



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Instituto Nacional de Perinatología
Isidro Espinosa de los Reyes**

**“CUANTIFICACIÓN DE PROLACTINA EN LÍQUIDO
FOLICULAR COMO MARCADOR DE ÉXITO EN
REPRODUCCIÓN ASISTIDA”**

TESIS

**Para obtener el título de:
SUBESPECIALISTA EN:
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

PRESENTA:

BRAULIO HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

**DR. JULIO FRANCISCO DE LA JARA DÍAZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN**

**DR. ÁLVARO SANTIBAÑEZ MORALES
DIRECTOR DE TESIS**



MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TÍTULO DE TESIS:

**“CUANTIFICACIÓN DE PROLACTINA EN LÍQUIDO FOLICULAR COMO
MARCADOR DE ÉXITO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA”**



DR. RODRIGO AYALA YÁÑEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS
REYES



DR. JULIO FRANCISCO DE LA JARA DÍAZ
SUBDIRECTOR DE MEDICINA REPRODUCTIVA Y PROFESOR TITULAR DE
LA ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA.
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS
REYES



DR. ÁLVARO SANTIBÁÑEZ MORALES
DIRECTOR DE TESIS
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS
REYES

AGRADECIMIENTOS

Dr. Álvaro Santibáñez Morales, gracias por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección.

Dra. Carla Gillen Brenes y Dra. Karina Arlen Sequeira por su valiosa colaboración y apoyo para la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
ANTECEDENTES	8
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Hiperestimulación ovárica	11
Medición de la concentración de Prolactina	12
Análisis Hormonales.....	13
Técnicas de fertilización y Clasificación ovocitaria /embrionaria	13
Análisis exploratorio	14
Análisis Estadístico	14
RESULTADOS	15
Características Sociodemográficas	15
Características de la Hiperestimulación Ovárica	16
Características la Técnica de Fertilización Utilizada	16
Características de los ovocitos obtenidos	17
Características de los embriones Obtenidos	17
DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSION.....	19

TABLAS Y GRÁFICOS..... 20

REFERENCIAS 23

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La prolactina tiene un papel importante en el desarrollo de los ovocitos, puede afectar los acontecimientos postfertilización, in vitro aumenta el porcentaje de ovocitos que progresan a mórula y blastocisto.

OBJETIVO: El objetivo del estudio fue evaluar la cantidad de prolactina en el líquido del folículo de mayor tamaño como marcador de éxito en reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se diseñó un estudio de casos y controles en mujeres infértiles que aceptaron participar en el estudio en el periodo de junio a diciembre de 2012 en el Instituto Nacional de Perinatología. Se cuantificó prolactina obtenido del líquido del folículo de mayor tamaño en la captura ovocitaria. Las diferencias entre los grupos se compararon con prueba de T para muestras independientes o U de Mann-Whitney para variables continuas. Se exploró la asociación de las concentraciones de prolactina con los marcadores de éxito reproductivo. Se analizó la correlación entre variables con prueba de Pearson o Spearman.

RESULTADOS: La concentración media de prolactina en líquido folicular en pacientes embarazadas fue de 15.6 ± 2.1 ng/ml, en las no embarazadas fue de 15.4 ± 1.7 ng/ml, P de 0.49. La relación de prolactina sérica y prolactina del líquido folicular fue positiva (ρ : 0.51, p: 0.003). No se encontró una correlación en la concentración de prolactina en líquido folicular y el porcentaje de ovocitos maduros ($p=0.61$), así como al comparar embriones buena y mala calidad ($p= 0.523$).

CONCLUSIÓN: No se encontró relación entre la cuantificación de prolactina del folículo de mayor tamaño en la captura ovocitaria y los marcadores de éxito reproductivo.

PALABRAS CLAVE: prolactina, líquido folicular, metabolómica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: prolactin has an important role in the development and maturation of the oocytes, the events can affect post-fertilization, in vitro oocyte increases the percentage of progressing to morula and blastocyst.

PURPOSE: To evaluate the association of prolactin concentration in the follicular fluid of the largest follicle as success marker in assisted reproduction.

MATERIAL AND METHODS: We designed a case-control study in infertile women who agreed to participate in the study in the period June to December 2012 at the National Institute of Perinatology. Prolactin was quantified the follicular fluid obtained from the largest follicle on oocyte capture. Differences between groups were compared with t test for independent samples or Mann-Whitney test for continuous variables. We explored the association of prolactin with reproductive success parameters. We analyzed the correlation between variables with Pearson or Spearman test.

RESULTS: The mean concentration of prolactin in fluid follicular in pregnant patients was 15.6 ± 2.1 ng /ml. In non-pregnant women was 15.4 ± 1.7 ng /ml without significant difference (P 0.49). The relationship between the concentration of serum prolactin and prolactin of fluid follicular was found positive (rho: 0.51, p: 0.003). No correlation was found in the concentration of prolactin in follicular fluid and the percentage of mature oocytes (p = 0.61), and to compare good and poor quality embryos (p = 0.523).

CONCLUSION: No relationship was found between the quantification of prolactin in the largest follicle during oocyte capture and markers of reproductive success.

KEYWORDS: prolactin, follicular fluid, metabolomics.

ANTECEDENTES

El líquido folicular (LF) proporciona un microambiente muy importante para el desarrollo de los ovocitos. Es un producto tanto de la transferencia de los componentes del plasma sanguíneo que cruza la barrera folicular, de la actividad secretora de las células de la granulosa y de la teca. Es razonable pensar que algunas características bioquímicas del LF jueguen un papel en la calidad del ovocito y en el potencial posterior para lograr la fertilización y el desarrollo embrionario. Pero, en general no existe una clara correspondencia entre la bioquímica del LF, calidad de los ovocitos y desarrollo embrionario.¹

En los últimos años, la investigación en esta área ha progresado hacia un tipo más completo de análisis molecular, metabolómica, que consiste en el análisis de todas las sustancias contenidas en el LF. Los componentes del LF se han agrupado en hormonas, factores de crecimiento, interleucinas, especies reactivas a oxígeno, factores anti-apoptosis, proteínas entre otros.¹

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica cuyo principal origen es hipofisario, está involucrada en el proceso de lactogénesis. Además de ser producida por las células lactotróficas de la glándula pituitaria, hay evidencia que sugiere su producción por los ovarios.² Debido a que existe expresión de mRNA de PRL por las células foliculares.² y se ha demostrado su existencia en el líquido folicular.^{3,4,5}

Su concentración es independiente de la plasmática^{2,5} y quizás dependa de los receptores específicos con alta afinidad para la PRL, de la producción folicular de PRL o ambas a la vez.³ Varía con la etapa de la maduración de ovocitos, siendo significativamente más alta en los folículos que tienen ovocitos en metafase I y II en comparación con los que tienen ovocitos en vesicular germinal o degenerados.²

Dentro del entorno folicular, la PRL aumenta la secreción de estradiol y progesterona por las células de la granulosa, teniendo un papel importante en el desarrollo y maduración de ovocitos. En ratas, los estudios de inmunocitoquímica revelan la presencia de PRL en células foliculares y ovocitos de folículos ováricos maduros. Lo que sugiere que puede tener un efecto sobre eventos nucleares que conducen a la maduración de ovocitos.² La presencia de PRL también puede afectar los acontecimientos postfertilización.^{2,5} In vitro, la adición de la PRL al medio de cultivo aumenta el porcentaje de ovocitos que progresan a mórula y blastocisto.^{2,6} Sin embargo, el mecanismo por el cual la PRL influye en la maduración de los ovocitos, fertilización, desarrollo embrionario y embarazo clínico no está claro.²

Dos estudios donde se evaluó la correlación entre la concentración de PRL en LF y éxito reproductivo se realizaron en el 2002, en el primero con una muestra de 19 pacientes no hubo relación.⁵ En un segundo estudio, donde se compararon a 54 parejas, con infertilidad masculina, que se sometieron a estimulación convencional, fertilización mediante técnica Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), se encontraron concentraciones más altas de PRL en el LF de parejas que lograron embarazo clínico (29) respecto a las que no (25), con una p significativa de <0.01.⁶

Otro estudio en el 2009, prospectivo, evaluó a 80 pacientes que se sometieron a protocolo de estimulación convencional, se determinó la concentración de prolactina de 143 folículos, no se encontró relación en la cantidad de esta y la recuperación de ovocitos. (OR 0.99 IC 95% 0.97-1.01).⁷

Otros estudios afirman que existen niveles más altos de prolactina en el líquido folicular de ovocitos fecundados en comparación con ovocitos no fecundados.^{1,6,9} Sin embargo, en otros no se observa dicha aseveración.^{1,6}

Hasta la fecha los estudios disponibles que correlacionan la cantidad de PRL del LF, con los parámetros de éxito reproductivo (ovocitos maduros, fertilización, embarazo clínico) son escasos, contradictorios y no muestran diferencias significativas. Además, la determinación individual de PRL en LF es costosa para el uso de esta hormona como marcador de éxito en técnicas de reproducción asistida (TRA).

Un método de abaratar costos, sería cuantificar la cantidad de PRL en el líquido del folículo de mayor tamaño observado al realizar la captura. Debido a que no existen estudios que correlacionen esta medición como marcador de éxito en TRA. Y que es importante definir el papel exacto de la PRL dentro del entorno folicular.¹ El objetivo del estudio fue evaluar la cantidad de PRL en el Líquido del folículo de mayor tamaño como marcador de éxito en TRA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio de casos y controles para evaluar la cantidad de PRL con indicadores de éxito para TRA de alta complejidad en mujeres infértiles que aceptaron participar en el estudio en el periodo de junio a diciembre de 2012 en el Instituto Nacional de Perinatología. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética institucional.

Las pacientes fueron previamente estudiadas con historia clínica, examen físico completo y estudio por factores. Se realizó: perfil hormonal, ultrasonido pélvico endovaginal, histerosalpingografía y cultivo cervicovaginal.

A ambos miembros de la pareja se les realiza cultivos especiales para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis*, serologías por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), TORCH, virus de hepatitis B y VDRL. Los varones se realizan estudios de espermatobioscopía y espermocultivo. Los resultados de la espermatobioscopía son clasificados de acuerdo al Manual de la OMS 2010.¹⁰

Hiperestimulación ovárica

Una vez completo el protocolo de estudio y tratadas las patologías crónicas de cada paciente se inició la hiperestimulación ovárica al día 2 del ciclo menstrual utilizando dos esquemas alternativos: (1) FSHr (Gondal-F; Merck Serono) o (2) FSHr y menotropinas urinarias (Merapur; Ferring Pharmaceuticals). El protocolo de estimulación ovárica fue

seleccionados por cada médico tratante: (1) protocolo largo estándar con agonista de GnRH (Lucrin; Abbott laboratorios) o (2) protocolo flexible de antagonista (Cetrotide; Merck Serono) al alcanzar folículos de 14 mm. Se monitorizó el desarrollo del folículo por ecografía en tiempo real y niveles de estradiol en suero desde día 5 hasta el día de captura. Una vez que se alcanzan tres o más folículos mayores de 18 mm se administra Coriogonadotropina alfa 250 µg/0,5 ml (Ovidrel; Serono de México) subcutánea. La respuesta de las pacientes a la hiperestimulación se clasificó como: baja (menor o igual a 5 ovocitos), moderada (6 a 10 ovocitos) y alta (más de 10 ovocitos). Los folículos fueron aspirados 36 h después de la administración de la hCG con aguja de 17 ga (Cook Medical, Bloomington, IN). Se toma una muestra del LF posterior a la captura de los ovocitos para la cuantificación de PRL. Después de la transferencia de embriones los pacientes fueron tratados con progesterona micronizada vía vaginal (600 mg al día). La confirmación del embarazo se realiza determinando la concentración fracción beta b-hCG 15 días después de la transferencia embrionaria.

Medición de la concentración de prolactina.

Se aspiró el folículo de mayor tamaño encontrado al momento de la captura. Este se recolectó en un tubo independiente para evitar la contaminación de sangre y medio de cultivo. Estas muestras fueron colectadas, alicuotadas y almacenadas a -20°C hasta su análisis en conjunto. La concentración de prolactina fue medida por el ensayo IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare); un inmunoanálisis quimioluminiscente competitivo de fase sólida, altamente específico. El rango de medición de fue de 0.5-

150 ng/ml, la sensibilidad fue de 0.5 ng/ml, la curva de calibración va desde 5.5 hasta 127, el coeficiente de variación intra e interensayo fue de <5% y <10% respectivamente.

Análisis Hormonales

Los niveles hormonales fueron medidos por el ensayo IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare); un inmunoanálisis quimioluminiscente competitivo de fase sólida, altamente específico. El rango de medición de estradiol fue de 0-2000 pg / ml (sensibilidad 15 pg / ml). El intervalo de calibración para FSH es hasta 170 mIU/ml (sensibilidad de 0.1 mIU/ml).

Técnicas de fertilización y Clasificación ovocitaria /embrionaria

Se realizaron tres técnicas de fertilización de ovocitos dependiendo de los factores alterados en la pareja así como ciclos de TRA previos: Fertilización in-vitro (FIV), Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoide (PICSI).

Los ovocitos fueron analizados en el laboratorio de in-vitro para definir su estatus morfológico y se dejaron incubar por aproximadamente 4 horas para posteriormente realizar la fertilización en base a la técnica seleccionada. El porcentaje de ovocitos maduros se calculó al dividir el número de ovocitos en metafase II entre el total de ovocitos y se multiplicó por 100. El porcentaje de ovocitos fertilizados se calculó al dividir el número de ovocitos con dos pronúcleos a las 24 horas entre el total de

ovocitos y se multiplicó por 100. Al día 2 y 3 previa transferencia embrionaria se realiza la evaluación morfológica de los embriones utilizando la clasificación de Lucinda Veeck. Se subclasificaron los embriones en: Top (embriones calidad 1 y 2) y non-top (embriones calidad 3, 4 y 5).

Análisis exploratorio

Se exploró la asociación de las concentraciones de PRL con el porcentaje de ovocitos maduros, calidad embrionaria, embarazo clínico y prolactina sérica.

Análisis Estadístico

Las variables sociodemográficas de la población fueron caracterizadas con estadística descriptiva. Se evaluó la distribución de las variables con prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se analizó la correlación entre variables con prueba de Pearson o Spearman según su distribución.

Para el análisis de la calidad embrionaria (clasificación morfológica de Lucinda Veeck) se asignó un puntaje arbitrario a cada embrión según su grado y se construyó un criterio de clasificación del conjunto de embriones de cada paciente para correlacionarlo con la concentración de PRL. Se aislaron las muestras de pacientes que contenían únicamente embriones top y las muestras con embriones non-top para comparar las concentraciones de PRL.

Las diferencias entre los grupos se compararon con prueba de T para muestras independientes o U de Mann-Whitney para variables continuas.

Las concentraciones hormonales entre grupos de comparación fue analizada con prueba ANOVA y análisis post hoc de LSD; se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados son expresados en (media \pm EEM). Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

RESULTADOS

Características Sociodemográficas

Se eligieron 15 pacientes embarazadas que se compararon con 24 pacientes no embarazadas posterior al ciclo de fecundación in vitro. Las características de la población se muestran en el **Cuadro 1**. No se encontraron diferencias.

La concentración media de PRL en LF en pacientes embarazadas fue de 15.6 ± 2.1 ng/ml, en las no embarazadas fue de 15.4 ± 1.7 ng/ml, no se encontró diferencia significativa con una P de 0.49. **Figura 1**.

Al realizar la relación entre la concentración de PRL sérica y PRL del LF se encontró positiva (ρ : 0.51, p : 0.003). **Figura 2**.

El estudio de infertilidad por factores mostró una mayoría de pacientes con alteración del factor endocrino-ovárico (80%), seguido del factor tuboperitoneal (57.5%), factor masculino (45%), factor uterino (37.5%), y factor cervicovaginal (5%).

En cuanto al factor endócrino-ovárico la patología más frecuentemente encontrada fue hipotiroidismo (52.5%), seguido de hiperprolactinemia (12.5%) y resistencia a la insulina (12.5%). Otras patologías prevalentes fueron Hiperandrogenismo Funcional Ovárico (HAFO) (10%) y Síndrome de ovario poliquístico (SOP, 7.5%).

Todas las pacientes con hipotiroidismo e hiperprolactinemia estaban en control y bajo tratamiento al momento del estudio. La prevalencia de uso de Metformina fue de 12.5% en pacientes con HAFO y SOP.

Características de la Hiperestimulación Ovárica

Se utilizó esquema con FSHr en 27 pacientes (67.5%) y en 13 (32.5%) esquema combinado de FSHr y hMG. Las pacientes que utilizaron únicamente FSHr recibieron una media de 1832 ± 118 U y las que utilizaron hMG 1177 ± 185 U además de 1633 ± 145 U promedio de FSHr.

En todos los casos se utilizaron análogos de la GnRH. El 92.5% utilizó protocolo flexible de antagonista y 7.5% protocolo largo de agonista.

Al día de aplicación de HCG las pacientes presentaron una mediana de 5 (3-21) folículos mayores de 18 mm y un valor de estradiol sérico de 1671 ± 137.2 pg/ml.

Características la Técnica de Fertilización Utilizada

Se realizó FIV en 18 pacientes (45%), ICSI /PICSI en 22 (55%).

Características de los ovocitos obtenidos

Se obtuvo una mediana de 7,5 (2-22) ovocitos por paciente. El porcentaje de ovocitos maduros oscila entre 38 al 100% con promedio de 85%.

No se encontró una correlación significativa entre la concentración de PRL en LF y el porcentaje de ovocitos maduros ($p=0.61$). **Figura 4.**

El estradiol del día de disparo tampoco correlacionó con la proporción de ovocitos fertilizados ($p=0.31$), encontramos una pobre correlación negativa entre éste y el porcentaje de ovocitos maduros ($\rho= 0.39$ $p= 0.02$).

Características de los embriones Obtenidos

Resultaron 233 embriones: 0.4% calidad 1, 37.8% calidad 2, 30.5% calidad 3, 14.6% calidad 4 y 16.7% calidad 5.

No se encontró diferencia significativa en las concentraciones de la PRL en LF al comparar embriones Top y non-Top (16.2 ± 3.6 vs 12 ± 3.6 respectivamente, $p= 0.523$)

Figura 3.

DISCUSIÓN

De forma general, al realizar el análisis de las correlaciones realizadas respecto a los niveles de PRL en líquido del folículo mayor el día de la captura como marcador de éxito reproductivo, encontramos que no se encontraron diferencias significativas.

Al evaluar la asociación de manera individual respecto a los niveles de PRL en LF y su relación con el porcentaje de ovocitos maduros encontramos que presentó una

tendencia a ser significativo ($p: 0.6$), tal vez si se aumenta la muestra podría llegar a serlo. Desafortunadamente no existen estudios previos que evalúen esta asociación para realizar una comparación. El que se asemeja más fue el realizado por Rosen y col. en 2009 donde tampoco encontró diferencias significativa respecto a la cantidad de PRL en LF y la recuperación de ovocitos (OR 0.99 IC 95% 0.97-1.01).⁹

Respecto a la relación entre los niveles de PRL en LF y la calidad embrionaria, encontramos que tampoco fue estadísticamente significativo ($p:0.523$) pero con tendencia a estar alta en los embriones de buena calidad. Sin embargo, no existen estudios en la literatura que comparen esta misma asociación.

Al evaluar la asociación entre la concentración de PRL en LF y embarazo no se encontró diferencia significativa respecto a los que no, contrario al estudio realizado en 2002 por Mendoza y col. que encontraron una diferencia significativa ($p: <0.01$) respecto al logro de embarazo clínico. Probablemente esta diferencia se deba a la cantidad de la muestra.

Al comparar la relación entre la concentración de PRL sérica y PRL del LF en este estudio encontramos una relación positiva, debido a la transferencia de componentes de plasma sanguíneo, hacia el LF.

Como se describe en la literatura, probablemente exista influencia de los niveles de PRL en LF respecto a los ovocitos maduros, calidad embrionaria y éxito de embarazo en reproducción asistida.

Sin embargo, se necesitan en el futuro estudios prospectivos de mayor tamaño para determinar la utilidad de medir PRL en LF.

CONCLUSIÓN

El presente estudio muestra que la concentración en LF del folículo de mayor tamaño en la captura ovular no se correlaciona con las tasas de embarazo por lo que se necesitan estudios de mayor tamaño para determinar su uso en la práctica clínica.

TABLAS Y GRÁFICOS

Cuadro 1: Características de la población estudiada.

	<u>Embarazo</u> n= 15	<u>No embarazo</u> n= 24	p
Edad : media (EEM)	32.7 (1.2)	34.7 (0.7)	0.26
IMC: media (EEM)	25.3 (1.2)	24.5 (0.6)	0.42
Años de Infertilidad: media (EEM)	5.9 (0.5)	6.1 (0.8)	0.85
Folículos mayores de 18mm (EEM)	7.3 (0.9)	6.1 (0.6)	0.24
FSH día 3 (EEM)	7 (0.6)	7.4 (0.8)	0.91
Estradiol día 3 (EEM)	53.7 (8)	37.1(4)	0.18

Relación entre la concentración de PRL en líquido folicular y embarazo

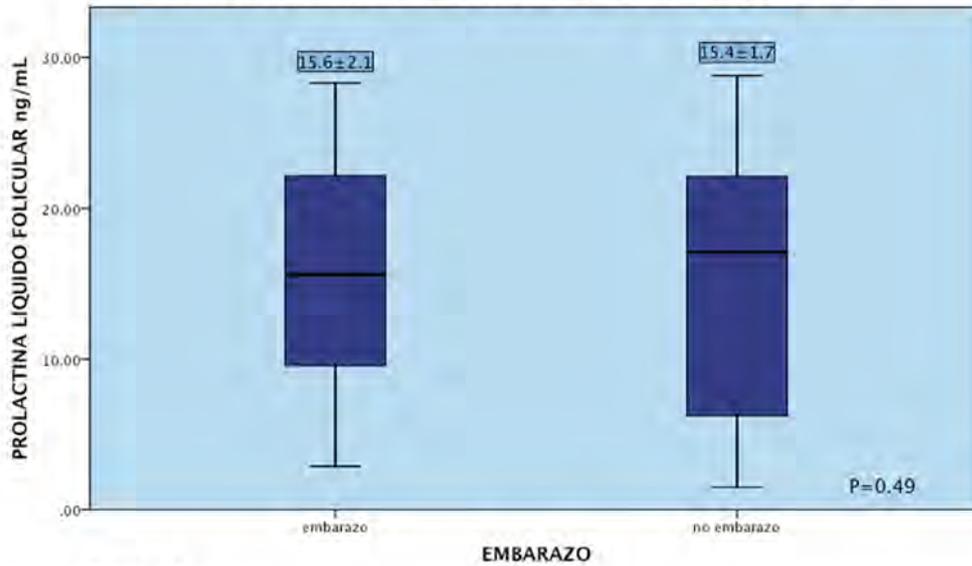


FIGURA 1

Relación entre la prolactina sérica y la prolactina del líquido folicular

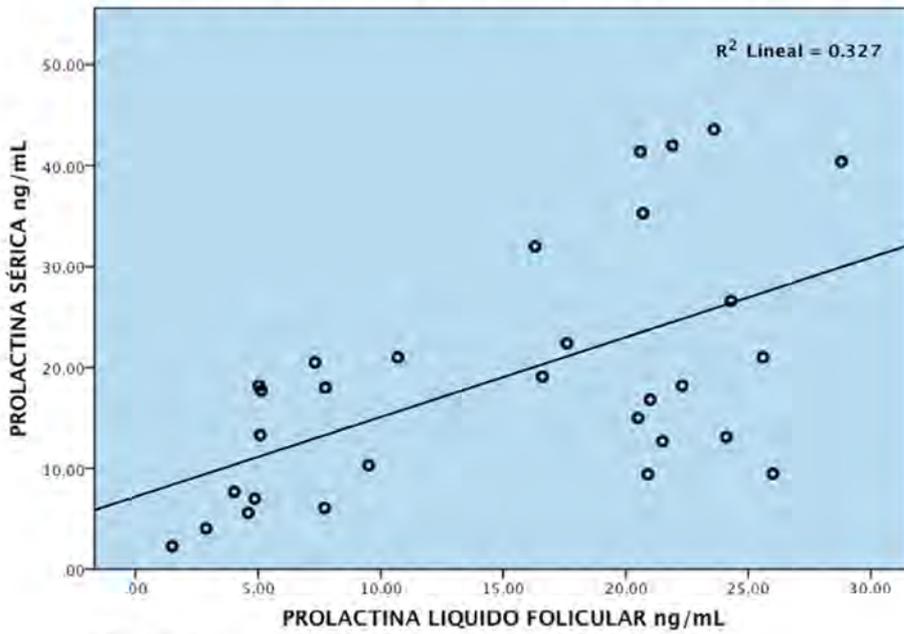


FIGURA 2

Relación entre la concentración de prolactina y la calidad embrionaria

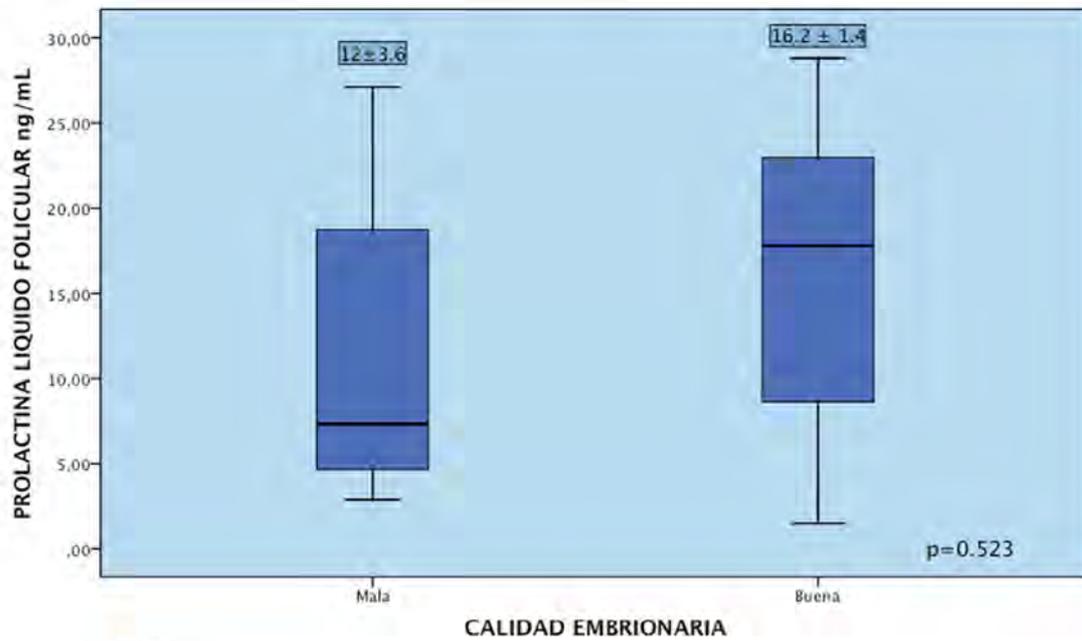


FIGURA 3

Correlación entre porcentaje de ovocitos maduros y prolactina en líquido folicular

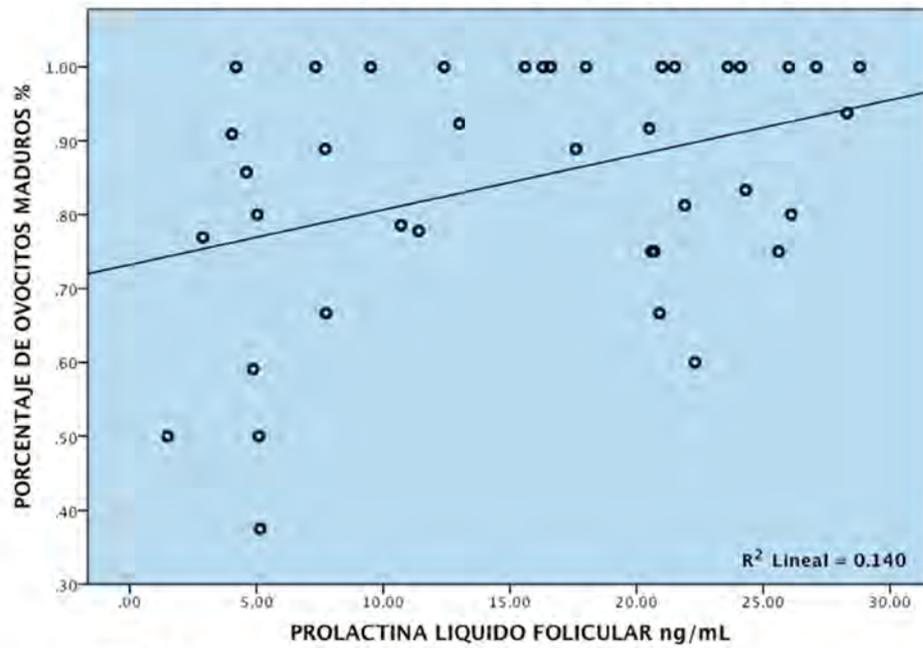


FIGURA 4

REFERENCIAS

1. **Revelli A. Delle Piane L. Casano S. Molinari E. Massobrio M. Rinaudo P.** Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009; 7:40 doi:10.1186/1477-7827-7-40.
2. **Phelps J. Bugg E. Shambloott M, Vlahos N, Whelan J. Zacur H.** Prolactin gene expression in human ovarian follicular cells. *Fertility Sterility* 2003; 79:182-185.
3. **Hung-Llamos S.** Prolactina y reproducción. *Endocrinología en Ginecología Tomo 1.* Editorial Ciencias Médicas. La Habana 2006. P.: 108-164.
4. **Castilla A. Garcia C. Cruz-Soto M. Martínez G. Thebault S. Clapp C.** Prolactin in Ovarian Follicular Fluid Stimulates Endothelial Cell Proliferation. *J Vasc Res* 2010; 47:45–53.
5. **Romao G. Ferriani M. Moura M. Martin A.** Screening for Prolactin Isoforms in the Fluid of Patients Undergoing in vitro Fertilization. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 54:46–49.
6. **Mendoza C. Ruiz-Raquena E. Ortega E. Cremades N. Martínez F. Bernabeu R. Greco E. Tesarik J.** Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum. Reprod* 2002; 17:1017-22.
7. **Wise S. Maurer R.** Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. *Domest Anim Endocr* 1994; 11:35-58.
8. **Rosen M. Zamah M. Shen S. Dobson A. McCulloch C. Rnaudo P. D Lamb J. Cedars M.** The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. *Reprod Biol Endocr* 2009; 7:1-8.
9. **Lindner Ch. Lichtenberg V. Westhof G. Braendle W. Bettendorf G.** Endocrine Parameters of Human Follicular Fluid and Fertilization Capacity of Oocytes. *Horm Metab Res* 1988; 20:243-246.
10. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.** 2010. 5th ed. World health Organization, Department of Reproductive Health and reaserch.