HENRIET S, VAN DEN ABBEEL E, CAMUS M, DEVROEY P, VAN DER ELST J, LIEBAERS I, HAENTJENS P, BONDUELLE M. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles. *Hum Reprod.* 2008 Oct;23(10):2227-38

BELVA F, BONDUELLE M, ROELANTS M, VERHEYEN G, VAN LANDUYT L. Neonatal health including congenital malformation risk of 1072 children born after vitrified embryo transfer. *Hum Reprod.* 2016 Jul; 31(7):1610-20.

BERAL V, DOYLE P, TAN SL, MASON BA, CAMPBELL S. Outcome of pregnancies resulting from assisted conception. *Br Med Bull.* 1990 Jul;46(3):753-68.

BIBLIOGRAFÍA

- BERGADA C. Disgenesias gonadales. En: Ginecología Infanto-Juvenil de Zeiguer BK. Editorial Medica Panamericana Buenos Aires. 1987; p: 31
- BERGH T, ERICSON A, HILLENSJO T, NYGREN KG, WENNERHOLM UB. Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study *Lancet*. 1999 Nov 6;354(9190):1579-85.
- BIGLIERI EG, HERRON MA, BRUST M. 17 -hidroxilación deficiency in man. *J. Clin. Invest.* 1966; 45: 1946-1949
- BIGLIERI EG. Mechanism establishing the mineralocorticoid hormone patterns in the 17 -alpha-hydroxylase deficiency syndrome. *J. Steroid. Biochem.* 1979; 13:809-812.
- BLOCK E. A quantitative morphological investigations of the follicular system in new born female infants. *ActaAnat.* 1953; 17:201-205.
- BLOCK E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Variations at different ages. *ActaAnat.* 1952; 14:108-111.
- BOGLIOLO L, MURRONE O, PICCININI M, ARIU F, LEDDA S, TILOCCA S, ALBERTINI DF. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Feb;32(2):185-93. doi: 10.1007/s10815-014-0389-7. Epub 2014 Nov 16.
- BONDUELLE M., LIEBAERS I, DEKETELAERE V, DERDE MP, CAMUS M, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM A. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod.* 2002 Mar; 17(3):671-94.
- BONILLA F. Ovarios rudimentarios. En: *Libra Homenaje al profesor Dr. Manuel Usandizaga Soraluce.* 1970.p: 13.
- BOURROUILLON G., DASTUGNE N., COLOMBIE SP. Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/mi. *Human. Genet.* 1985; 71:336-339.
- BUDAK, E., GARRIDO N, SOARES SR, MELO MA, MESEGUER M, PELLICER A REMOHI J. Improvements Achieved in an Oocyte Donation Program Over a 10-Year Period: Sequential Increase in Implantation and Pregnancy Rates and Decrease in High-Order Multiple Pregnancies. *Fertility and Sterility*, 2007; 88, no. 2, pp. 342-349. ISSN 1556-5653; 0015-0282.
- BUKULMEZ O. Does assisted reproductive technology cause birth defects? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009 Jun;21(3):260-4.

BIBLIOGRAFÍA

CABALLERO A. Clasificación de las enfermedades hereditarias. En: Retardo mental y minusvalías de causa obstétrica. Su prevención. Imprenta de la Comunidad de Madrid. 1991; p: 88-90.

CALHAZ-JORGE C, DE GEYTER C, KUPKA MS, DE MOUZON J, ERB K, MOCANU E, MOTRENKO T, SCARAVELLI G, WYNS C, GOOSSENS V. European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod. 2016 Aug; 31(8):1638-52.

CAMPO S, CAMPO V, BENAGIANO G. Adenomyosis and infertility. Reprod Biomed Online. 2012 Jan;24(1):35-46. Review.

CAO YX, XING Q, LI L, CONG L, ZHANG ZG, WEIZL, ZHOU P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. Fertil Steril. 2009 Oct; 92(4):1306-11.

CHAMAYOU S, BONAVENTURA G, ALECCI C, TIBULLO D, RAIMONDO F, GUGLIELMINO A, BARCELLONA ML. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content Cryobiology. 2011 Apr;62(2):130-4.

CHANDLER AC. The chromosomal basis of human infertility. Br. Med. Bull. 1979; 35: 181-184.

CHANG CC, SHAPIRO DB, BERNAL DP, WRIGHT G, KORT HI, NAGY ZP. Human oocyte vitrification: in-vivo and in-vitro maturation outcomes. Reprod Biomed Online 2008;17:684-8.

CHEN XK, WEN SW, BOTTOMLEY J, SMKITH GN, LEADER A, WALKER MC. In vitro fertilization is associated with an increased risk for preeclampsia. Hypertens Pregnancy. 2009 Feb; 28(1):1-12.

CHEN YT, MATTISON DR, FEIGENBAUM L, FUKUI H, SCHULMAN JD. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. Science. 1981 Dec 4; 214(4525):1145-7.

CHIAN RC, HUANG JY, TAN SL, LUCENA E, SAA A, ROJAS A, RUVALCABA CASTELLON LA, GARCIA AMADOR MI, MONTOYA SARMIENTO JE. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. Reprod Biomed Online 2008;16: 608-10.

BIBLIOGRAFÍA

CHIAN RC, SON WY, HUANG JY, CUISJ, BUCKETTA WM, TAN SL. High Survival Rates And Pregnancies Of Human Oocytes Following Vitrification: Preliminary Report. *Fertil Steril* 2005;84:Suppl. 1. S36.

COBO A.,GARCIA –VELASCO JA, COELLO A,DOMINGO J, PELLICER A, REMOHI J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril*. 2016 Mar; 105(3):755-64.e8.

COBO A, GARRIDO N, PELLICER A, REMOHI J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril*. 2015 Dec;104(6):1426-34.e1-8.

COBO A, DIAZ C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2011 Aug; 96(2):277-85.

COBO A., MESEGUER M, REMOHI J, PELLICER A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25: 2239-46.

COBO A., KUWAYAMA M, PERRES S, RUIZ A, PELLICER A, REMOHI J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008a;89:1657-64.

COBO A., PÉREZ S, DE LOS SANTOS M.J., ZULATEGUI J., DOMINGO J., REMOHI J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008b; 17 Vol. 3: 350-359

COHEN J. MAYAUX MJ, GUIHARD-MOSCATO ML. Pregnancy outcomes after in vitro fertilization. A collaborative study on 2342 pregnancies. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;541:1-6.

COTICCHIO G, BROMFIELD JJ, SCIAJNO R, GAMBARDELLA A. SCARAVELLI G, BORINI A, ALBERTINI DF. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009;19 Suppl 3:29- 34.

COULAM CB, RYAN RJ.. Premature menopause. I. Etiology *Am J Obstet Gynecol*. 1979 Mar 15;133(6):639-43.

COULAM CB. Editor's formulation: Classification and Treatment of Premature Gonadal Failure. *Semin. Reprod. Endocrinology* 1983;1:2 ; 177-180.

COULAM CB. Premature gonadal failure. *Fertil Steril*. 1982 Dec;38(6):645-55.

BIBLIOGRAFÍA

DANIEL HW. Smoking, obesity and the menopause. *Lancet*. 1978; 2: 373-377.

DAY RW, LARSON W, WRIGHT SW. Clinical and cytogenetic studies on a group of females with XXX sex chromosome complements. *J. Pediatr*. 1964; 64: 24-33.

DE BRUIN ML, VAN DULMEN-DEN BROEDER E, VAN DEN BERGH MH, LAMBALK CB. Fertility in female childhood cancer survivors. *Endocr Dev*. 2009;1 5:135-58. Epub 2009 Mar 3.

DE LANGE WE, WEEKE A, ARTZ W, JANSEN W, DOORENBOS H. Primary amenorrhea hypertension due to 17-hydroxylase deficiency. Therapy with dexamethasone and ethinyloestradiol. *Acta Med. Scand*. 1973; 193: 565-571.

DE MORAES RUESHEN M, BLIZZARD RM, GARCIA-BUNUEL R, JONES GS. Autoimmunity and ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol*. 1972 Mar;112(5):693-703.

DE MUNCK N, BELVA F, VAN DE VELDE H., VERHEYEN G., STOOP D. Closed oocyte vitrification and storage in an oocyte donation programme: obstetric and neonatal outcome. *Hum Reprod*. 2016 May; 31(5):1024-33.

DE NEUBOURG D, GERRIS J, MANGELSCHOTS K, VAN ROYEN E, VERCRUYSSSEN M, STEYLEMANS A, ELSEVIERS M. The obstetrical and neonatal outcome of babies born after single-embryo transfer in IVF/ICSI compares favourably to spontaneously conceived babies. *Hum Reprod*. 2006 Apr; 21(4):1041-6. Epub 2006 Jan 20.

DE SUTTER P, BONTINCK J, SCHUTYSERS V, VAN DER ELST J, GERRIS J, DHONT M. First-trimester bleeding and pregnancy outcome in singletons after assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2006 Jul; 21(7):1907-11. Epub 2006 Feb 24.

DEL MASTRO L, CEPPI M, POGGIO F, BIGHIN C, PECCATORI F, DEMEESTERE I, LEVAGGI A, GIRAUDI S, LAMBERTINI M, D'ALONZO A, CANEVES G, PRONZATO P, BRUZZI P. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev*. 2014 Jun;40(5):675-83. Epub 2013 Dec 8.

DEMEESTERE I, BRICE P, PECCATORI FA, KENTOS A, DUPUIS J, ZACHEE P, CASASNOVAS O, VAN DEN NESTE E, DECHENE J, DE MARTELAER V, BRON D. No Evidence for the Benefit of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist in Preserving Ovarian Function and Fertility in Lymphoma Survivors Treated With Chemotherapy:

BIBLIOGRAFÍA

Final Long-Term Report of a Prospective Randomized Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 1;34(22):2568-74. Epub 2016 May 23.

DIEDRICH U., HANSMANN I., JANKE D., OPITZ O, PROBECK HD. Chromosome anomalies in 136 couples with a history of recurrent abortions. *Human. Genetic*. 1983; 65: 48-52.

DOMINGUEZ F, CASTELLÓ D, REMOHI J, SIMON C, COBO A. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil Steril*. 2013 Feb; 99(2):565-72. Epub 2012 Oct 23.

DOYLE P, BERAL V, MACONOCHIE N. Preterm delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in liveborn singleton babies resulting from in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1992 Mar;7(3):425-8.

DRURY MI, KEELAN DM, TIMONEY FJ, IRVINE WJ. Juvenile familial endocrinopathy. *Clin. Exp. Immunol*. 1970; 7: 125-132.

EATON JL, ZHANG X, KAZER RR. First-trimester bleeding and twin pregnancy outcomes after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):140-3.

ESCOBAR ME, CIGORRAGA SB, CHIAUZZI VA, CHARREAU EH, RIVAROLA MA. Development of gonadotropin resistant ovary in myasthenia gravis: suggestion of similar autoimmune mechanism. *Acta Endocrinol*. 1982; 99: 431-436.

FANCHIN R, SALOMON L, CASTELO-BRANCO A, OLIVENNES F, FRYDMAN N, FRYDMAN R. Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum Reprod*. 2003 Dec;18(12):2698-703.

FARHI J., FISCH B. Risk of major congenital malformations associated with infertility and its treatment by extent of iatrogenic intervention. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2007 Jun;4(4):352-7.

FAUSER BC, DEVROEY P, DIEDRICH K, BALABAN B, BONDUELLE M, DELAMARRE-VAN DE WAAL HA, ESTELLA C, EZCURRA D, GERAEDTS JP, HOWLES CM, LERNE-GEVA L, SERNA J, WELLS D; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2011. Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online*. 2014 Feb;28(2):162-82.

FOLSOM LJ, FUQUA JS. Reproductive Issues in Women with Turner Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Dec;44(4):723-37. Epub 2015 Sep 3.

BIBLIOGRAFÍA

FORD CE, JONES KW, POLANI PE, DE ALMEIDA JC, BRIGGS JH. et al. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959; apr (4); 1(7075): 711-713.

GARCIA-VELASCO JA, DOMINGO J, COBO A, MARTÍNEZ M, CARMONA L, PELLICER A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril.* 2013 Jun; 99 (7) :1994-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.02.004. Epub 2013 Mar 1.

GARCIA JI, NORIEGA-PORTELLA L, NORIEGA-HOCES L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod.* 2011 Apr;26(4):782-90.

GAUDET R, MERVIEL P, BERKANE N, SCHOUPPE S, COCHETON JJ, UZAN S. Fetal impact of cholestasis of pregnancy: experience at Tenon Hospital and literature review. *Fetal Diagn Ther.* 2000 Jul-Aug;15(4):191-7.

GENTILINI D. Genome-wide epigenetic evaluation of cord blood from in vitro-conceived babies. O -197 VOLUME 30, SUPP 1 2015 ABSTRACT BOOK ESHRE 2015 – LISBON, PORTUGAL – 14-17 JUNE 2015

GHELTER Y, YAVIN S, SHALGI R, ARAV A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod.* 2005 Dec;20(12):3385-9. Epub 2005 Jul 29.

GILSTRAP LC, LEVENO KJ, CUNNINGHAM FG, WHALLEY PJ, ROARK ML. Renal infection and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1981 Nov 15;141(6):709-16.

GINDOFF PR, JEWELWICZ R. Reproductive potential in the older woman. *Fertil Steril.* 1986 Dec;46(6):989-1001.

GINDOFF PR, JEWELWICZ R. Reproductive potential in the older woman. *Fertil Steril.* 1986 Dec;46(6):989-1001.

GLUJOVSKY D, Riestra B, SUELDO C, FISZBAJN G, REPPING S, NODAR F, PAPIER S, CIAPPONI A. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Sep 5;(9) CD010047. doi: 10.1002/14651858.CD010047.pub2.

GOLDMAN KN, NOYES NL, KNOPMAN JM, McCAFFREY C, GRIFO JA. Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a

BIBLIOGRAFÍA

per-oocyte basis? *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):712-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.040. Epub 2013 May 28.

GOLDSMITH O, SOLOMON DH, HORTON R. Hypogonadism and mineralocorticoid excess. The 17-hydroxylase deficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1967 Sep 28;277(13):673-7.

GOLONKA JE, GOODMAN AD. Coexistence of primary ovarian insufficiency, primary adrenocortical insufficiency and idiopathic hypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1968; 28: 79-84.

GOOK DA, EDGAR DH Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update* 2007;13:591-605.

GORDON DL, PAULSEN CA. Premature menopause in XO/XX/XXXIXXXX mosaicism. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1967; 97: 85-90.

GRIESINGER G, VENETIS CA, MARX T, DIEDRICH K, TARLATZIS BC, KOLIBIANAKIS EM. Oral contraceptive pill pretreatment in ovarian stimulation with GnRH antagonists for IVF: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008 Oct;90(4):1055-63. Epub 2007 Dec 3.

GRIFO JA, NOYES N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril* 2010 Feb;93(2):391-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.067. Epub 2009 May 12.

GULYAS BJ, HODGEN GD, TULLNER WW. "Effects of fetal or maternal hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with particular emphasis on oogenesis." *Biol. Reprod*. 1981; 16: 216-219.

GULYAS BJ, HODGEN GD, TULLNER WW, ROSS GT. Effects of fetal or maternal hypophysectomy on endocrine organs and body weight in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with particular emphasis on oogenesis. *Biol Reprod*. 1977 Mar;16(2):216-27.

GUNDOGAN F, BIANCHI DW, SCHERJON SA, ROBERTS DJ. Placental pathology in egg donor pregnancies *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(2):397-404. Epub 2009 Feb 26.

HAGENFELDT K, VON DOLBEN U, HAGENFELDT L. Gonadal failure in young women and galactose-1-phosphate uridylyl transferase activity. *Fertil Steril*. 1989 Jan;51(1):177-8.

HAMMADIEH, N., COOMARASAMY A, OLAB, PAPAIOANNOU S, AFNAN M, SHARIF K. . Ultrasound-Guided Hydrosalpinx Aspiration during Oocyte Collection Improves Pregnancy Outcome in IVF: A Randomized Controlled Trial. *Hum. Reprod*. 2008

BIBLIOGRAFÍA

May;23(5):1113-7.

HARPER PS., DYKEN PR. Early onset dystrophia myotonica. *Lancet*. 1972; 2: 53-59.

HELLER RH, JONES HW Jr. "Production of ovarian dysgenesis in the rat and human by busulphan" *Am J Obstet Gynecol*. 1964 Jun 1;89:414-20.

HELMERHORST FM, PERQUIN DA, DONKER D, KEIRSE MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2004 Jan 31;328(7434):261. Epub 2004 Jan 23.

HENDRICKSON MR., KEMPSON LR. The approach to endometrial diagnosis. En: *Surgical Pathology of the Uterine Corpus*. Ed: Saunders Company. Philadelphia. USA. 1980; p: 99.

HENNINGSSEN AK, PINBORG A. Birth and perinatal outcomes and complications for babies conceived following ART. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014 Aug;19(4):234-8. Epub 2014 May 17.

HOEFNAGEL D, WURSTER-HILL D, CHILD EL. Ovarian failure in galactosemia. *Lancet* 1979; Dec 1;2(8153):1197.

HU XL, FENG C, LIN XH, ZHONG ZX, ZHU YM, LV PP, LV M, MENG Y, ZHANG D, LU XE, JIN F, SHENG JZ, XU J, HUANG HF. High maternal serum estradiol environment in the first trimester is associated with the increased risk of small-for-gestational-age birth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jun;99(6):2217-24. Epub 2014 Feb 28.

HUMAIDAN P, BREDKJAER HE, BUNGUM L, BUNGUM M, GRONDAHL ML, WESTERGAARD L, LANDERSEN CY. GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2005 May;20(5):1213-20. Epub 2005 Mar 10.

HUYNH J, YAMADA J, BEAUHARNAIS C, WENGER JB, THADHANI RI, WEXLER D, ROBERTS DJ, BENTLEY-LEWIS R. Type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus differentially impact placental pathologic characteristics of uteroplacental malperfusion. *Placenta*. 2015 Oct;36(10):1161-6. Epub 2015 Aug 12.

ISHIHARA O, ARAKI R, KUWAHARA A, ITAKURA A, SAITO H, ADAMSON GD. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):128-33. Epub 2013 Oct 23.

JACKSON RA, GIBSON KA, WU YW, CROUGHAN MS. Perinatal outcomes in singletons

BIBLIOGRAFÍA

following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2004 Mar;103(3):551-63.

JICK H, PORTER J. Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. *Lancet.* 1977 Jun 25;1(8026):1354-5.

JONES EC, KROHN PL. The relationship between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *J. Endocrinol.* 1961; 21: 469-473.

JONES GS, DE MORAES –RUEHSEN M. A new syndrome of amenorrhoea in association with hypergonadotropism and apparently normal ovarian follicular apparatus. *Am J Obstet Gynecol.* 1969 Jun 15;104(4):597-600.

KASER DJ, MELAMED A, BORMANN CL, MYERS DE, MISSMER SA, WALSH BW, RACOWSKY C, CARUSI DA. Cryopreserved embryo transfer is an independent risk factor for placenta accreta. *Fertil Steril.* 2015 May;103(5):1176-84.e2. Epub 2015 Mar 4.

KATAYAMA KP, STEHLIK J, KUWAYAMA M, KATO O, STEHLIK E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80(1) :223-4.

KAUFMAN F, KOGUT MD, DONNEL GN, KOCH H, GOEBELSMANN U. Ovarian failure in galactosemia. *Lancet* 1979; Oct 6;2(8145):737-8.

KAZEMIER BM, KONINGSTEIN FN, SCHNEEBERGER C, OTTA, BOSSUYT PM, DE MIRANDA E, VOGELVANG TE, VERHOEVEN CJ, LANGENVELD J, WOISKI M, OUDIJK MA, VAN DER VEN JE, VLEGLES MT, KUIPER PN, FEIERTAG N, PAJKRT E, DE GROOT CJ, MOL BW, GEERLINGS SE. Maternal and neonatal consequences of treated and untreated asymptomatic bacteriuria in pregnancy: a prospective cohort study with an embedded randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2015 Nov;15(11):1324-33. Epub 2015 Aug 5.

KHALILI MA, MAIONE M, PALMERINI MG, BIANCHI S, MACCHIARELLI G, NOTTOLA SA. Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *Eur J Histochem.* 2012 Aug 10;56(3):e38.

KISHK EA, MOHAMMED ALI MH. "Effect of a gonadotropin-releasing hormone analogue on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in adult mice. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 May; 287(5):1023-9. Epub 2012 Dec 7.

KLEEREKOPER M, BASTEN A, PENNY R, POSEN S. Idiopathic hypoparathyroidism with primary ovarian failure. Report of a case with detailed immunological studies. *Arch.*

Intern Med. 1974;134: 944-948.

KOLIBIANAKIS EM., COLLINS J, TARLATZIS BC, DEVROEY P, DRIEDRICH K, GRIESINGER G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2006 Nov-Dec;12(6):651-71. Epub 2006 Aug 18.

KOYAMA H, WADA T, NISHIZAWA Y, IWANAGA T, AOKI Y. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. Cancer. 1977 Apr;39(4):1403-9.

KUWAYAMA M, VAJTA G, KATO O, LEIBO SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005;11:300-8.

KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology 2007;67: 73-80.

LANCASTER PA, Registers of in-vitro fertilization and assisted conception Hum Reprod. 1996 Dec;11 Suppl 4:89-104; discussion 105-9.

LANCASTER PA. Congenital malformations after in-vitro fertilisation. Lancet. 1987 Dec 12;2(8572):1392-3.

LEVI SETTI PE, MOIOLI M, SMERALDI A, CESARATTO E, MENDUNI F, LIVIO S, MORENGHI E, PATRIZIO P. Obstetric outcome and incidence of congenital anomalies in 2351 IVF/ICSI babies. J Assist Reprod Genet 2016; 33:711-717. Epub 2016 Apr 26.

LIE RT, LYGSTADAAS A, ØRSTAVIK KH, BAKKETEIG LS, JACOBSEN G, TANBO T. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. Int J Epidemiol. 2005 Jun;34(3):696-701. Epub 2004 Nov 23.

LIEBERMANN J, NAWROTH F, ISACHENKO V, ISACHENKO E, RAHIMI G, TUCKER MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. Biol Reprod. 2002 Dec; 67(6):1671-80.

LIU SY, TENG B, FU J, LI X, ZHENG Y, SUN XX. Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos. Hum Reprod. 2013 Aug;28(8):2093-100. Epub 2013 Apr 7.

LOBO RA. Early ovarian ageing: a hypothesis. What is early ovarian ageing? Hum Reprod 2003; Sep; 18(9):1762-4.

BIBLIOGRAFÍA

- LUCENA E, BERNAL DP, LUCENA C, ROJAS A, MORAN A, LUCENA A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; Jan 85(1):108-11.
- LUCKY AW, REBAR RW, BIZZARD RM, GOREN EM. Pubertal progression in the presence of elevated serum gonadotropins in girls with multiple endocrine deficiencies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1977 Oct;45(4):673-8.
- LUKOVNIK M, TUL N, VERDENIK I, BLICKSTEIN I. Perinatal outcomes in singleton and twin pregnancies following first-trimester bleeding. *J Perinatol*. 2014 Sep;34(9):673-6. Epub 2014 May 1.
- MAHESHWARI A, BHATTACHARIYA S. Elective frozen replacement cycles for all: ready for prime time? *Hum Reprod*. 2013 Jan;28(1):6-9. Epub 2012 Nov 11.
- MAHESHWARI A, PANDEY S, SHETTY A, HAMILTON M, BHATTACHARIYA S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012 Aug;98(2):368-77.e1-9. Epub 2012 Jun 13.
- MAHESHWARI A., KALAMPOKAS T, DAVIDSON J, BHATTACHARIYA S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013 Dec;100(6):1615-21.e1-10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.044. Epub 2013 Sep 29. munc
- MAHESHWARI, A, GURUNATH S, FATIMA F, BHATTACHARYA S. Adenomyosis and Subfertility: A Systematic Review of Prevalence, Diagnosis, Treatment and Fertility Outcomes. *Hum Reprod Update*. 2012 Jul;18(4):374-92. Epub 2012 Mar 22.
- MALLIN SR. Congenital adrenal hyperplasia secondary to 17 -hydroxylase deficiency. Two sisters with amenorrhea, hypokaliemia, hypertension and cystic ovaries. *Ann. Int. Med*. 1969; 70: 69-74.
- MANIPALVIRATN S, DECHERNEY A, SEGARS J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):305-15.
- MARTINEZ-VAREA A, PELLICER B, PERALES-MARTIN A, PELLICER A. Relationship between maternal immunological response during pregnancy and onset of preeclampsia. *J Immunol Res*. 2014;2014:210241. doi: 10.1155/2014/210241. Epub 2014 Jun 2.
- MASOUDIAN P, NASR A, DE NANASSY J, FUNG-KEE-FUNG K, BAINBRIDGE SA, EL DEMELLAWY D. Oocyte donation pregnancies and the risk of preeclampsia or

BIBLIOGRAFÍA

gestational hypertension: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Mar;214(3):328-39. Epub 2015 Nov 25.

MATORRAS, R. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad. ADALIAFARMA, S. L. ed., Madrid: 2007. Embarazo Múltiple, pp. 395-400.

MATTISON DR, EVANS MI, SCHWIMMER WB, WHITE BJ, JENSEN B, SCHULMAN JD. Familial premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.* 1984; Nov;36(6): 1341-1346.

MAXON WS, WENTZ AC. The gonadotropin-resistant ovary syndrome. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 1983; 1:147-153.

MAXSON R, COHN R, KEDES L, MOHUN T. 1983. Expression and organization of histone genes. *Annu Rev Genet.* 17:239-277.

MCDONALD SD, HAN Z, MULLA S, OHLSSON A, BEYENE J, MURPHY KE; Knowledge Synthesis Group. Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization twins: a systematic review and meta-analyses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Feb; 148(2):105-13.

MCDONALD SD, MURPHY K, BEYENE J, OHLSSON A. Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can.* 2005 May; 27(5):449-59.

MCGOVERN PG, LLORENS AJ, SKURNICK JH, WEISS G, GOLDSMITH LT. Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization-embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2004 Dec;82(6):1514-20.

MCNATTY KP, SHORT RV, BARNES EW, IRVINE WJ. The cytotoxic effect of serum from patients with Addison's disease and autoimmune ovarian failure on human granulosa cells in culture. *En Clin Exp Immunol.* 1975 Dec; 22(3):378-84.

MELO M, BUSSO CE, BELLVER J, ALAMA' P, GARRIDO N, MESEGUER M, PELLICER A, REMOHI J. GnRH agonist versus recombinant HCG in an oocyte donation programme: a randomized, prospective, controlled, assessor-blind study. *Reprod Biomed Online.* 2009 Oct;19(4):486-92.

MICHELS VM, MEDRANO C., VERNE VL., RICCARADI VM. Chromosome translocations in couples with multiple spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet.* 1982; 34: 507-511.

BIBLIOGRAFÍA

- MILLER JF. The thymus. Yesterday, today, and tomorrow *Lancet*. 1967 Dec 16;2(7529):1299-302.
- MOFFET-KING A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):656-63.
- MORRISON JC, GIVENS JR, WISER WL, FISH SA. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril*. 1975 Jul;26(7):655-9.
- MUSHAYANDEBVU TI, GOLDSMITH LT, VON HAGEN S, SANTORO N, THURSTON D, WEISS G. Elevated maternal serum relaxin concentrations throughout pregnancy in singleton gestations after superovulation. *Obstet Gynecol*. 1998 Jul;92(1):17-20.
- MUTLU MF, ASLAN K, GULER I, MUTLU I, ERDEM M, BOZKURT N, ERDEM A. Two cases of first onset intrahepatic cholestasis of pregnancy associated with moderate ovarian hyperstimulation syndrome after IVF treatment and review of the literature. *J Obstet Gynaecol*. 2017 Mar 20:1-3. [Epub ahead of print]
- NAGY ZP, ANDERSON RE, FEINBERG EC, HAYWARD B, MAHONY MC. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017 Feb 7;15(1):10.
- NAGY ZP, CHANG CC, SHAPIRO DB, BERNAL DP, ELSNER CW, MITCHELL-LEEF D, TOLEDO AA, KORT HI. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertil Steril* 2008.
- NAVARRO J., BENET J., GARCIA M. Citogenetica de la infertilidad y la esterilidad. *Medicine. Tratado de medicina interna*. 1987; 100:55-62.
- NERI QV, TAKEUCHI T, PALERMO GD. An update of assisted reproductive technologies results in the United States. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1127:41-8.
- NOHALES-CORCOLES M, SEVILLANO-ALMERICH G, DI EMIDIO G, TATONE C, COBO AC, DUMOLLARD R, DE LOS SANTOS MOLINA M. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Hum Reprod*. 2016 Aug;31(8):1850-8. Epub 2016 May 31.
- NOYES N, PORCU E, BORINI A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 2009;18: 769-76.
- OKTAY K, CIL AP, VEECK L, BANG H. Comparative Efficiency of IVF Between Frozen-thawed and Fresh Oocytes: A Meta-analysis. *Fertil Steril* 2005; 84:Suppl.1 September. O 89
- OKTAY K., CIL AP, BANG H. Efficiency of oocyte criopreservation: a meta-analysis *Fertil Steril* 2006 Jul;86(1):70-80.

BIBLIOGRAFÍA

OLIVENNES F. Do children born after assisted reproductive technology have a higher incidence of birth defects? *Fertil Steril*. 2005 Nov; 84(5):1325-6; discussion 1327.

OLIVENNES F., CUNHA-FILHO JS, FANCHIN R, BOUCHARD P, FRYDMAN R. The use of GnRH Antagonists in Ovarian Stimulation. *Human Reprod Update*, 2002 May-Jun; 8(3):279-90.

OLIVENNES F., RUFAT P, ANDRE' B, POURADE A, QUIROS MC, FRYDMAN R. The increased risk of complication observed in singleton pregnancies resulting from in-vitro fertilization (IVF) does not seem to be related to the IVF method itself. *Hum Reprod*. 1993 Aug; 8(8):1297-300

OLSON CK, KEPPLER-NOREUIL KM, ROMITTI PA, BUDELIER WT, RYAN G, SPARKS AE, VAN VOORHIS BJ. In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects. *Fertil Steril*. 2005 Nov; 84(5):1308-15.

OMBELET W, MARTENS G, DE SUTTER P, GERRIS J, BOSMANS E, RUYSSINCK G, DEFOORT P, MOLENBERGHS G, GYSELAERS W. Perinatal outcome of 12,021 singleton and 3108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: a cohort study. *Hum Reprod*. 2006 Apr; 21(4):1025-32. Epub 2005 Dec 8.

OPTIZ O, ZOLL B, HANSMANN I, HINNEY B. Cytogenetics studies of 103 patients with primary or secondary amenorrhea. *Human. Genet*. 1983; 65 (1): 46-7.

PALERMO GD, NERI QV, TAKEUCHI T, SQUIRES J, MOY F, ROSENWAKS Z. Genetic and epigenetic characteristics of ICSI children. *Reprod Biomed Online*. 2008 Dec; 17(6):820-33.

PALOMBA S, SANTAGNI S., GIBBINS K., LA SALA GB., SILVER RM. Pregnancy complications in spontaneous and assisted conceptions of women with infertility and subfertility factors. A comprehensive review. *Reprod Biomed Online*. 2016 Nov; 33(5):612-628. Epub 2016 Aug 20.

PANDEY S, SHETTY A, HALMITON M, BHATTACHARYA S, MAHESHWARI A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012 Sep-Oct; 18(5):485-503.

PARK IJ, BURNETT LS, JONES HW, Jr, MIGEON CJ, BLIZZARD RM. A case of male pseudhermaphroditism associated with elevated LH, normal FSH and low testosterone possibly due to the secretion of an abnormal LH molecule. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1976 Sep; 83(1):173-81.

PARMEGIANI L, COGNINI GE, BERNARDI S, CUOMO S, CIAMPAGLIA

BIBLIOGRAFÍA

- W,INFANTE FE, TABARELLI DE FATIS C, ARNONE A,MACCARINI AM, FILICORI M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2011 Oct;23(4):505-12. Epub 2011 Jul 13.
- PECKS U, MAASS N, NEULEN J.Oocyte donation: a risk factor for pregnancy-induced hypertension: a meta-analysis and case series. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Jan;108(3):23-31.
- PELKONEN S, HARTIKAINEN AL, RITVANEN A, KOIVUNEN R, MARTIKAINEN H, GISSLER M, TIITINEN A. Major congenital anomalies in children born after frozen embryo transfer: a cohort study 1995-2006. *Hum Reprod*. 2014 Jul; 29(7):1552-7. Epub 2014 May 7.
- PELKONEN S, KOIVUNEN R, GISSLER M, NUOJUA-HUTTUNEN S, SUIKKARI AM, HYDEN-GRANSKOG C, MARTIKAINEN H, TIITINEN A, HARTIKAINEN AL. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995-2006. *Hum Reprod*. 2010 Apr;25(4):914-23. Epub 2010 Feb 2.
- PEZESHKI K, FELDMANI J, STEIN DE, LOBEL SM, GRAZI RV. Bleeding and spontaneous abortion after therapy for infertility. *Fertil Steril*. 2000 Sep; 74(3):504-8.
- PIERPLAOLI W, BESEDOVSKY HO. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions.*Clin Exp Immunol*. 1975 May; 20(2):323-38.
- PINBORG A, WENNERHOLM UB, ROMUNDSTAD LB, LOFT A, AITTOMAKI K, SODERSTROM-ANTTILA V, NYGREN KG, HAZEKAMP J, BERGH C. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013 Mar-Apr; 19(2):87-104. Epub 2012 Nov 14.
- PINBORG A,HENNINGSSEN AK, MALCHAU SS, LOFT A. Congenital anomalies after assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2013 Feb; 99(2):327-32. Epub 2013 Jan 3.
- QIN J, LIU X, SHENG X, WANG H, GAO S. Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):73-85.e1-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.007. Epub 2015 Oct 9.
- QIN J, SHENG X, WU D, GAO S, YOU Y, YANG T, WANG H. Adverse Obstetric Outcomes Associated With In Vitro Fertilization in Singleton Pregnancies: A Prospective Cohort Study. *Reprod Sci*. 2017 Apr;24(4):595-608. Epub 2016 Sep 27.
- QUAAS A, DOKRAS A.Diagnosis and treatment of unexplained infertility .*Rev Obstet Gynecol*. 2008 Spring;1(2):69-76.

BIBLIOGRAFÍA

- REBAR RW, MIYAKE A, LOW TL, GOLDSTEIN AL. Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor *Science*. 1981 Nov 6;214(4521):669-71.
- REBAR RW, MORANDINI IC, BENIRSCHKE K,PETZE JE. Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation.*Endocrinology*. 1980 Dec;107(6):2130-2.
- REBAR RW, SILVA DE SA MF. The reproductive age: premature ovarian failure. En: G Serra (ed) *Comprehensive Endocrinology. The Ovary*, Chapter 13. New York, Raven Press. 1983; D: 241.
- REMOHÍ J, BELLVER J,MATORRAS R,BALLESTEROS A, PELLICER A. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana- Aspectos clínicos*. 4º edición
- REMOHI, J., GARTNER B, GALLARDO E, YALIL S, SIMON C, PELLICER A. Pregnancy and Birth Rates After Oocyte Donation. *Fertil Steril*. 1997 Apr;67(4):717-23.
- REUBINOFF BE, SAMUELOFF A, BEN-HAIM M, FRIEDLER S, SCHENKER JG, LEWIN A. Is the obstetric outcome of in vitro fertilized singleton gestations different from natural ones? A controlled study. *Fertil Steril*. 1997 Jun;67(6):1077-83.
- REYES FL ,KOH KS, FAIMAN C. Fertility in woman with gonadal dysgenesis. *Am J Obstet Gynecol*. 1976 Nov 15;126(6):668-70.
- RIENZI L,GRACIA C, MAGGIULLI R, LABARBERA AR, KASER DJ, UBALDI FM, VANDERPOEL S, RACOWSKY C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017 Mar 1;23(2):139-155
- RIENZI L, ROMANO S,ALBRICCI L, MAGGIULLI R, CAPALBO A, BARONI E, COLAMARIA S, SAPIENZA F, UBALDI F. Embryo development of fresh ‘versus’ vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010.
- RIMM AA, KATAYAMA AC, DIAZ M, KATAYAMA KP. A meta-analysis of the impact of IVF and ICSI on major malformations after adjusting for the effect of subfertility. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Aug;28(8):699-705. doi: 10.1007/s10815-011-9583-z. Epub 2011 May 31.
- ROMUNDSTAD LB, ROMUNDSTAD PR, SUNDE A, VON DURING V, SKJAERVEN R, VATTEN LJ. Increased risk of placenta previa in pregnancies following IVF/ICSI; a comparison of ART and non-ART pregnancies in the same mother. *Hum Reprod*. 2006 Sep; 21(9):2353-8.

BIBLIOGRAFÍA

ROYSTER GD^{4th}, KRISHNAMOORTHY K, CSOKMAY JM, YAUNGER BJ, CHASON RJ, DECHERNEY AH, WOLFF EF, HILL MJ. Are intracytoplasmic sperm injection and high serum estradiol compounding risk factors for adverse obstetric outcomes in assisted reproductive technology? *Fertil Steril*. 2016 Aug;106(2):363-370.e3. Epub 2016 May 10.

SALZER L, TENENBAUM-GAVISH K, HOD M. Metabolic disorder of pregnancy (understanding pathophysiology of diabetes and preeclampsia). *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015 Apr;29(3):328-38. Epub 2014 Oct 16.

SANCHIS CALVO A, MARCO PUIG B, JUAN GARCIA L, MORALES SUÁREZ-VARELA MM, ABELEDO GOMEZ A, BALANZÁ MACHANCOSA R, PINEDA CAPLLIURE A, TAMARIT BORDES G, GIMENO CLEMENTE N, CERVERÓ MARTI L.[Birth characteristics due to in vitro fertilization (IVF) techniques]. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Apr; 70(4):333-9. Epub 2009 Mar 17.

SAVASI VM, MANDIA L, LAORETI A, CETIN I. Maternal and fetal outcomes in oocyte donation pregnancies. *Hum Reprod Update*. 2016 Sep;22(5):620-33.Epub 2016 Jun 7.

SCARAVELLI G, VIGILIANO V, MAYORGA JM, BOLLIS,DE LUCA R, D'ALOJA P. Analysis of oocyte cryopreservation in assisted reproduction: the Italian National Register data from 2005 to 2007. *Reprod Biomed Online*. 2010 Oct;21(4):496-500. Epub 2010 May 24.

SEBASTIANI G,PERTIERRA CORTADA A, VIDAL SORDÉ E, FIGUEREA ALOY J, BALASCH CORTINA J [Factors associated with assisted reproduction technologies and neonatal outcomes]. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Apr;70(4):323-32.

SELMAN H, ANGELINI A, BARNOCCHI N, BRUSCO GF, PACCHIAROTTI ARAGONA C. Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril* 2006; 86:997-1000.

SINGH RP, CARR DH. The anatomy and hystology of XO human embryos and featuses. *Anat. Rec*. 1966; 155:369-374.

SIRIS ES, LEVENTHAL BG, VAITUKAITIS JL. Effects of childhood leukemia and chemotherapy on puberty and reproductive function in girls. *N Engl J Med*. 1976 May 20; 294(21):1143-6.

SMITH GD, SERAFINI PC, FIORAVANTI J, YADID I, COSLOVKY M, HASSUN P. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril*, 94 (2010), pp. 2088–2095

SMULDERS B, VAN OIRSCHOT SM, FARQUHAR C, ROMBATUS L, KREMER JAO^{ral}

BIBLIOGRAFÍA

contraceptive pill, progestogen or estrogen pre-treatment for ovarian stimulation protocols for women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jan 20;(1) :CD006109. doi: 10.1002/14651858.CD006109.pub2

SOARES SR, VELASCO JA, FERNANDEZ M, BOSCH E, REMOHÍ J, PELLICER A, SIMÓN C. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil Steril.* 2008 Mar;89(3):491-501..

SPEROFF L, FRITZ M. *Endocrinología Ginecológica Clínica y Esterilidad.* España: LWWEspaña, 2006.

STARUP J, SELE V. Premature ovarian failure. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1973; 52: 259-262.

STOOP D, BAUMGARTEN M, HAENTJENS P, POLYZOS NP, DE VOS M, VERHEYEN G, CAMUS M, DEVROEY P. Obstetric outcome in donor oocyte pregnancies: a matched-pair analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012 Jun 6; 10:42.

STORGAARD M, LOFT A, BERGH C, WENNERHOLM UB, SODERMSTROM-ANTTILA V, ROMUNDSTAD LB, AITTOMAKI K, OLDEREID N, FORMAN J, PINBORG A. Obstetric and neonatal complications in pregnancies conceived after oocyte donation: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2017 Mar;124(4):561-572. Epub 2016 Sep 5.

SULLIVAN EA, WANG YA, HAYWARD I, CHAMBERS GM, ILLINGWORTH P, MCBAIN J, NORMAN RJ. Single embryo transfer reduces the risk of perinatal mortality, a population study *Hum Reprod.* 2012 Dec; 27(12):3609-15. Epub 2012 Sep 17.

SUNKARA SK, LA MARCA A, POLYZOS NP, SEED PT, KHALAF Y. Live birth and perinatal outcomes following stimulated and unstimulated IVF: analysis of over two decades of a nationwide data. *Hum Reprod.* 2016 Oct;31(10):2261-7. Epub 2016 Sep 2.

SUNKARA SK, LA MARCA A, SEED PT, KHALAF Y. Increased risk of preterm birth and low birthweight with very high number of oocytes following IVF: an analysis of 65 868 singleton live birth outcomes. *Hum Reprod.* 2015 Jun; 30(6):1473-80. Epub 2015 Apr 16.

TAN SL, ROYSTON P, CAMPBELL S, JACOBS HS, BETTS J, MASON B, EDWARDS RG. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet.* 1992 Jun 6;339(8806):1390-4.

TARIN JJ., GOMEZ E., SAMPAIO M., RUIZ M., REMOHI J., PELLICER A. Cytogenetic analysis of human oocytes from fertile women. *Hum. Reprod.* 1991; 6: 1100-1104.

BIBLIOGRAFÍA

- THATCHER SS, JACKSON EM. Pregnancy outcome in infertile patients with polycystic ovary syndrome who were treated with metformin. *Fertil Steril*. 2006 Apr; 85(4):1002-9.
- THOMSON F, SHANBHAG S., TEMPLETON A.,BHATTACHARYA S. Obstetric outcome in women with subfertility. *BJOG*. 2005 May; 112(5):632-7.
- THOUAS GA, TROUSON AO, WOLVETANG EJ, JONES GM. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol Reprod*. 2004 Dec; 71(6):1936-42. Epub 2004 Jul 30.
- TIEPOLO L., ZUFFARDI O., FRACCARO MJ., GIAROLA A. Chromosome abnormalities and male infertility. En: Frajese G. et al. ed. *Oligozoospermia: Recent progres in andrology*. New York, Raven Press. 1981. D: 233.
- TROKOUDES KM, PAVLIDES C,ZHANG X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program *Fertil Steril*. 2011 May; 95(6):1996-2000. Epub 2011 Mar 15.
- TROUSON A, LEETON J, BESANKO M, WOOD, C, CONTI A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilised in vitro.*Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983 Mar 12;286(6368):835-8.
- VALENZUELA-ALCARAZ B, CRISPIS F, MANAU D, CRUZ-LEMINI M, BORRAS A, BALASCH J, GRATACOS E. Differential effect of mode of conception and infertility treatment on fetal growth and prematurity *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016 Dec;29(23):3879-84.. Epub 2016 Mar 3.
- VAN DER HOORN ML, LASHLEY EE, BIANCHI DW, CLAAS FH, SCHONKEREN CM, SCERJON SA. Clinical and immunologic aspects of egg donation pregnancies: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010 Nov-Dec; 16(6):704-12. Epub 2010 Jun 12.
- VAN HEESCH MM, EVERS JL, DUMOULIN JC, VAN DER HOEVEN MA, VAN BEIJSTERVELDT CE, BONSEL GJ, DYKGRAAF RH,VAN GOUDOEVER JB, KOOPMAN-ESSEBOOM C, NELEN WL, STEINER K, TAMMINGA P,TONCH N, VAN ZONNEVELD P, DIRKSEN CD. A comparison of perinatal outcomes in singletons and multiples born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection stratified for neonatal risk criteria. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2014 Mar; 93(3):277-86.
- VEIGA A., CALDERON G., SANTALO J., BARRI PN., EGORZCUE J.Chromosomal studies in oocytes and zygotes from an IVF program.*Hum. Reprod*. 1987; 2: 425-429.
- VILLANUEVA AL, REBAR RW. The triple X syndrome and premature ovarian failure.

Obstet. Gynecol. 1983; 62: 705-709.

WEISS JL, MALONE FD, VIDAVER J, BALL RH, NYBERG DA, COMSTOCK CH, HANKINS GD, BERKOWITZ RL, GROSS SJ, DUGOFF L, TIMOR-TRITSCH IE, D'ALTON ME; FASTER Consortium. Threatened abortion: A risk factor for poor pregnancy outcome, a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar; 190(3):745-50.

WEN J, JIANG J, DING C, DAIJ, LIU Y, XIA Y, LIU J, HU Z. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012 Jun; 97(6):1331-7. e1-4. Epub 2012 Apr 3.

WENNERHOLM UB, ALBERTSSON-WIKLAND K, BERGH C, HAMBERG L, NIKLASSON A, NILSSON L, THRINGER K, WENNERGREN M, WIKLAND M, BORRES MP. Postnatal growth and health in children born after cryopreservation as embryos. *Lancet.* 1998 Apr 11; 351(9109):1085-90.

WIKSTROM SHEMER E, MARSCHALL HU, LUDVIGSSON JF, STEPHANSSON O. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and associated adverse pregnancy and fetal outcomes: a 12-year population-based cohort study. *BJOG.* 2013 May; 120(6):717-23. Epub 2013 Feb 19.

WILKINS L, FLEISCHMANN W. Ovarian agenesis: pathology associated clinical symptoms and bearing on theories on sex differentiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1944; 4: 357-361.

XIANG L, WEI Z, WU J, ZHOU P, XIANG H, CAO Y. Clinical significance of first-trimester intrauterine haematomas detected in pregnancies achieved by IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2014 Oct; 29(4):445-51. Epub 2014 Jul 11.

YAP JK, DAVIES M. Fertility preservation in female cancer survivors. *J Obstet Gynaecol* 2007; 27 (4): 390-400.

YOON TK, LEE DR, CHA SK, CHUNG HM, LEE WS, CHA KY. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2007; 88 (4):952-6.

YOVICH JL, BLACKLEDEGE DG, RICHARDSON PA, MATSON PL, TURNER SR, DRAPER R. Pregnancies following pronuclear stage tubal transfer. *Fertil Steril.* 1987 Nov; 48(5):851-7.

ZAMAH AM, EL-SAYED YY, MILKI AA. Two cases of cholestasis in the first trimester of pregnancy after ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2008 Oct; 90(4):1202.e7-10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.072.

BIBLIOGRAFÍA

ZHU L, ZHANG Y, LIU Y, ZHANG R, WU Y, HUANG Y, LIU F, LI M, SUN S, XING L, ZHU Y, CHEN Y, XU L, ZHOU L, HUANG H, ZHANG D. Maternal and Live-birth Outcomes of Pregnancies following Assisted Reproductive Technology: A Retrospective Cohort Study. *Sci Rep.* 2016 Oct 20;6:35141.