



MÁSTER
UNIVERSITARIO EN
INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA
CLÍNICA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Factores físicos y clínicos que influyen en las tasas de éxito de la maduración *in vitro* de ovocitos procedentes de ciclos estimulados

Alumno: Laura M^a García Valverde

Tutor: José Manuel Ramos Rincón

Curso: 2021/2022

RESUMEN

Introducción y objetivos: La maduración *in vitro* de ovocitos (MIV) es una técnica de reproducción asistida que tiene como finalidad obtener ovocitos maduros tras el cultivo de ovocitos inmaduros recuperados de folículos antrales. No obstante, la MIV espontánea de ovocitos inmaduros recuperados de ciclos estimulados, aunque en menor medida, también está referenciada en la literatura y es conocida como MIV de rescate. El objetivo principal del presente trabajo fue determinar qué variables físicas y/o clínicas de las pacientes sometidas a ciclos estimulados pueden favorecer las tasas de MIV así como las del desarrollo embrionario posterior.

Material y métodos: Se realizó un estudio de cohortes retrospectivo que incluyó 448 ovocitos en estadio de profase I (PI) procedentes de un total de 248 pacientes sometidas a protocolos de estimulación ovárica convencional. Las variables físicas y clínicas estudiadas de las pacientes fueron: edad, índice de masa corporal, diagnóstico, nº ovocitos PI obtenidos/ciclo, nº días de duración de la estimulación ovárica y características medicación utilizada (agonistas/antagonistas GnRH, dosis diaria/total gonadotrofinas y tipo FSH). Las tasas evaluadas fueron la tasa de MIV, la tasa de activación ovocitaria, la tasa de división embrionaria y la tasa de formación de blastocisto.

Resultados: Los resultados mostraron en los análisis multivariantes que la variable que únicamente mostró significación de manera congruente fue la utilización de combinación gonadotrofinas al comparar una tasa bajas de MIV versus una tasa media de MIV (OR 0,072; IC 95% 0,006-0,848; p=0,037).

Conclusiones: La edad, la endometriosis y la dosis de FSH administrada durante la estimulación ovárica no son factores influyentes en el éxito de la MIV de rescate de ovocitos procedentes de ciclos estimulados. Sin embargo, la combinación de gonadotrofinas durante la estimulación reporta menores tasas de MIV.

PALABRAS CLAVE: maduración *in vitro* (MIV), ovocitos inmaduros, fecundación *in vitro* (FIV), estimulación ovárica

ABSTRACT

Introduction and objectives: Oocyte *in vitro* maturation (IVM) is an assisted reproduction technique that aims to obtain mature oocytes after culturing immature oocytes recovered from antral follicles. However, spontaneous IVM of immature oocytes recovered from stimulated cycles, although limited, is also referenced in the literature and is known as -rescuell IVM. The main objective of this study was to determine which physical and/or clinical variables of patients subjected to stimulated cycles can favor IVM rates as well as those of subsequent embryonic development.

Materials and Methods: A retrospective cohort study was carried out that included 448 prophase I oocytes (PI) from a total of 248 patients undergoing conventional ovarian stimulation protocols. The physical and clinical variables studied for the patients were: age, body mass index, diagnosis, number of PI oocytes obtained/cycle, number of days of duration of ovarian stimulation and characteristics of medication used (GnRH agonists/antagonists, daily dose/total gonadotrophins and FSH type). The rates evaluated were the IVM rate, the oocyte activation rate, the embryonic division rate and the blastocyst formation rate.

Results: The results showed in the multivariate analyzes that the variable that only consistently showed significance was the use of a gonadotropin combination when comparing a low rate of IVM versus a medium rate of IVM (OR 0.072; 95% CI 0.006-0.848; p=0.037).

Conclusions: Age, endometriosis and the dose of FSH administered during ovarian stimulation are not influencing factors in the success of IVM to -rescuell oocytes from stimulated cycles. However, the combination of gonadotrophins during stimulation reports lower rates of IVM.

KEY WORDS: *in vitro* maturation (IVM), immature oocytes, *in vitro* fertilization (IVF), ovarian stimulation

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Técnica de la maduración in vitro (MIV)	1
2. Historia de la MIV	2
3. Indicaciones clínicas aceptadas de la MIV	2
4. La estimulación ovárica en la MIV	4
5. La estimulación ovárica convencional	4
6. MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados	5
7. Estado actual de la MIV	6

JUSTIFICACIÓN	7
----------------------------	----------

HIPOTESIS.....	8
-----------------------	----------

OBJETIVOS.....	9
-----------------------	----------

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño	10
2. Sujetos del estudio	10
3. Variables estudiadas.....	10
4. Recogida de variables	
4.1 Estimulación ovárica controlada y punción folicular	11
4.2 Decumulación	13
4.3 Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos PI.....	15
4.4 Activación ovocitaria y desarrollo embrionario hasta blastocisto	15
5. Análisis estadístico.....	16
6. Aspectos éticos.....	17

RESULTADOS

Estudio 1: Tasa de MIV	17
Estudio 2: Tasas de desarrollo embrionario	
a) Tasa activación	21
b) Tasa de división.....	24
c) Tasa de desarrollo a blastocisto	27

DISCUSIÓN	31
------------------------	-----------

LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO	34
--	-----------

REFLEXIONES FINALES.....	34
---------------------------------	-----------

CONCLUSIONES.....	34
--------------------------	-----------

REFERENCIAS.....	35
-------------------------	-----------

ABREVIATURAS:

ASRM: Sociedad Americana de Medicina Reproductiva

CCO: Cúmulo corona ovocito

CP: Corpúsculo polar

E₂: Estradiol en sangre

EOC: Estimulación ovárica controlada

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: Hormona estimulante del folículo

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

hCG: Hormona coriónica humana

hMG: Hormona gonadotrofina humana

HSO: Hiperestimulación ovárica

IC: Intervalo de confianza

IMC: Índice de masa corporal

LH: Hormona luteneizante

MI: Ovocito en metafase de la primera división meiótica

MII: Ovocito en metafase de la segunda división meiótica

MIV: Maduración *in vitro*

OR: Odds ratio

PCO: Ovario poliquístico

PCOS: Síndrome del ovario poliquístico

PF: Preservación de la fertilidad

PI: Ovocito en profase de la primera división meiótica

PN: Pronúcleo

RIQ: Rango intercuartílico

SHSO: Síndrome hiperestimulación ovárica

SOR: Síndrome del ovario resistente

TA: Tasa de activación

TBt: tasa de formación de blastocisto

TD: Tasa de división

TM: Tasa de maduración

VG: vesícula germinal

I. INTRODUCCIÓN

1. Técnica de la maduración in vitro (MIV)

La técnica de la maduración *in vitro* (MIV) consiste en la recuperación de ovocitos inmaduros, en estadio de profase I (PI), de folículos antrales de ovarios no estimulados artificialmente o mínimamente estimulados, para su posterior cultivo en el laboratorio en un medio específico donde serán madurados.

Una vez recuperados de la punción folicular e identificados, los ovocitos se aíslan y cultivan durante 24-48 horas en un medio de maduración. Existen diferentes tipos de medio de maduración. La mayoría de ellos tienen en común que son medios que deben ser suplementados con FSH y LH o hCG (según los autores) (1), con el fin de simular lo más fielmente posible las condiciones que propician la maduración *in vivo*. Para que el transporte hasta el ovocito de dichas hormonas y otros metabolitos se realice de forma adecuada, es imprescindible que el ovocito se cultive en el medio de maduración rodeado de su cúmulo de células de la granulosa, ya que existen uniones comunicantes entre dichas células y el interior del ovocito, por las cuales éste puede intercambiar moléculas con el medio que le rodea (2).

El proceso de maduración ovocitaria implica tanto maduración nuclear hasta metafase II, como maduración citoplasmática. En el laboratorio, la maduración nuclear es muy sencilla de identificar, ya que ésta viene marcada por la extrusión del primer corpúsculo polar. Sin embargo la evaluación de la maduración citoplasmática no es tan sencilla (3), únicamente se puede observar de forma indirecta por la uniformidad que presenta el citoplasma, junto con el grado de expansión de las células de cúmulo y el aumento del espacio perivitelino (4). A pesar de que normalmente la maduración citoplasmática y nuclear son eventos coordinados, puede darse el caso de que ovocitos que aparentemente son –maduros meióticamente en lo que respecta a la madurez nuclear (ya que se visualiza la extrusión del primer corpúsculo polar), carezcan de factores citoplasmáticos esenciales necesarios para la posterior fecundación, formación pronuclear y desarrollo embrionario. Por ello, el ovocito necesita el tiempo suficiente para que además de extruir su primer corpúsculo polar, adquiera el estadio de competencia; ya que de no ser así, puede verse alterada la calidad embrionaria, producirse bloqueo en su división y, en última instancia, ocasionar fallos de implantación (3).

2. Historia de la MIV

La MIV de ovocitos es una técnica con una larga trayectoria. En la década de 1930, se realizaron los primeros intentos de fecundación *in vitro* (FIV) en animales utilizando ovocitos madurados *in vitro* (5–8). Años más tarde, se demostró que los ovocitos humanos procedentes de folículos antrales tenían la capacidad de reanudar la maduración y fecundarse con técnicas *in vitro* (9,10). No obstante, no fue hasta 1991 cuando se reportó el nacimiento del primer bebé procedente de ovocitos MIV a partir de varios ciclos de FIV de ciclos no estimulados (11). A partir de ese momento, se inició la verdadera investigación clínica de la MIV. Sin embargo, tras el descubrimiento y la posibilidad de utilización de gonadotropinas para conseguir un desarrollo folicular múltiple, la investigación y la práctica clínica de la MIV se volvieron escasas (12).

A pesar de que históricamente las tasas de embarazo conseguidas tras las MIV han sido bajas, la introducción de protocolos de congelación de embriones durante las últimas décadas ha permitido compensar la asincronía de la receptividad endometrial que existía al realizar la transferencia de embriones en fresco, mejorando así de forma significativa las tasas de éxito de esta técnica (13).

3. Indicaciones clínicas aceptadas de la MIV

Las indicaciones clínicas para el tratamiento con MIV varían en función del diagnóstico y la etiología de su infertilidad.

a) PCO/PCOS y riesgo HSO

En las mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP) y/o con patrón ecográfico de ovario poliquístico, la alternativa de tratamiento cuando falla la inducción de la ovulación es la FIV. Sin embargo, estas mujeres son extremadamente sensibles a la estimulación ovárica con gonadotropinas y tienen un mayor riesgo de desarrollar una hiperestimulación ovárica (HSO) (hasta un 8% en este grupo de pacientes) (14). En este contexto, se planteó la posibilidad de aplicar la MIV en pacientes con ovarios poliquísticos (PCO) o síndrome del ovario poliquístico (PCOS) (4), ya que dicha técnica conlleva una mínima o nula estimulación ovárica, evitando así el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHSO).

b) Síndrome del ovario resistente

El síndrome del ovario resistente (SOR) es una patología endocrina poco frecuente. Su fisiopatología se basa en la incapacidad de los folículos antrales para responder a la FSH endógena y exógena, por lo que realizar una FIV convencional no resulta exitosa en las pacientes con SOR e históricamente han tenido que recurrir a la utilización de ovocitos de donantes (12). Sin embargo, dado que la MIV no requiere de estimulación ovárica para obtener ovocitos maduros, es actualmente una alternativa viable a la donación de ovocitos para estas pacientes, ya que les permite conseguir embriones de sus propios ovocitos. De hecho, en la literatura ya se han reportado varios nacimientos vivos en este tipo de pacientes al realizarles un tratamiento de MIV (15,16).

c) Preservación de la fertilidad

La técnica más utilizada actualmente para la preservación de la fertilidad (PF) en mujeres que no han recibido recientemente tratamiento gonadotóxico es la criopreservación de ovocitos o embriones tras una estimulación ovárica convencional (17). Sin embargo, la estimulación ovárica no es posible realizarla en niñas prepúberes y puede estar contraindicada en determinadas neoplasias hormono-dependientes, como el cáncer de mama con estrógenos positivos, aunque bien es cierto que en este último caso pueden realizarse estimulaciones con moduladores selectivos de los receptores de estrógenos o con inhibidores de la aromatasa (18). Además, en ocasiones el tratamiento oncológico debe iniciarse de forma inmediata y no se dispone de tiempo para llevar a cabo una estimulación ovárica. Durante los últimos años, la opción más viable de PF para todas estas pacientes es la criopreservación de tejido ovárico (19). Ahora bien, la combinación de la MIV y criopreservación de los ovocitos recuperados del procesamiento del tejido ovárico extracorpóreo con la criopreservación de tejido ovárico puede ser una opción aún más interesante para poder así aumentar el número de ovocitos totales criopreservados disponibles para estas pacientes (20–24). De la misma manera, en aquellas pacientes con carcinoma de ovario limítrofe, leucemia o linfoma de Burkitt la MIV de ovocitos procedentes de tejido ovárico extirpado (bien por una ooforectomía o por una biopsia ovárica) puede ser la técnica más adecuada, dado que el trasplante de tejido ovárico plantea riesgos inherentes de reintroducción tumoral (25).

4. La estimulación ovárica en la MIV

El protocolo clínico para la aplicación de la MIV ha experimentado pocas modificaciones desde que se aplicara inicialmente la técnica. Varios ensayos han evaluado la utilidad de la estimulación folicular frente a la recuperación de ovocitos procedentes de folículos antrales no estimulados (26,27).

Se han descrito cuatro métodos de estimulación folicular :

- a) Sin estimulación con gonadotrofinas: el crecimiento folicular tiene lugar en ausencia de la administración de gonadotrofinas exógenas y la recuperación ovocitaria se realiza cuando el folículo de mayor diámetro mide entre 10 y 12 mm. Es el protocolo original de la técnica (29).
- b) Estimulación ovárica leve: es un protocolo que estimula mínimamente los ovarios con dosis bajas de FSH durante 3-6 días, y en el que la recuperación de los ovocitos se realiza en el día 7-10 del ciclo en ausencia de la administración de hCG (28).
- c) Estimulación con hCG-primed: este protocolo utiliza sólo hCG, administrando 36 horas de la recuperación de ovocitos una única inyección de 10.000 UI para estimular a los folículos de tamaño intermedio (28).
- d) Estimulación suave con gonadotrofinas y hCG-primed: este protocolo es la unión de los dos anteriores, ya que propone una estimulación suave con dosis bajas de FSH y la administración de hCG 36 horas antes de la punción ovárica (28).

5. La estimulación ovárica convencional

Para los ciclos de FIV, la práctica rutinaria es realizar una estimulación ovárica utilizando gonadotrofinas. A pesar de que actualmente cada vez se realizan protocolos de estimulación personalizados, los más generales son (29):

- a) Realizar un protocolo largo, utilizando agonistas de la GnRH desde la mitad de la fase lútea del ciclo menstrual previo, con el fin de realizar una supresión hipofisaria, y continuar la estimulación utilizando dosis convencionales de FSH o hMG.

- b) Administrar agonistas de la GnRH en un protocolo flarell, seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
- c) Seguir un protocolo de estimulación con dosis convencionales de FSH o hMG, administradas desde el inicio del ciclo menstrual, y utilizar antagonistas de la GnRH.

Generalmente, en todos estos protocolos cuando 2 folículos alcanzan un tamaño de unos 18 mm de diámetro y la concentración de estradiol en sangre de la paciente es superior a 500 pg/mL, se administra una dosis de 10.000 UI de hCG y, al cabo de 34-36 horas se realiza la punción ovárica para la recuperación de ovocitos (29).

6. MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados

La MIV espontánea de ovocitos inmaduros en estadio de PI, recuperados de ciclos estimulados está poco referenciada en la literatura y la mayoría de los estudios que hay fueron realizados en pacientes con ciclos menstruales regulares y ovarios normales (30–35). Los ovocitos madurados in vitro en estos trabajos hacen referencia a ovocitos inmaduros, que fueron recuperados de folículos de buen tamaño y, que teóricamente, deberían haber contenido ovocitos maduros. A pesar de que algunos de estos ovocitos son atrésicos o resistentes a la estimulación in vivo con gonadotrofinas, otros ovocitos sí tienen la capacidad de madurar y alcanzar la maduración e incluso fecundar, siempre que las condiciones del cultivo sean las adecuadas. Estos ovocitos capaces de madurar y fecundar pueden constituir un incremento en el número de ovocitos disponibles para la paciente, y por tanto, mejorar así el rendimiento de su ciclo de FIV (29).

Hay pacientes sometidas a tratamientos de FIV que tras su punción ovárica, obtienen un número muy bajo de ovocitos maduros y, por el contrario, un elevado número de ovocitos inmaduros. Además, existe un pequeño subgrupo de pacientes que presenta defectos de maduración meiótica de los ovocitos, en los que en sus captaciones ovocitarias se obtienen ovocitos inmaduros (PI y metafase I) tras repetidos ciclos de estimulaciones ováricas convencionales (36). Para todas estas pacientes, la MIV de rescate puede ser su único tratamiento alternativo.

7. Estado actual de la MIV

Los resultados de MIV entre los diferentes centros y laboratorios son muy variables y no se pueden comparar entre ellos debido a que las técnicas de laboratorio, medios y condiciones de cultivo y tipo de estimulación son muy diversas y no existen protocolos estandarizados (28,29). Actualmente, una de las principales deficiencias de la literatura sobre la MIV humana es el enorme grado de confusión sobre lo que es y lo que no es, y lo que constituye una práctica de MIV clínicamente aceptable (2). Una comprensión errónea e insuficiente en el sector de las técnicas de reproducción asistida de lo que constituye la MIV, junto con la falta de suficientes centros especializados que ofrezcan formación en MIV y las menores tasas de éxito en comparación con los tratamientos de FIV convencional, constituyen las barreras actuales para la aceptación y el progreso de la MIV (28,37).

En 2021, la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) propuso que la MIV ya no se considere experimental (38). No obstante, antes de que esta técnica se pueda aplicar en la práctica clínica, todavía se necesita una formación específica para clínicos y embriólogos, tal y como se ha comentado. A largo plazo, la MIV puede considerarse una técnica prometedora, especialmente en el ámbito de la oncofertilidad (37).

II. JUSTIFICACIÓN

Numerosas pacientes que se someten a ciclos convencionales de fecundación *in vitro* (FIV) en la unidad de reproducción obtienen ovocitos inmaduros tras su punción ovárica. Cuando además de dichos ovocitos inmaduros, se recuperan numerosos ovocitos maduros que permiten realizar la fertilización, el éxito del tratamiento no se ve comprometido. Sin embargo, cuando el número de ovocitos maduros recuperados es inferior al de los inmaduros o cuando los únicos ovocitos recuperados son inmaduros, existen muy pocas o nulas probabilidades de que la paciente consiga un embrión viable para transferirse. De forma rutinaria, estos ovocitos inmaduros son descartados en el laboratorio. No obstante, desde hace algunos años, se han desarrollado en la unidad pequeños estudios de maduración *in vitro* –de rescate de los ovocitos inmaduros obtenidos de algunas pacientes. El problema es que para la realización de dichos estudios no se establecieron criterios homogéneos de inclusión/exclusión de las pacientes, por lo que no se ha estudiado realmente qué perfil de pacientes pueden beneficiarse realmente de la utilización de dicho proceso. El presente estudio pretende analizar qué variables de las mujeres sometidas a la técnica de maduración *in vitro* ovocitaria son las que favorecen que la técnica tenga resultados satisfactorios y poder así acotar y dirigir este tratamiento únicamente a las pacientes que puedan sí puedan beneficiarse de él.

III. HIPOTESIS

En base a la literatura, la hipótesis del presente trabajo fue que la edad (por la disminución de la calidad ovocitaria), el diagnóstico de endometriosis (ya que provoca que la calidad ovocitaria esté comprometida) y las dosis de FSH son factores condicionantes de la tasa de MIV, activación, división y formación de blastocisto.



IV. OBJETIVOS:

Objetivo principal:

- ☑ Determinar qué variables físicas y/o clínicas de las pacientes pueden favorecer las tasas de MIV así como las del desarrollo embrionario posterior.

Objetivos secundarios:

1. Evaluar si el tipo de estimulación ovárica influye en las tasas de MIV y las de desarrollo embrionario.
2. Valorar a qué perfil de pacientes se les puede aplicar con garantía de éxito la técnica de MIV.



V. MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Diseño

Estudio de cohortes retrospectivo.

2. Sujetos del estudio

En el presente estudio se incluyeron 448 ovocitos inmaduros en estadio de PI procedentes de un total de 248 pacientes sometidas a protocolos de estimulación ovárica convencional para realizarse un tratamiento de FIV o de preservación de la fertilidad en el Servicio de Ginecología (Reproducción humana) del H.U.P. La Fe de Valencia.

3. VARIABLES ESTUDIADAS.

En este estudio se evaluaron tanto variables físicas como variables clínicas relacionadas con el ciclo de reproducción asistida de las pacientes.

Las variables físicas estudiadas de las pacientes fueron la edad y el índice de masa corporal (IMC). Respecto a las variables clínicas, se tuvieron en cuenta el diagnóstico de la paciente, el nº de ovocitos PI obtenidos en cada ciclo, el número de días de duración de la estimulación ovárica y las características de la medicación utilizada durante la misma (utilización de agonistas/antagonistas de la GnRH, dosis diaria de gonadotrofinas, cantidad total de gonadotrofinas suministradas y tipo de FSH utilizado).

La valoración de la MIV se realizó a través del cálculo de la siguiente tasa:

- ❖ **Tasa de maduración (TM):** calculada mediante el número de ovocitos PI que alcanzaron el estadio de MII en 24-48 horas del total de PI que se cultivaron en medio de MIV.

La evaluación de la activación ovocitaria se realizó mediante el cálculo de la siguiente tasa:

- ❖ **Tasa de activación (TA):** calculada a partir del número de ovocitos que presentaron signos de activación del total de ovocitos cultivados con Ca^{2+} y 6-DMAP.
-

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó mediante el cálculo de las siguientes tasas:

- ❖ **Tasa de división (TD) y Tasa de formación de blastocisto (TBT):** calculada a partir del número de embriones partenogenotas que alcanzaron como mínimo dos células y se desarrollaron hasta blastocisto.
-

4. Recogida de variables

Estimulación ovárica controlada y punción folicular:

A todas las pacientes que participaron en el estudio se les realizó un protocolo de Estimulación Ovárica Controlada (EOC). Las pacientes fueron tratadas tanto con agonistas (Synarel, NPIL Pharmaceuticals, Morpeth) como con antagonistas de la GnRH (Cetrotide, Merck-Serono, London u Orgalutran®, MSD, Hertfordshire) para suprimir la función hipofisaria. A las pacientes se les administró una dosis variable de gonadotrofinas (hormona folículo estimulante, FSH: Gonal, Merck-Serono, Madrid o Puregón, Organón, Barcelona o Fostipur, Angelini Farmacéutica, Barcelona; hormona lutenizante humana, LH: Merck-Serono, Madrid y/o gonadotrofina menopáusica humana, hMG: Menopur, Ferring SAU, Madrid). Las dosis hormonales se ajustaron posteriormente, en función de la respuesta ovárica individual de cada paciente objetivada cada 2 ó 3 días mediante ecografía transvaginal y nivel sérico de estradiol en

sangre (E_2). Cuando alguno de los folículos alcanzó un diámetro medio ≥ 14 mm, se inició la administración diaria de 0.1 mL de antagonista de GnRH. Finalmente, tras comprobar el desarrollo folicular por ecografía vaginal de al menos 3 folículos con un diámetro medio ≥ 18 mm y niveles séricos de E_2 (evaluados por RIA; Bio Merieux España S.A., Madrid) de alrededor de 400 pg/mL por folículo del tamaño citado, se procedió a la maduración final de los ovocitos mediante la administración de 10.000 UI de la hormona gonadotropinacoriónica humana (hCG) (Ovitrelle®, Laboratorios Serono, Madrid) 36-38 horas antes de la punción folicular.

Para la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO), se realizó la punción y aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal (Figura 1). Se trata de una intervención de corta duración, que requiere un sedación profunda, en la que el ginecólogo mediante la ecografía localiza los folículos, y los punciona uno a uno a través de la aguja que tiene acoplada el ecógrafo vaginal. El líquido folicular aspirado pasa por el sistema de aspiración con presión que tiene conectada la aguja de punción, y finalmente es recogido en un tubo estéril que se encuentra a una temperatura de 37°C. Los tubos fueron transportados en un termobloque (para que el líquido folicular no sufriera oscilaciones en su temperatura) hasta el laboratorio, donde se procedió a la identificación y recuperación de los CCO.



Figura 1. Diagrama del proceso de aspiración folicular (Centro de Fertilidad y Endometriosis de Berlín, 2010).

Los CCO visualizados en el líquido folicular bajo la lupa, se transfirieron de forma rápida a una placa (Falcon® 35-1008 NJ, USA) con medio de lavado Fertilization Medium que se encontraba a 37°C (Flushing Medium Medicult®, Jyllinge, Denmark). A continuación, los complejos CCO se lavaron en otra placa idéntica a la anterior y acto seguido, se depositaron en una placa (Falcon® 35-1008 NJ, USA) de macrogotas (~50µl) de medio IVF (Medicult®, Jyllinge, Denmark) cubierta de aceite mineral

(Ovoil™ Vitrolife® Guthenburg, Sweden). La placa con los cúmulos se guardó en el incubador, donde permaneció entre 2-4 horas tras la punción, bajo unas condiciones de 37°C y 6% de CO₂, hasta el momento de la decumulación.

Decumulación:

Transcurridas entre 2 y 4 horas desde la punción folicular, se procedió a la decumulación de los cúmulos para eliminar la células la granulosa adyacentes al ovocito

Para el proceso de la decumulación, se utilizó una placa (Figura 2) (Falcon® 35-1008 NJ, USA) cubierta de aceite mineral (Ovoil™ Vitrolife® Guthenburg, Sweden), que contenía tres macrogotas de dilución 80 UI/mL de Hialuronidasa (SynVibro®Hydase; MediCult, Jyllinge, Denmark) y cinco macrogotas de FM (Flushing Medium Medicult®, Jyllinge, Denmark). Los ovocitos fueron decumulados en dicha placa mediante un proceso enzimático (debido a la hialuronidasa) y mecánico; con pipetas de calibre descendiente. Una vez decumulados total o parcialmente, los ovocitos se transfirieron a una placa (Figura 9B) cubierta de aceite mineral (Ovoil™ Vitrolife® Guthenburg, Sweden) que contenía cuatro microgotas de medio IVF (Medicult®, Jyllinge, Denmark) y cuatro microgotas de medio ISM-1 (Medicult®, Jyllinge, Denmark), depositándose en la microgota de lavado de medio IVF (Medicult®, Jyllinge, Denmark).

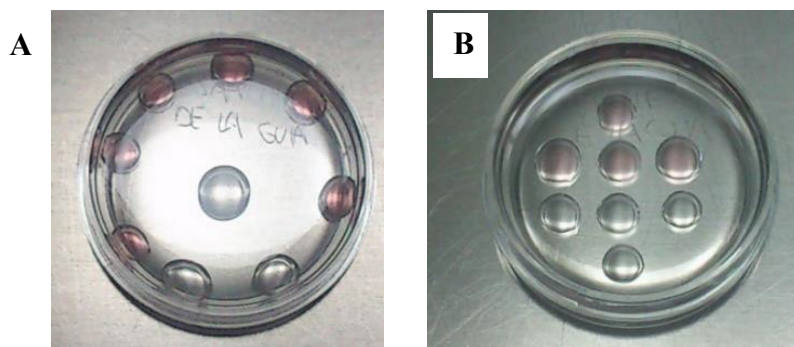


Figura 2. A. Fotografía de la placa de decumulación. B. Fotografía dela placa post-decumulación.

A continuación, bajo el microscopio óptico invertido se procedió a la evaluación de los ovocitos según su estadio nuclear (Figura 3).

✚ **Profuse I (PI):** se observa la Vesícula Germinal (VG) en el citoplasma

del ovocito (la cromatina se encuentra difusa dentro del núcleo y protegida por la envoltura nuclear).

- ✚ **Metafase I (MI):** No se observa VG en el citoplasma, ni tampoco el primer corpúsculo polar (CP) en el espacio perivitelino (los cromosomas se encuentran condensados y dispuestos en el plano ecuatorial para que pueda tener lugar la primera división meiótica).
- ✚ **Metafase II (MII):** se caracteriza por la presencia del primer CP en el espacio perivitelino (los cromosomas se encuentran condensados y dispuestos en el plano ecuatorial para que pueda tener lugar la segunda división meiótica, en el caso de que el ovocito sea fecundado).

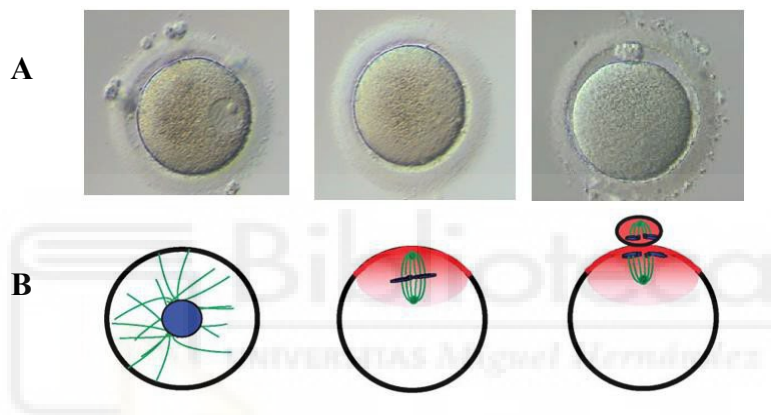


Figura 3. Fotografía (A) y esquema (B) de los diferentes estadios nucleares del ovocito (modificado de Stephane

Maduración *in vitro* de los ovocitos PI.

El medio de maduración suplementado se preparó el día previo a la maduración, según el protocolo recomendado la casa comercial: se añadió a un tubo estéril (Tubo 1) 10 ml de medio de maduración (*Oocyte Maturation Medium* (Sage/Cooper Surgical, CT, USA)) y una ampolla de 75 IU FSH y 75 IU LH. A continuación se agregaron a otro tubo (tubo 2) 9,9 ml de medio de maduración y se adicionaron 100 μ l del tubo 1 en el tubo 2. Por último se prepararon las placas de cultivo con microgotas de medio procedente del tubo 2 y se cubrieron con aceite mineral (Ovoil™ Vitrolife® Guthenburg, Sweden). Los ovocitos PI se transfirieron a la placa de MIV (Figura 15B), donde se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO₂.

Activación ovocitaria y desarrollo embrionario hasta blastocisto.

Con el fin de evaluar la competencia de los ovocitos MII obtenidos tras la MIV, éstos se activaron mediante la activación química partenogenética, para así evitar los problemas éticos-legales de realizar la técnica de ICSI con espermatozoides.

El protocolo de activación utilizado fue el desarrollado por Paffoni con algunas modificaciones (referencias). Los ovocitos fueron expuestos a una concentración de $10\mu\text{M}$ de ionomicina de calcio (Sigma-Aldrich SR1, Milan, Italy) en medio IVF durante 5 minutos a 37°C y 6% CO_2 en condiciones de oscuridad. A continuación fueron lavados dos veces e incubados en 2mM 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP) (Sigma-Aldrich SR1, Milan, Italy) en medio de cultivo IVF® durante 3 horas a 37°C y 6% CO_2 . Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados y los ovocitos se cultivaron en microgotas de G1Plus™ suplementado al 10% con *Serum Substitute Supplement* (SSS, IrvineScientific®, Santa Ana, USA) y cubiertas de aceite mineral.

Tras 18-20 horas de la activación, aquellos ovocitos que mostraron pronúcleos (PN) se consideraron activados.

Los cigotos partenogenotas se lavaron dos veces y se dejaron en cultivo hasta día 3 post-activación en medio G1Plus™ y hasta día 6 post-activación en CCM™ (Vitrolife, Göteborg, Sweeden), ambos medios suplementados al 10% con SSS.

Todos los días de cultivo se realizaron observaciones al microscopio invertido para valorar el estadio de desarrollo embrionario de los cigotos, para posteriormente valorar las tasas de división y de formación de blastocisto.

5. Análisis estadístico.

Los datos se analizaron utilizando el paquete de software estadístico SPSS v22.0. La precisión estadística se determinó mediante el cálculo del IC 95%, utilizando el test estadístico apropiado en función de cada tipo de medida o variable.

En primer lugar, se identificaron las variables cuantitativas no paramétricas, mediante la realización del test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. A continuación, se realizó el análisis descriptivo de todas las variables. En el caso de las variables cualitativas, se utilizó la distribución de frecuencias, calculando la frecuencia total y relativa de cada categoría; mientras que para las variables cuantitativas se

utilizaron medidas de tendencia central, calculando la mediana y el rango intercuartílico (RIQ).

La relación entre las distintas variables cualitativas y las tasas de MIV, activación, división y formación de blastocisto se valoró mediante la realización del test de Chi cuadrado. Sin embargo, para evaluar la relación entre las variables cuantitativas no paramétricas se utilizaron el test U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis.

Finalmente, para calcular las asociaciones entre las distintas variables independientes se realizó un análisis multivariante utilizando los modelos de regresión logística binaria (por el método -introducir¶) y regresión logística multinomial, obteniendo las odds ratio (OR) y sus IC 95%. En dichos modelos se incluyeron aquellas variables independientes que tenían un número suficiente de casos como para poder obtener resultados.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

6. Aspectos éticos

El presente estudio ha utilizado ovocitos inmaduros humanos que de forma rutinaria son descartados en el laboratorio, por lo que el éxito del ciclo de FIV de las pacientes no se vio comprometido de manera alguna al no utilizar ovocitos potencialmente fecundables.

Por otro lado, los ovocitos madurados no fueron fecundados con espermatozoides, sino que fueron activados partenogénicamente. Por ello, en ningún caso se generó ningún embrión potencialmente transferible.

El presente trabajo de investigación está incluido dentro del proyecto -Dinámica citoplasmática y reanudación meiótica *in vitro* de ovocitos de ovocitos humanos. Interacción con células de la granulosa y líquido folicular¶, que recibió la aprobación del Comité de Ética Humana del H. U. P. La Fe de Valencia con número de registro: 2018/0357. Además cuenta con la aprobación de la Oficina de Investigación Responsable (OIR) de la Universidad Miguel Hernández, con código N°.....

VI. RESULTADOS

Estudio 1: Tasa de MIV

El estudio incluyó un total de 248 pacientes, de las cuales el 58,5% estaban diagnosticadas de factor reproductor normal. La mediana de la edad de las pacientes fue de 35 años (RIQ 32-37) y la del IMC fue de 22,58 (RIQ 20,70-25,17). La mayoría de las pacientes participantes recibió tratamiento con antagonistas de la GnRH (92,6%) y únicamente un 7,3% se trató con agonistas de la GnRH (tabla 1).

Referente al tipo de gonadotrofinas administradas, el tipo más utilizado fue la FSH (58,9%), concretamente el Gonal-f™ (41,2%). La mediana de la duración de la estimulación ovárica en las pacientes fue de 9 días (RIQ 8-10). A lo largo de la estimulación, las medianas de las dosis diarias administradas de FSH, LH y hMG fueron de 225,00 (RIQ 150,00-225,00), 0,00 (RIQ 0,00-0,00) y 0,00 (0,00-731,25) respectivamente (Tabla 1). Los valores de 0,00 de las dos últimas se debieron a que se administraron a un bajo número de pacientes.

En referencia a la tasa de MIV, ésta se categorizó en tres grupos: baja (tasas entre el 0-55%), media (tasas entre el 56-74%) y alta (tasas entre el 75-100%). El 47,98% de las pacientes (119/248) presentó una alta tasa de MIV, mientras que el 46,37% (115/248) presentó una baja tasa de MIV (tabla 1). Tanto los distintos diagnósticos como los diferentes tipos de medicación administrada en la estimulación mostraron porcentajes similares en las tasas de MIV baja y alta, no reportando por tanto diferencias estadísticamente significativas entre ellos. De la misma manera, tampoco mostraron significación las diferencias en tasas de MIV entre las edades ni entre los IMC de las pacientes. Sin embargo, la duración de la estimulación sí reflejó diferencias significativamente significativas entre las distintas tasas ($p=0,007$; Tabla 1).

Las variables –Administración de antagonista‖ y –Tipo de FSH‖ mostraron valores perdidos (6 y 20 respectivamente) que fueron excluidos de los análisis estadísticos realizados.

Tabla 1. Descripción de las variables físicas y clínicas de las pacientes incluidas en el estudio en función de la tasa de MIV.

Variable	Total	Tasa MIV baja	Tasa MIV media	Tasa MIV alta	p-valor ^a
Diagnóstico de la paciente					0,963
Factor reproductor normal	58,5% (145/248)	65 (44,8%)	9 (6,2%)	71 (49%)	
Anovulación	12,5% (31/248)	14 (45,2%)	2 (6,5%)	15 (48,4%)	
Obstrucción tubárica	14,1% (35/248)	16 (45,7%)	2 (5,7%)	17 (48,6%)	
Endometriosis	14,9% (37/248)	20 (54,1%)	1 (2,7%)	16 (43,2%)	
Estimulación con agonistas de la GnRH					0,411
No	92,7% (230/248)	104 (45,2%)	13 (5,7%)	113 (49,1%)	
Sí	7,3% (18/248)	11 (61,1%)	1 (5,6%)	6 (33,3%)	
Estimulación con antagonista de la GnRH					0,451
No	7,3% (18/242)	11 (61,1%)	2 (5,6%)	6 (33,3%)	
Sí	92,6% (224/242)	103 (46%)	13 (5,8%)	108 (48,2%)	
Tipo FSH administrada					0,614
Puregón	38,2% (87/228)	37 (42,5%)	2 (2,3%)	48 (55,2%)	
Fostipur	14,5% (33/228)	14 (42,4%)	2 (6,1%)	17 (51,5%)	
Gonal	41,2% (94/228)	48 (51,1%)	8 (8,5%)	38 (40,4%)	
ELONVA	6,1% (14/228)	6 (42,9%)	1 (7,1%)	7 (50%)	
Tipo gonadotropinas administradas					0,941
FSH	58,9% (146/248)	69 (47,3%)	8 (5,5%)	69 (47,3%)	
Combinación (FSH/LH/hMG)	32,7% (81/248)	37 (45,7%)	4 (4,9%)	40 (49,4%)	
hMG	8,5% (21/248)	9 (42,9%)	2 (9,5%)	10 (47,6%)	
Edad de la paciente [años (RIQ)]	35 (32-37)	35 (32-37)	33 (30,75-38,25)	35 (32-37)	0,531 ^b
IMC de la paciente [IMC (RIQ)]	22,58 (20,70-25,17)	23,45 (20,68-25,29)	21,49 (20,70-24,17)	22,15 (20,70-25,01)	0,412 ^b
Dosis diaria FSH [UI (RIQ)]	225,00 (150,00-225,00)	225,00 (150,00-300,00)	225,00 (150,00-300,00)	225,00 (150,00-225,00)	0,274 ^b
Dosis diaria LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,447 ^b
Dosis diaria hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-75,00)	0,00 (0,00-75,00)	0,00 (0,00-75,00)	0,00 (0,00-75,00)	0,829 ^b
Total FSH [UI (RIQ)]	2138,25 (1356,25-3000,00)	2175,00 (1500,00-2700,00)	1950,00 (1037,50-2418,75)	2250,00 (1300,00-3075,00)	0,386 ^b
Total LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,052 ^b
Total hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-731,25)	0,00 (0,00-675,00)	0,00 (0,00-675,00)	0,00 (0,00-750,00)	0,607 ^b
Duración de la estimulación (días [RIQ])	9 (8-10)	9 (8-10)	8,5 (7,0-9,0)	9 (8-11)	0,007^{b*}

RIQ, rango intercuartílico.

^ap valor basado en el test de chi-cuadrado.

^bPrueba Kruskal-Wallis.

*p-valor < 0,05

Para comprobar que las significaciones estadísticas obtenidas entre las variables no estaban influenciadas por algún factor de confusión así como para comprobar las asociaciones entre ellas se realizó un análisis multivariante. En dicho análisis únicamente mostró significación el tipo de gonadotrofinas administradas al comparar una tasa media de MIV con una tasa baja. De tal manera que, al utilizar en la estimulación una combinación de gonadotrofinas es más probable que se obtenga una tasa de MIV baja en vez de una tasa media de MIV (OR 0,072; IC 95% 0,006-0,848; $p=0,037$; Tabla 2).

La duración de la estimulación que presentó significación con el test de Chi cuadrado (Tabla 1), en el análisis multivariante posterior no presentó significación (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2. Análisis multivariante: variables asociadas con la probabilidad de obtener una tasa media de MIV versus obtener una tasa baja de MIV.

Variable	OR	IC	p-valor
Diagnóstico de la paciente			
Factor reproductor normal	3,690	(0,473-28,792)	0,213
Anovulación	6,425	(0,440-93,746)	0,174
Obstrucción tubárica	1,678	(0,129-21,814)	0,693
Endometriosis	.	.	.
Estimulación con agonistas de la GnRH			
No	1,293	(0,170-9,825)	0,804
Sí	.	.	.
Estimulación con antagonista de la GnRH			
No	.	.	.
Sí	.	.	.
Tipo FSH administrada			
Puregón	0,173	(0,002-12,797)	0,424
Fostipur	0,586	(0,031-11,029)	0,721
Gonal	1,493	(0,061-36,623)	0,806
ELONVA	1,515	(0,074-31,004)	0,788
Tipo gonadotrofinas administradas			
FSH	0,090	(0,004-2,197)	0,140
Combinación (FSH/LH/hMG)	0,072	(0,006-0,848)	0,037*
hMG	.	.	.
Edad de la paciente	0,905	(0,779-1,051)	0,190
IMC de la paciente	0,935	(0,806-1,085)	0,375
Dosis diaria FSH	1,013	(0,995-1,030)	0,163
Dosis diaria LH	0,973	(0,866-1,092)	0,639
Dosis diaria hMG	1,005	(0,981-1,030)	0,669
Total FSH	0,999	(0,997-1,001)	0,323
Total LH	0,997	(0,948-1,048)	0,909
Total hMG	1,001	(0,998-1,004)	0,573
Duración de la estimulación	0,694	(0,533-1,521)	0,694

OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

. Parámetro establecido en 0 porque es redundante.

*p-valor < 0,05

Tabla 3. Análisis multivariante: variables asociadas con la probabilidad de obtener una tasa alta de MIV versus obtener una tasa baja de MIV.

<i>Tasa MIV alta VS Tasa MIV baja</i>	OR	IC	p-valor
Diagnóstico de la paciente			
Factor reproductor normal	1,550	(0,638-3,767)	0,333
Anovulación	0,758	(0,209-2,756)	0,674
Obstrucción tubárica	1,528	(0,507-4,611)	0,452
Endometriosis	.	.	.
Estimulación con agonistas de la GnRH			
No	1,844	(0,582-5,836)	0,298
Sí	.	.	.
Estimulación con antagonista de la GnRH			
No	.	.	.
Sí	.	.	.
Tipo FSH administrada			
Puregón	0,890	(0,202-3,915)	0,877
Fostipur	0,932	(0,179-4,845)	0,934
Gonal	0,507	(0,104-2,462)	0,400
ELONVA	.	.	.
Tipo gonadotropinas administradas			
FSH	0,610	(0,075-4,932)	0,643
Combinación (FSH/LH/hMG)	0,754	(0,129-4,399)	0,753
hMG	.	.	.
Edad de la paciente	0,941	(0,868-1,022)	0,148
IMC de la paciente	0,953	(0,882-1,029)	0,220
Dosis diaria FSH	0,992	(0,983-1,000)	0,063
Dosis diaria LH	0,979	(0,939-1,020)	0,307
Dosis diaria hMG	0,995	(0,983-1,006)	0,352
Total FSH	1,001	(1,000-1,001)	0,200
Total LH	0,990	(0,919-1,067)	0,795
Total hMG	1,000	(0,999-1,001)	0,825
Duración de la estimulación	1,076	(0,867-1,335)	0,504

OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

. Parámetro establecido en 0 porque es redundante.

*p-valor < 0,05

Estudio 2: Tasas de desarrollo embrionario

a) Tasa activación

El estudio incluyó un total de 124 pacientes, de las cuales el 58,9% estaban diagnosticadas de factor reproductor normal. La mediana de la edad de las pacientes fue de 35 años (RIQ 32-37) y la del IMC fue de 22,20 (RIQ 20,70-25,92). La mayoría de las

pacientes participantes recibió tratamiento con antagonistas de la GnRH (96,0%) y únicamente un 4,0% se trató con agonistas de la GnRH (Tabla 4).

Referente al tipo de gonadotrofinas administradas, el tipo más utilizado fue la FSH (59,7%), concretamente el Gonal-f™ (42,6%). La mediana de la duración de la estimulación ovárica en las pacientes fue de 9 días (RIQ 8-11). A lo largo de la estimulación, las medianas de las dosis diarias administradas de FSH, LH y hMG fueron de 225,00 (RIQ 150,00-225,00), 0,00 (RIQ 0,00-0,00) y 0,00 (0,00-75,00) respectivamente (Tabla 4). Los valores de 0,00 de las dos últimas se debieron a que se administraron a un bajo número de pacientes.

En referencia a la tasa de activación, ésta se categorizó en dos grupos: mala tasa de activación (tasas entre el 0-49%) y buena tasa de activación (tasas entre el 75-100%). La mayoría de las pacientes presentó una buena tasa de activación (60,48%). Aquellas pacientes diagnosticadas con factor reproductor normal mostraron peores tasas de activación que las pacientes con otros diagnósticos (54,8% vs 75,0%, 61,9% y 71,4%). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Las pacientes estimuladas con antagonistas de la GnRH y no con agonistas presentaron porcentajes similares de mala y buena tasa de activación, sin reflejar por tanto diferencias significativas entre los grupos. En cuanto al tipo de gonadotrofinas administradas, la administración de FSH y hMG reportaron mayores porcentajes de buena tasa de activación (63,5% y 66,7% respectivamente), pero sin mostrar significación. De la misma manera, referido al tipo de FSH administrada, el Puregón y el Gonal-f™ mostraron porcentajes ligeramente superiores de buena tasa de activación (64,3% y 69,4% respectivamente), pero sin reflejar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

Las dosis diarias y totales de gonadotrofinas administradas, la duración de la estimulación, la edad y el IMC de las pacientes tampoco reportaron ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción de las variables físicas y clínicas de las pacientes incluidas en el estudio en función de la tasa de activación.

Variable	Total	Mala tasa activación	Buena tasa activación	p-valor
Diagnóstico de la paciente				0,374 ^a
Factor reproductor normal	58,9% (73/124)	33 (45,2%)	40 (54,8%)	
Anovulación	12,9% (16/124)	4 (25,0%)	12 (75,0%)	
Obstrucción tubárica	16,9% (21/124)	8 (38,1%)	13 (61,9%)	
Endometriosis	11,3% (14/124)	4 (28,6%)	10 (71,4%)	
Estimulación con agonistas de la GnRH				0,241 ^a
No	96,0% (119/124)	48 (40,3%)	71 (59,7%)	
Sí	4,0% (5/124)	1 (20,0%)	5 (80,0%)	
Estimulación con antagonista de la GnRH				0,362 ^a
No	4,0% (5/124)	1 (20,0%)	4 (80,0%)	
Sí	96,0% (119/124)	48 (40,3%)	71 (59,7%)	
Tipo FSH administrada				0,138 ^a
Puregón	36,5% (42/115)	15 (35,7%)	27 (64,3%)	
Fostipur	13,9% (16/115)	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
Gonal	42,6% (49/115)	15 (30,6%)	34 (69,4%)	
ELONVA	7% (8/115)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
Tipo gonadotropinas administradas				0,541 ^a
FSH	59,7% (74/124)	27 (36,5%)	47 (63,5%)	
Combinación (FSH/LH/hMG)	33,1% (41/124)	19 (46,3%)	22 (53,7%)	
hMG	7,3% (9/124)	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
Edad de la paciente [años (RIQ)]	35 (32-37)	35 (32-37)	35 (31-37)	0,365 ^b
IMC de la paciente [IMC (RIQ)]	22,20 (20,70-25,92)	21,72 (20,53-25,30)	22,32 (21,09-26,35)	0,557 ^b
Dosis diaria FSH [UI (RIQ)]	225,00 (150,00-225,00)	150,00 (150,00-225,00)	225,00 (150,00-225,00)	0,254 ^b
Dosis diaria LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,158 ^b
Dosis diaria hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-75,00)	0,00 (0,00-150,00)	0,00 (0,00-75,00)	0,259 ^b
Total FSH [UI (RIQ)]	2212,50 (1300,00-3000,00)	2250,00 (1237,50-3000,00)	2175,00 (1325,00-3000,00)	0,773 ^b
Total LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,419 ^b
Total hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-750,00)	0,00 (0,00-1050,00)	0,00 (0,00-750,00)	0,634 ^b
Duración de la estimulación (días [RIQ])	9 (8-11)	9 (8-10,50)	9,00 (8,00-11,00)	0,429 ^b

RIQ, rango intercuartílico.

^ap valor basado en el test de chi-cuadrado.

^bTest U de Mann-Whitney.

*p-valor < 0,05

De la misma manera que para la tasa de MIV, con el fin de comprobar las asociaciones entre las distintas variables se realizó un análisis multivariante, en el que únicamente mostraron significación la dosis diaria y la dosis total de hMG administrada a la paciente. De tal manera que, a mayores dosis diarias de hMG es más probable que se obtenga una mala tasa de activación (OR 0,955; IC 95% 0,919-0,991; $p = 0,015$). Sin embargo, a mayores dosis totales de hMG es más probable que se obtenga una buena tasa de activación (OR 1,007; IC 1,002-1,012; $p=0,009$; Tabla 5).

Tabla 5. Análisis multivariante: variables asociadas con la probabilidad de obtener una buena tasa de activación.

Variable	OR	IC	p-valor
Diagnóstico de la paciente			
Factor reproductor normal	1		
Anovulación	1,071	(0,219-5,238)	0,933
Obstrucción tubárica	1,349	(0,399-4,557)	0,63
Endometriosis	2,053	(0,335-12,593)	0,437
Estimulación con antagonista de la GnRH			
No	1		
Sí	0,292	(0,022-3,833)	0,348
Tipo FSH administrada			
Puregón	1		
Fostipur	0,536	(0,129-2,221)	0,39
Gonal	1,83	(0,599-5,591)	0,289
ELONVA	0,117	(0,010-1,359)	0,086
Tipo gonadotrofinas administradas			
FSH	1		
Combinación (FSH/LH/hMG)	1,322	(0,200-8,728)	0,772
Edad de la paciente	0,932	(0,821-1,057)	0,273
IMC de la paciente	1,006	(0,988-1,024)	0,527
Dosis diaria FSH	1,015	(0,998-1,033)	0,091
Dosis diaria hMG	0,955	(0,919-0,991)	0,015*
Total FSH	0,998	(0,996-1,000)	0,102
Total hMG	1,007	(1,002-1,012)	0,009*
Duración de la estimulación	1,312	(0,859-2,003)	0,209

OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

*p-valor < 0,05

b) Tasa de división

El estudio incluyó un total de 80 pacientes, de las cuales el 58,3% estaban diagnosticadas de factor reproductor normal. La mediana de la edad de las pacientes fue de 34,5 años (RIQ 31-37) y la del IMC fue de 22,27 (RIQ 20,90-26,42). La mayoría de las pacientes participantes recibió tratamiento con antagonistas de la GnRH (95,0%) y únicamente un 5,0% se trató con agonistas de la GnRH (Tabla 6).

Referente al tipo de gonadotrofinas administradas, el tipo más utilizado fue la FSH (63,7%), concretamente el Gonal-f™ (44,7%). La mediana de la duración de la estimulación ovárica en las pacientes fue de 9 días (RIQ 8-11). A lo largo de la estimulación, las medianas de las dosis diarias administradas de FSH, LH y hMG fueron de 225,00 (RIQ 150,00-225,00), 0,00 (RIQ 0,00-0,00) y 0,00 (0,00-75,00) respectivamente (Tabla 6). Los valores de 0,00 de las dos últimas se debieron a que se administraron a un bajo número de pacientes.

En referencia a la tasa de división, ésta se categorizó en dos grupos: mala tasa de división (tasas entre el 0-49%) y buena tasa de división (tasas entre el 75-100%). La mayoría de las pacientes presentó una buena tasa de división (82,5%), independientemente de su diagnóstico, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La estimulación con agonistas o con antagonistas de la GnRH reportó porcentajes muy elevados de buena tasa de activación, pero sin reflejar significación alguna. En cuanto al tipo de gonadotrofinas administradas, todas reportaron porcentajes similares de buena tasa de activación (86,3%, 73,9% y 83,3%), pero de nuevo sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas. De la misma manera, referido al tipo de FSH administrada, el Puregón, el Gonal-f™ y el Fostipur mostraron porcentajes muy superiores de buena tasa de activación (83,3%, 87,5% y 85,5% respectivamente), pero sin reflejar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Las dosis diarias y totales de gonadotrofinas administradas, la duración de la estimulación, la edad y el IMC de las pacientes tampoco reportaron ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 6).

Tabla 6. Descripción de las variables físicas y clínicas de las pacientes incluidas en el estudio en función de la tasa de división.

Variable	Total	Mala tasa división	Buena tasa división	p-valor
Diagnóstico de la paciente				0,259 ^a
Factor reproductor normal	58,3% (43/80)	8 (18,6%)	35 (81,4%)	
Anovulación	16,3% (13/80)	0 (0%)	13 (100%)	
Obstrucción tubárica	17,5% (14/80)	3 (21,4%)	11 (78,6%)	
Endometriosis	12,5% (10/80)	3(30%)	7 (70%)	
Estimulación con agonistas de la GnRH				0,287 ^a
No	95,0% (76/80)	14 (18,4%)	62 (81,6%)	
Sí	5,0% (4/80)	0 (0,0%)	4 (100%)	
Estimulación con antagonista de la GnRH				0,345 ^a
No	5,0% (4/80)	0 (0%)	4 (100%)	
Sí	95,0% (76/80)	14 (18,4%)	62 (81,6%)	
Tipo FSH administrada				0,346 ^a
Puregón	39,5% (30/76)	5 (16,7%)	25 (83,3%)	
Fostipur	10,5% (8/76)	1 (12,5%)	7 (87,5%)	
Gonal	44,7% (34/76)	5 (14,7%)	29 (85,3%)	
ELONVA	5,3% (4/76)	2 (50%)	2 (50%)	
Tipo gonadotropinas administradas				0,432 ^a
FSH	63,7% (51/80)	7 (13,7%)	44 (86,3%)	
Combinación (FSH/LH/hMG)	28,7% (23/80)	6 (26,1%)	17 (73,9%)	
hMG	7,5% (6/80)	1 (16,7%)	5 (83,3%)	
Edad de la paciente [años (RIQ)]	34,50 (31-37)	36,5 (33-37)	33,5 (31-37)	0,218 ^b
IMC de la paciente [IMC (RIQ)]	22,27 (20,90-26,42)	22,68 (21,00-28,23)	22,21 (20,81-26,37)	0,510 ^b
Dosis diaria FSH [UI (RIQ)]	225,00 (150,00-225,00)	225,00 (150,00-24375)	225,00 (150,00-225,00)	0,612 ^b
Dosis diaria LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,465 ^b
Dosis diaria hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-75,00)	37,50 (0,00-75,00)	0,00 (0,00-75,00)	0,390 ^b
Total FSH [UI (RIQ)]	2100,75 (1281,25-3000,00)	2475,00 (1218,00-3393,75)	2100,00 (1293,75-2775,00)	0,685 ^b
Total LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,645 ^b
Total hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-731,25)	487,50 (0,00-750,00)	0,00 (0,00-675,00)	0,301 ^b
Duración de la estimulación (días [RIQ])	9 (8-11)	9 (8-10,25)	9 (8-11)	0,979 ^b

RIQ, rango intercuartílico.

^ap valor basado en el test de chi-cuadrado.

^bTest U de Mann-Whitney.

*p-valor < 0,05

De la misma manera que para las anteriores tasas, con el fin de comprobar las asociaciones entre las distintas variables se realizó un análisis multivariante, en el cual ninguna de las variables estudiadas mostró ninguna significación (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis multivariante: variables asociadas con la probabilidad de obtener una buena tasa de división.

Variable	OR	IC	p-valor
Diagnóstico de la paciente			
Factor reproductor normal	1		
Obstrucción tubárica	1,919	(0,211-17,471)	0,563
Endometriosis	1,232	(0,133-11,405)	0,854
Estimulación con antagonista de la GnRH			
No	1		
Sí	0,000	(0,000 -*)	0,999
Tipo FSH administrada			
Puregón	1		
Fostipur	1,404	(0,081-24,344)	0,816
Gonal	3,17	(0,301-33,356)	0,337
ELONVA	0,062	(0,000-8,002)	0,262
Tipo gonadotrofinas administradas			
FSH	1		
Combinación (FSH/LH/hMG)	0,032	(0,001-1,371)	0,073
Edad de la paciente	1,039	(0,876-1,233)	0,658
IMC de la paciente	0,991	(0,972-1,011)	0,365
Dosis diaria FSH	0,986	(0,954-1,019)	0,405
Dosis diaria hMG	1,033	(0,985-1,083)	0,181
Total FSH	1,000	(0,996-1,004)	0,907
Total hMG	0,997	(0,474-3,479)	0,515
Duración de la estimulación	1,284	(0,474-3,479)	0,623

OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

**p-valor* < 0,05

c) Tasa de desarrollo a blastocisto

El estudio incluyó a las mismas 80 pacientes que se incluyeron en el estudio de la tasa de división, por lo que las frecuencias de sus variables físicas y clínicas coinciden con las descritas para la tasa anterior (Tabla 8).

En referencia a la tasa de formación de blastocisto, ésta se categorizó en dos grupos: mala tasa de blastocisto (tasas entre el 0-49%) y buena tasa de blastocisto (tasas entre el 75-100%). La mayoría de las pacientes presentó una mala tasa de blastocisto

(67,11%), independientemente de su diagnóstico, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La estimulación con agonistas o con antagonistas de la GnRH reportó porcentajes muy elevados de mala tasa de blastocisto, pero sin reflejar significación alguna. En cuanto al tipo de gonadotrofinas administradas, todas reportaron porcentajes similares de mala tasa de blastocisto (96,1%, 95,7% y 83,3%), pero de nuevo sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas. De la misma manera, referido al tipo de FSH administrada, el Puregón, el Gonal-f™ y el Fostipur mostraron porcentajes ligeramente superiores de mala tasa de blastocisto (96,7%, 87,5% y 100% respectivamente), pero sin reflejar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

Las dosis totales de gonadotrofinas administradas, la duración de la estimulación, la edad y el IMC de las pacientes tampoco reportaron ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 8). Sin embargo, la dosis diaria de FSH sí mostró diferencias significativas ($p=0,034$).

Para comprobar las asociaciones entre las variables y comprobar a su vez que las significaciones estadísticas obtenidas no estaban influenciadas por algún factor de confusión se realizó un análisis multivariante. Al realizar este análisis, ninguna de las variables mostró diferencias significativas, incluida la dosis diaria de FSH (Tabla 9). A pesar de que dicha variable sí presentó significación con el test U de Mann-Whitney (Tabla 8), en el análisis multivariante posterior no presentó significación (Tabla 9).

Tabla 8. Descripción de las variables físicas y clínicas de las pacientes incluidas en el estudio en función de la tasa de división.

Variable	Total	Mala tasa blastocisto	Buena tasa blastocisto	p-valor
Diagnóstico de la paciente				0,221 ^a
Factor reproductor normal	58,3% (43/80)	42 (97,7%)	1 (2,3%)	
Anovulación	16,3% (13/80)	13 (100%)	0 (0%)	
Obstrucción tubárica	17,5% (14/80)	12 (85,7%)	2 (14,3%)	
Endometriosis	12,5% (10/80)	9 (90%)	1 (10%)	
Estimulación con agonistas de la GnRH				0,596 ^a
No	93,8% (75/80)	71 (94,7%)	4 (5,3%)	
Sí	6,3% (5/80)	5 (100%)	0 (0%)	
Estimulación con antagonista de la GnRH				0,638 ^a
No	5,0% (4/80)	4 (100%)	0(0%)	
Sí	95,0% (76/80)	72 (94,7%)	4 (5,3%)	
Tipo FSH administrada				0,054 ^a
Puregón	39,5% (30/76)	29 (96,7%)	1 (3,3%)	
Fostipur	10,5% (8/76)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	
Gonal	44,7% (34/76)	34 (100%)	0 (0%)	
ELONVA	5,3% (4/76)	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
Tipo gonadotropinas administradas				0,394 ^a
FSH	63,7% (51/80)	49 (96,1%)	2 (3,9%)	
Combinación (FSH/LH/hMG)	28,7% (23/80)	22 (95,7%)	1 (4,3%)	
hMG	7,5% (6/80)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Edad de la paciente [años (RIQ)]	34,50 (31,00-37,00)	34 (31-37)	36,5 (33-37,75)	0,358 ^b
IMC de la paciente [IMC (RIQ)]	22,27 (20,90-26,42)	22,27 (20,78-26,52)	22,78(22,06-25,70)	0,659 ^b
Dosis diaria FSH [UI (RIQ)]	225,00 (150,00-225,00)	225,00 (150,00-225,00)	150,00 (37,50-150,00)	0,034^{b*}
Dosis diaria LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,687 ^b
Dosis diaria hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-75,00)	0,00 (0,00-75,00)	37,50 (0,00-243,75)	0,474 ^b
Total FSH [UI (RIQ)]	2100,75 (1281,25-3000,00)	2138,25 (1281,25-3000,00)	1950,00(750,00-3000,00)	0,596 ^b
Total LH [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,819 ^b
Total hMG [UI (RIQ)]	0,00 (0,00-731,25)	0,00 (0,00-0,00)	375,00 (75,00-2587,00)	0,339 ^b
Duración de la estimulación (días [RIQ])	9 (8-11)	9 (8-11)	9,5 (8,25-10,75)	0,735 ^b

RIQ, rango intercuartílico.

^ap valor basado en el test de chi-cuadrado.

^bTest U de Mann-Whitney.

*p-valor < 0,05

Tabla 9. Análisis multivariante: variables asociadas con la probabilidad de obtener una buena tasa de división.

Variable	OR	IC	p-valor
Diagnóstico de la paciente			
Factor reproductor normal	1		
Obstrucción tubárica	7,455	(0,617-90,002)	0,114
Endometriosis	0	(0,000-*)	0,999
Tipo FSH utilizada			
Puregón	1		
Fostipur	3,143	(0,173-57,082)	0,439
Gonal	0,000	(0,000 -*)	0,998
ELONVA	7,333	(0,357-150,708)	0,196
Tipo gonadotrofinas utilizadas			
FSH	1		
Combinación (FSH/LH/hMG)	0,864	(0,074-10,081)	0,907
hMG	6,333	(0,437-91,708)	0,176
Edad de la paciente	1,167	(0,703-1,935)	0,551
IMC de la paciente	0,995	(0,955-1,036)	0,813
Dosis diaria FSH	0,965	(0,915-1,018)	0,193
Dosis diaria hMG	1,005	(0,962-1,050)	0,825
Total FSH	1,000	(0,997-1,002)	0,844
Total hMG	1,001	(1,000-1,002)	0,103
Duración de la estimulación	1,355	(0,373-4,927)	0,645

OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

**p*-valor < 0,05

VII. DISCUSIÓN

A pesar de que *Yang et al.* describieron los factores influyentes en la MIV (1), el impacto de algunos factores en esta técnica deben aclararse realizando más estudios que estén mejor diseñados, especialmente ensayos clínicos aleatorizados prospectivos. En la hipótesis del presente estudio se propuso que la edad, la endometriosis y las dosis de FSH son factores que condicionan la MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados.

Un estudio transversal basado en 58 mujeres en un programa de ICSI reportó que las tasas de MIV de los ovocitos se reducían significativamente en mujeres mayores de 30 años (39). De la misma manera, otro trabajo concluyó que las mujeres ≥ 30 años obtuvieron tasas de MIV extremadamente bajas ($<10\%$) (40). Los resultados obtenidos en este proyecto no son acordes a los estudios mencionados, ya que la edad no ha resultado una variable significativa en el análisis de la Tasa de MIV, pero además, tampoco ha mostrado significación en la competencia del ovocito madurado *in vitro* para activarse, dividirse y desarrollarse hasta blastocisto. Cabe señalar que, como se ha comentado anteriormente, es difícil comparar resultados de tasas de MIV y otros parámetros relacionados entre diferentes laboratorios ya que la técnica no se lleva a cabo de forma estandarizada, por lo que puede ser que otros factores estén influyendo en las discrepancias de resultados.

Referente a si la endometriosis condiciona el éxito de la MIV, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas que sugieran que esta patología disminuye las tasas de MIV y de desarrollo, tal y como se planteó en la hipótesis. De hecho, ni siquiera se observaron porcentajes superiores en bajas tasas de MIV o malas tasas de activación, división y desarrollo a blastocisto. Es posible que la endometriosis no afecte de la misma forma negativa a los ovocitos maduros que a los inmaduros y que por eso su calidad no se vea comprometida de la misma manera.

Como se ha referido en párrafos anteriores, en base a los estudios publicados de MIV clínica, así como la guía publicada recientemente por la ASRM, los métodos de estimulación ovárica incluyen bajas dosis de estimulación con FSH, una única inyección de hCG, y una estimulación mínima de FSH antes de una única inyección de hCG (26,38,41–45). Los ovocitos utilizados en el presente estudio proceden de estimulaciones ováricas convencionales, con dosis considerablemente superiores a las

propuestas para los casos de MIV. Los resultados obtenidos mostraron significación en algunas de las variables referidas a la estimulación y a las gonadotrofinas utilizadas.

Por un lado, la duración de la estimulación reflejó diferencias significativas ($p=0,007$) en el análisis de Chi cuadrado en la tasa de MIV. Sin embargo, al no presentar esta variable significación en el análisis multivariante, se podría pensar que dicha variable se veía influenciada por otra/s variables modificadoras de efectos, por lo que se puede concluir que realmente la duración de la estimulación no resulta un factor influyente en la MIV. Por otro lado, el tipo de gonadotrofinas, concretamente la utilización de la combinación de las mismas durante la estimulación, sí mostró diferencias estadísticamente significativas en el análisis multivariante en la relación de obtener una tasa media de MIV vs obtener una tasa baja de MIV ($p=0,037$). El OR (OR 0,072; IC 0,006-0,848) reflejó que al utilizar en la estimulación una combinación de gonadotrofinas es más probable que se obtenga una tasa de MIV baja en vez de una tasa media de MIV.

La dosis diaria y total de hMG reportó significación, pero únicamente en el análisis multivariante en referencia a la tasa de activación. La dosis diaria de hMG mostró que al aumentar ésta es más probable que se obtenga una tasa baja de activación (OR 0,955; IC 95% 0,919-0,991; $p = 0,015$), mientras que la dosis total de hMG reflejó que a mayores dosis totales de hMG es más probable que se obtenga una buena tasa de activación (OR 1,007; IC 1,002-1,012; $p=0,009$). Como puede observarse, ambas variables tienen OR muy cercanas al 1,000 y unos IC que prácticamente contienen el 1, por lo que quizás la significación debería considerarse con cautela. Además los resultados resultan contradictorios entre ellos, ya que *a priori* si aumenta la dosis diaria se entiende que aumenta la dosis total, y viceversa. De la única forma que podría tener sentido es interpretando que deberían darse dosis diarias inferiores pero prolongando los días de administración de la gonadotrofina.

Por último, referido a la FSH se reportó solo un resultado significativo, pero únicamente en el análisis de Chi cuadrado, en relación con la tasa de formación de blastocisto ($p=0,0034$). Estas diferencias corroborarían la hipótesis propuesta en el proyecto de que la dosis de FSH es un factor influyente en la MIV. No obstante, al no repetirse la significación en el análisis multivariante, esta variable se podría haber visto influenciada por otra/s variables de efecto, por lo que no se puede tener en cuenta.

También en relación con la tasa de formación de blastocisto, el tipo de FSH administrada reflejó un *p-valor* límite ($p=0,054$) en el análisis de Chi cuadrado, que se confirmó con la no significación en el análisis multivariante. Se puede sospechar por estos resultados que quizás en otros estudios mejor diseñados, alguna de las variables relacionadas con la FSH puede que reporte alguna diferencia significativa.



VIII. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

El presente estudio tiene la fortaleza de que se ha realizado con un número considerable de pacientes y de ovocitos, teniendo en cuenta que la obtención de ovocitos humanos conlleva una gran complicación. Sin embargo, tiene las limitaciones de que es un estudio retrospectivo y de que el análisis multivariante no se realizó por el método predictivo, por lo que para que los resultados obtenidos sean más sólidos se deberán realizar estudios futuros que sean prospectivos y realizando un análisis predictivo.

IX. REFLEXIONES FINALES

- Para los sucesivos proyectos de MIV de la unidad se debería excluir de los estudios únicamente a aquellas pacientes que en su estimulación se hayan utilizado combinaciones de gonadotrofinas.
- Dado que este trabajo fue retrospectivo, para sacar conclusiones más contundentes respecto a los variables de las pacientes que influyen en el éxito de la MIV de rescate de ovocitos se necesitarían realizar más estudios, prospectivos y mejor diseñados.

X. CONCLUSIONES

1. La edad, la endometriosis y la dosis de FSH administrada durante la estimulación ovárica no son factores influyentes en el éxito de la MIV de rescate de ovocitos procedentes de ciclos estimulados.
2. La combinación de gonadotrofinas durante la estimulación reporta menores tasas de MIV, quizás porque la administración de grandes dosis de gonadotrofinas exógenas hace a los ovocitos inmaduros menos competentes.

XI. REFERENCIAS

1. Yang H, Kolben T, Meister S, Paul C, van Dorp J, Eren S, et al. Factors Influencing the In Vitro Maturation (IVM) of Human Oocyte. *Biomedicines*. 2021;9 (12):1904.
2. De Vos M, Smits J, Thompson JG, Gilchrist RB. The definition of IVM is clear—variations need defining. *Hum Reprod*. 2016;31 (11):2411-5.
3. Remohí Giménez J, Cobo A, Prados N, Romero JL, Pellicer Martínez A. Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Laboratorio de Reproducción Asistida. 4ª. Panamericana; 2013. 339-406 p.
4. Arroyo G, Boada M, Coroleu B. Estado actual de la Maduración In Vitro de Ovocitos (MIV) Current state of oocytes in vitro maturation (IVM). 2012;29:12.
5. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. II. The activation of tubal eggs of the rabbit. *J Exp Zool*. 1936;73(2):195-208.
6. Pincus G, Saunders B. Unfertilized human tubal ova. *Anat Rec*. 1937;69(2):163-9.
7. Rock J, Menkin MF. In Vitro Fertilization and Cleavage of Human Ovarian Eggs. *Science*. 1944;100 (2588):105-7.
8. Menkin MF, Rock J. In Vitro Fertilization and Cleavage of Human Ovarian Eggs. *Am J Obstet Gynecol*. 1948;55 (3):440-52.
9. Edwards RG. Maturation in vitro of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. *Nature*. 1965;208(5008):349-51.
10. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet*. 1965;286(7419):926-9.
11. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*. 1991;55(1):109-13.
12. Walls ML, Hart RJ. In vitro maturation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;53:60-72.
13. Junk SM, Yeap D. Improved implantation and ongoing pregnancy rates after single-embryo transfer with an optimized protocol for in vitro oocyte maturation in women with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2012;98(4):888-92.

14. Arroyo G, Belil I, Martinez F, Tur R, Carreras O, Boada M, et al. Primer nacimiento en España después de la transferencia de embriones procedentes de ovocitos madurados in vitro. *Rev Iberoam Fertil Reprod Humana*. 2007;24:125-130.
15. Galvão A, Segers I, Smitz J, Tournaye H, De Vos M. In vitro maturation (IVM) of oocytes in patients with resistant ovary syndrome and in patients with repeated deficient oocyte maturation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(12):2161-71.
16. Li Y, Pan P, Yuan P, Qiu Q, Yang D. Successful live birth in a woman with resistant ovary syndrome following in vitro maturation of oocytes. *J Ovarian Res*. 2016;9(1):54.
17. Donnez J, Dolmans MM. Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med*. 2017;377(17):1657-65.
18. Rodgers RJ, Reid GD, Koch J, Deans R, Ledger WL, Friedlander M, et al. The safety and efficacy of controlled ovarian hyperstimulation for fertility preservation in women with early breast cancer: a systematic review. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017;32(5):1033-45.
19. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001.
20. Revel A, Koler M, Simon A, Lewin A, Laufer N, Safran A. Oocyte collection during cryopreservation of the ovarian cortex. *Fertil Steril*. 2003;79(5):1237-9.
21. Segers I, Mateizel I, Van Moer E, Smitz J, Tournaye H, Verheyen G, et al. In vitro maturation (IVM) of oocytes recovered from ovariectomy specimens in the laboratory: a promising «ex vivo» method of oocyte cryopreservation resulting in the first report of an ongoing pregnancy in Europe. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(8):1221-31.
22. Segers I, Bardhi E, Mateizel I, Van Moer E, Schots R, Verheyen G, et al. Live births following fertility preservation using in-vitro maturation of ovarian tissue oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2020;35(9):2026-36.
23. Wang X, Gook DA, Walters KA, Anazodo A, Ledger WL, Gilchrist RB. Improving fertility preservation for girls and women by coupling oocyte in vitro maturation with existing strategies. *Womens Health Lond Engl*. 2016;12(3):275-8.
24. Delattre S, Segers I, Van Moer E, Drakopoulos P, Mateizel I, Enghels L, et al. Combining fertility preservation procedures to spread the eggs across different baskets: a feasibility study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2020;35(11):2524-36.
25. Huang JYJ, Buckett WM, Gilbert L, Tan SL, Chian RC. Retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: a case report on a new strategy

of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecol Oncol.* 2007;105(2):542-4.

26. Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, et al. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(3):343-51.

27. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2000;73(5):978-83.

28. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. In vitro maturation: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2013;99(3):663-6.

29. Escrich Albelda L. Maduración in vitro de ovocitos humanos desestimados de ciclos de estimulación ovárica [Tesis Doctoral]. Universitat de València; 2016. Recuperado a partir de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=78931>

30. Chian RC, Tan SL. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod Biomed Online.* 2002;5(2):125-32.

31. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, et al. In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1998;13(6):1638-44.

32. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril.* 2000;74(6):1153-8.

33. Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril.* 2000;74(2):295-8.

34. Reichman DE, Politch J, Ginsburg ES, Racowsky C. Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(7):347-56.

35. Farsi MM, Jorsaraei SGA, Esmaelzadeh S, Golai pour MJ. In vitro maturation of germinal vesicle oocytes in stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Cell J.* 2011;13(2):73-8.

36. Rudak E, Dor J, Kimchi M, Goldman B, Levran D, Mashiach S. Anomalies of human oocytes from infertile women undergoing treatment by in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1990;54(2):292-6.
37. De Vos M, Grynberg M, Ho TM, Yuan Y, Albertini DF, Gilchrist RB. Perspectives on the development and future of oocyte IVM in clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* 2021;38(6):1265-80.
38. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. In vitro maturation: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2021;115(2):298-304.
39. Omid M, Khalili MA, Nahangi H, Ashourzadeh S, Rahimpour M. Does women's age influence zona pellucida birefringence of metaphase II oocytes in in-vitro maturation program? *Iran J Reprod Med.* 2013;11(10):823-8.
40. Karavani G, Wasserzug-Pash P, Mordechai-Daniel T, Bauman D, Klutstein M and Imbar T (2021) Age-Dependent in vitro Maturation Efficacy of Human Oocytes – Is There an Optimal Age? *Front. Cell Dev. Biol.* 9:667682.
41. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod.* 1999;14(7):1847-51.
42. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3132-8.
43. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2000;15(1):165-70.
44. Lin Y, Hwang J, Huang L, Mu S, Seow K, Chung J, et al. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1632-6.
45. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction.* 2001;122(4):587-92.