



Universidad Nacional Autónoma de México



**Facultad de Medicina.
División de Estudios de Posgrado e Investigación.**

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

“Correlación de los parámetros demográficos, ultrasonográficos, bioquímicos y biológicos; con el número de Blastocistos en pacientes sometidas a ciclos de FIV-ICSI”.

T E S I S

Para obtener el grado de subespecialista en
Biología de la Reproducción Humana.

P R E S E N T A :

Dr. David Emiliano Hernández León.

Asesor:

Dr. Jesús Daniel Moreno Garcia.

Ciudad de México; Junio, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

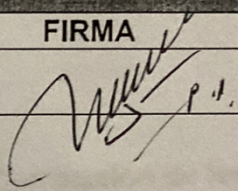
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

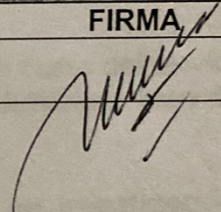
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

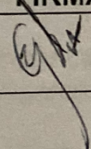
“Correlación de los parámetros demográficos, ultrasonográficos, bioquímicos y biológicos; con el número de Blastocistos en pacientes sometidas a ciclos de FIV-ICSI”.

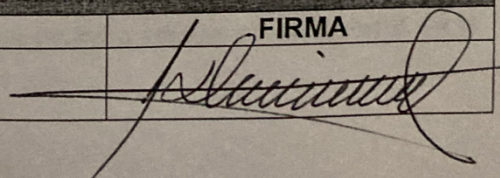
Aprobación y autorización de Tesis:

Aprobación y autorización de Tesis:

Subdirector médico	
NOMBRE	FIRMA
Dr. Mauricio Di Silvio Lopez.	

Encargado de la subdirección de enseñanza e investigación.	
NOMBRE	FIRMA
Dr. Félix Octavio Martínez Alcalá	

Jefa del Servicio de Reproducción Humana.	
NOMBRE	FIRMA
Dra. Zoé Gloria Sondón García.	

Profesor titular del curso de Biología de la Reproducción Humana. Médico adscrito al servicio de Reproducción Humana. Asesor de tesis.	
NOMBRE	FIRMA
Dr. Jesús Daniel Moreno García.	

	Pagina.
CONTENIDO.	
Agradecimientos.	V
Abreviaturas.	VI
Resumen.	VII
Introducción.	1
Marco de Referencia y antecedentes.	11
Planteamiento del problema.	12
Justificación.	14
Hipótesis.	15
Objetivos.	15
Material y métodos.	16
Tipo de estudio.	16
Población y tamaño de muestra.	16
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.	16-17
Metodología para el calculo de la muestra.	17
Técnicas y procesamientos empleados.	17
Procesamiento y análisis estadístico.	18
Recursos: Humanos y Materiales.	19
Implicaciones éticas.	20
Resultados.	22
Discusión.	32
Conclusiones.	34
Referencias bibliográficas.	35

LISTA DE TABLAS.	Página.
Características Antropométricas de las pacientes.	22.
Diagnósticos de las Pacientes.	23.
Resultados de los ciclos de estimulación ovárica.	23.
Relación de la edad con el número de ovocitos – Blastocistos.	26.
Tipo de infertilidad, edad y posibilidad de obtención de blastocisto.	29.
Resumen de parámetros evaluados y la posibilidad de blastocisto.	31.

LISTA DE FIGURAS.

Relación de la edad con el numero de folículos obtenidos.	24.
Porcentaje de blastocistos obtenidos por grupo de edad. Número mínimo de ovocitos MII para lograr un blastocisto.	27.
Relación del índice de masa corporal, con los grupos de edad.	28.
Relación del IMC y la posibilidad de obtener un blastocisto.	28.
Tipo de infertilidad y su relación con la edad.	28.
Infertilidad y posibilidad de obtener un blastocisto.	29.
Tipo de estimulación ovárica y posibilidad de obtener un blastocisto.	30.
Relación con el tipo de maduración final ovocitaria y blastocistos.	31.

LISTA DE GRÁFICAS.

Correlación del número de ovocitos maduros MII, con la edad.	25.
Correlación del número de blastocistos con la edad.	25.
Correlación del número de blastocistos con el número de ovocitos Maduros MII.	25.

AGRADECIMIENTOS.

México, lugar en el ombligo de la luna. Al día de hoy en mi país suman un millón 217 mil contagios y 112,326 muertes por SARS-CoV-2. México es de los países donde más personal de salud muere, según fuentes oficiales ya son 2,179 compañeros. Las cifras por si solas hablan. Para ustedes mi reconocimiento y gratitud.

Es difícil agradecer cuando tantas y tantos han contribuido a mi desarrollo personal y profesional, no me equivoco al escribir que existirán personas que por contexto pasen por alto en estas líneas, no les resto valor. Sin lugar a duda, gracias, México por darme patria, por darme identidad, porque con tus grandes instituciones me formaste como médico, como gineco-obstetra y biólogo de la reproducción humana. A mi nueva casa, el ISSSTE y especialmente a mi muy querido hospital 20 de Noviembre, que si bien el tiempo fue poco, procuré vivirlo al máximo; hospital de historia viva; que forma y forja. Espero algún día poder regresarte un poco de tanto.

Gracias a todas las mujeres que han contribuido a mi formación, gracias por hacerme sensible a su padecer en una sociedad como la nuestra, machista, llena de prejuicios, y barreras de genero. Como persona y médico, siempre procurare su bienestar. A mi abuela y hermana pero especialmente a Anita, mi hermosa esposa; mi mas grande admiración y reconocimiento. Gracias por esos días nublados, en los que siempre estás y paciente tiendes la mano.

A mis maestros, en primer lugar mis padres; y en segundo lugar y con especial cariño y aprecio al Dr. Jesús Daniel Moreno García, por confiar en mi, por su pasión por la reproducción que supo transmitirme. Por iniciarme en el caprichoso y complejo arte de la estimulación ovárica; por enseñarme que lo simple, y natural suele ser lo mejor. Siempre agradecido con usted maestro.

D. Emiliano Hernández León.
Diciembre, 2020.

ABREVIATURAS.

- 1.- ASRM. American Society for Reproductive Medicine.
- 2.- ACO. Anticonceptivos Orales.
- 3.- AFC. Recuento de Folículos Antrales.
- 4.- ART. Assisted Reproductive Technologies.
- 5.- E2. Concentraciones de Estradiol.
- 6.- ESHRE. European Society of Human Reproduction and Embryology.
- 7.- Et Al. Y Otros.
- 8.- EOC. Esquema de estimulación ovárica.
- 9.- FSH. Follicle Stimulating Hormone.
- 10.- GnRH. Gonadotropin releasing hormone.
- 11.- ICMART. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies.
- 12.- IMC. Índice de Masa Corporal.
- 13.- ISSSTE. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de Los Trabajadores del Estado.
- 14.- IVF. In Vitro Fertilization.
- 15.- LH. Luteinizing Hormone.
- 16.- Meta II/ MII. Metafase II.
- 17.- USG-TV. Ultrasonido Transvaginal.

RESUMEN.

La infertilidad es una enfermedad que genera discapacidad y deterioro funcional, está caracterizada por la incapacidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección. Se estima que afecta del 8 al 15 % de todas las parejas a nivel mundial (186 millones de personas). La posibilidad de lograr un embarazo espontáneo disminuye con la edad; con un pico máximo a los 25 – 30 años y disminuir paulatinamente. Dicho decremento esta posiblemente asociado con la calidad y número limitado de ovocitos posterior a estas edades. De ahí la importancia de una adecuada evaluación y determinación de los parámetros óptimos necesarios previo a una Técnica de Reproducción Asistida.

OBJETIVOS.

Determinar las asociaciones bioquímicas, ultrasonográficas, biológicas y demográficas que mejor se correlacionan con la obtención de ovocitos maduros, y a su vez, con el número de blastocistos en ciclos de FIV-ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio de tipo observacional, transversal y retrospectivo; de pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria y secundaria sometidas a FIV-ICSI del servicio de Biología de la Reproducción Humana del Centro Médico Nacional 20 de noviembre del ISSSTE. En el periodo comprendido entre enero del 2014 a enero del 2020. Se realizó muestreo por conveniencia, de pacientes en donde se haya obtenido ovocitos maduros MII y ciclos con blastocistos resultantes. El parámetro principal evaluado, fue el número de ovocitos maduros necesarios para obtener un blastocisto. Fue necesaria la realización de un análisis de los parámetros con correlación significativa. Las correlaciones se realizaron mediante coeficientes de correlación lineal o de Pearson.

RESULTADOS.

Posterior a comparar la edad, el índice de masa corporal, tipo de infertilidad, el esquema de estimulación ovárica y el tipo de maduración final ovocitaria, el único factor que determino el éxito en la obtención de ovocitos maduros MII y blastocistos es la edad. Con resultados significativos antes de los 40 años. En relación con el grupo de edad, se requirieron en promedio 4.18 ovocitos MII para lograr un blastocisto en menores de 35 años; 6.49 ovocitos en el grupo de 35 a 40 años y 15.36 ovocitos en el grupo de pacientes mayores de 40 años.

CONCLUSIONES.

De los parámetros evaluados, el único relacionado con la posibilidad de obtención de un blastocisto es la edad, teniendo significancia estadística hasta antes de los cuarenta años.

PALABRAS CLAVE.

Fertilización in vitro, Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, ovocito MII, blastocisto.

INTRODUCCIÓN.

Marco de referencia.

De acuerdo con el último ***Glosario Internacional sobre Infertilidad y Cuidado de la Fertilidad***, 2017. La fertilidad, se define como la capacidad de establecer un embarazo clínico. Por el contrario, la infertilidad se especifica como la enfermedad caracterizada por la imposibilidad de un embarazo clínico en un periodo de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección, o debido a un deterioro de la capacidad de una persona para reproducirse como individuo o con su pareja. Las intervenciones de fertilidad pueden iniciarse en menos de un año, en función de los antecedentes médicos, sexuales y reproductivos; la edad, los hallazgos físicos y las pruebas de diagnóstico. La infertilidad es una enfermedad que genera discapacidad como un deterioro de la función⁽¹⁾. A nivel mundial, más de 186 millones de personas sufren de infertilidad; la prevalencia de esta enfermedad en mujeres en edad reproductiva es de una en siete parejas en el mundo occidental, y una de cuatro parejas en países en vías de desarrollo; regiones como el sur de Asia, África Subsahariana, África del Norte / Medio Oriente, Europa Central / Oriental y Asia Central.⁽²⁾ De manera resumida, del 8 al 15% de las parejas en edad reproductiva, padecen infertilidad.⁽³⁾

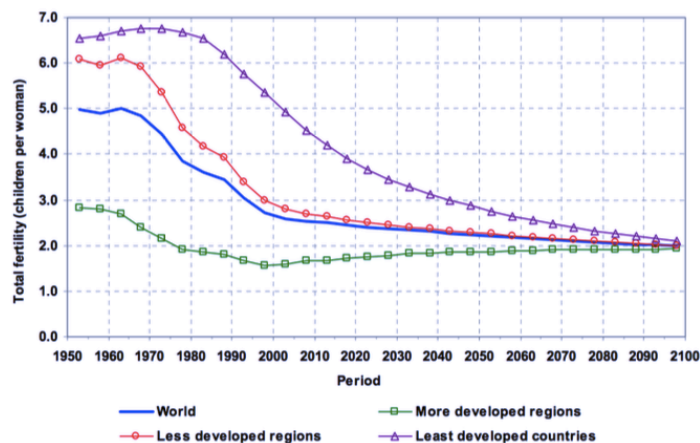


Figure 1. Fertility estimates (1950-2010) and projections (2010-2050) by region
[11] (United Nations, D.o.E.a.S.A., Population Division, *World Population Prospects: The 2012 Revision*. United Nations, New York, 2013: p. Paper No. ESA/P/WP.228).

Etiológicamente, la infertilidad no suele tener una causa única. Con respecto al factor femenino; las disfunciones ovulatorias se presentan en el 15% de las parejas infértiles, y puede llegar a presentarse, hasta en el 40% de las mujeres infértiles.⁽³⁾ La incidencia del factor tubo peritoneal en la población estéril oscila entre el 25 y el 35%. Por otro lado, el factor uterino y cervical, contribuye del 3 al 13%⁽⁵⁾. En resumen los factores antes mencionado, pueden encontrarse hasta en el 70% de las mujeres con infertilidad. Respecto al factor masculino es único responsable en el 20% de las parejas infértiles; y contribuye etiológicamente, en otro 30 – 40%,⁽⁴⁾ siendo las alteraciones en la calidad espermática, las más prevalentes.⁽⁶⁾

Producto del creciente aumento de la incidencia de infertilidad y que las parejas postergan cada vez más el primer embarazo; en la actualidad las técnicas de reproducción asistida se han convertido en un elemento esencial de apoyo terapéutico. Hoy a más de 40 años de su introducción clínica, IVF está disponible como un tratamiento exitoso en casi todo el mundo. Se estima que han nacido más de 8 millones de niños por esta técnica, y actualmente se están realizando 2.5 millones de ciclos anuales; lo que resulta en más de 500,000 partos anuales.⁽⁷⁾ Tan solo en el periodo comprendido entre 2008 y 2010. El comité Internacional de Monitoreo de Tecnologías de Reproducción Asistida (ICMART) reportó más de cuatro millones de tratamientos en todo el mundo y en Estados Unidos de América y Europa, más del 2% de los recién nacidos son el resultado de algún tratamiento de reproducción asistida.

Sin embargo, con una mejora constante en los protocolos de estimulación ovárica controlada, la implementación de técnicas como el disparo con análogo de GnRH, y la introducción de técnicas de preservación de gametos, como la vitrificación; se ha logrado, maximizar el rendimiento de los ciclos estimulados, y aumentar la posibilidad de tener un embrión euploide y de buena calidad. Sin embargo, en grupos especiales de riesgo, como lo son las pacientes con edad materna avanzada, el riesgo de abortos incrementa hasta en un 40% y el riesgo

de aneuploidia en los ovocitos recuperados puede llegar a ser hasta del 70% lo cual reduce dramáticamente la posibilidad de embarazo.⁽⁷⁾

En un ciclo natural, la tasa de fecundabilidad es alrededor del 20 – 30%. En contraste, en poblaciones vulnerables, como en mujeres con baja respuesta y/o pacientes con insuficiencia ovárica (prevalencia mundial del 1%)⁽⁸⁾; la posibilidad de lograr un embarazo es únicamente del 2.6%. Por consecuencia, en este grupo de pacientes, hasta el 60% de todos los embriones obtenidos se pierden en el periodo pre – post implantación; probablemente debido a que más del 40% del total de estos embriones, son aneuploides.⁽⁹⁾ De ahí, que en los últimos años, se han modificado los protocolos de estimulación ovárica, pasando de esquemas en donde se priorizaba el número de ovocitos a capturar, a esquemas en donde se da especial importancia a la calidad de los mismos.

El objetivo de las Técnicas de Reproducción Asistida (ART), es ayudar a la pareja infértil a tener un bebe sano nacido a término. El crecimiento multifolicular inducido por la estimulación ovárica puede inducir acumulación de múltiples ovocitos. Lo que, a su vez, parece aumentar las posibilidades de embarazo después de aplicar alguna técnica⁽¹⁰⁾. Por lo tanto, los especialistas en reproducción humana han intentado durante años obtener una cantidad adecuada de ovocitos, sin aumentar el riesgo del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica. Algunos han abogado por que un mayor número de ovocitos capturados se asocia con mejores resultados reproductivos,⁽¹¹⁾ Labarta y Bosch, encontraron que cuando la respuesta ovárica superaba los 17 ovocitos capturados, el número medio de embriones euploides fue de 5 +/- 2.4; mientras que cuando se obtuvieron menos de 17 ovocitos, el número medio de embriones euploides fue de 2.7 +/-1.4.⁽¹²⁾

En contraste, estudios publicados por la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE), establecieron en 15 el número “optimo” de recuperación^(10, 13) (En promedio, de 5 a 15 ovocitos por ciclo), para lograr un embarazo en un ciclo de estimulación ovárica (Tasa de éxito del

21.3%), y se encontró que en casos de más de 16 ovocitos capturados la tasa de embarazo, disminuye notablemente; junto con un aumento significativo en el riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.⁽¹⁴⁾ De igual manera, un factor a considerar es el impacto de la estimulación ovárica en la fertilización normal. Baart et al.⁽¹⁵⁾ Informaron el efecto deletéreo en la tasa de fertilización en paciente con rendimientos de ovocitos altos, en comparación con pacientes con respuestas normales a bajas. Los posibles factores contribuyentes con esta asociación negativa, incluye el efecto de las concentraciones supra fisiológicas del estradiol sobre los ovocitos en desarrollo, y más aun la progesterona sobre la receptividad endometrial.⁽¹⁶⁾ Más importante aún que el número de ovocitos recuperados; los nuevos esquemas de estimulación se centran en la calidad de estos. Es necesario determinar si el rendimiento y calidad de los ovocitos guarda una relación directamente proporcional con un número mayor o menor de embriones de calidad óptima para dar lugar a un embarazo. De ahí el énfasis en la realización de una adecuada evaluación morfológica de los mismos. Principalmente, enfatizar en una adecuada evaluación, en estructuras como el ooplasma, espacio perivitelino, primer cuerpo polar y la zona prelucida. Considerando cualquier alteración en estas estructuras como “Dimorfismos”, y la presencia de estos, como marcadores de mal pronóstico y aumento en la incidencia de aneuploidía.⁽⁹⁾

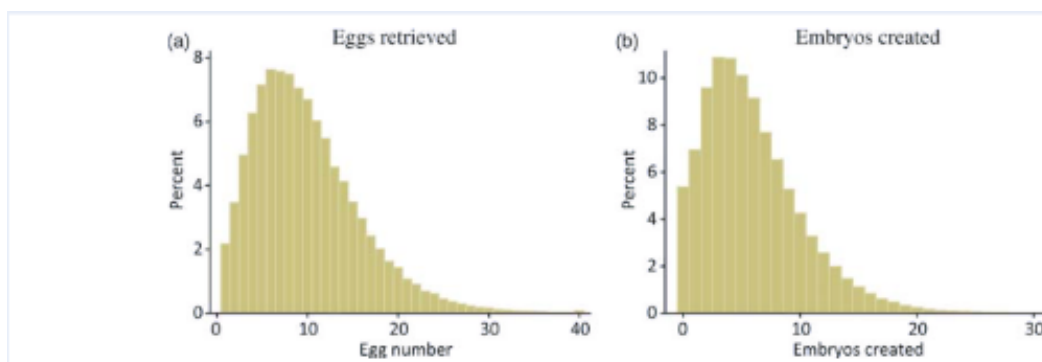
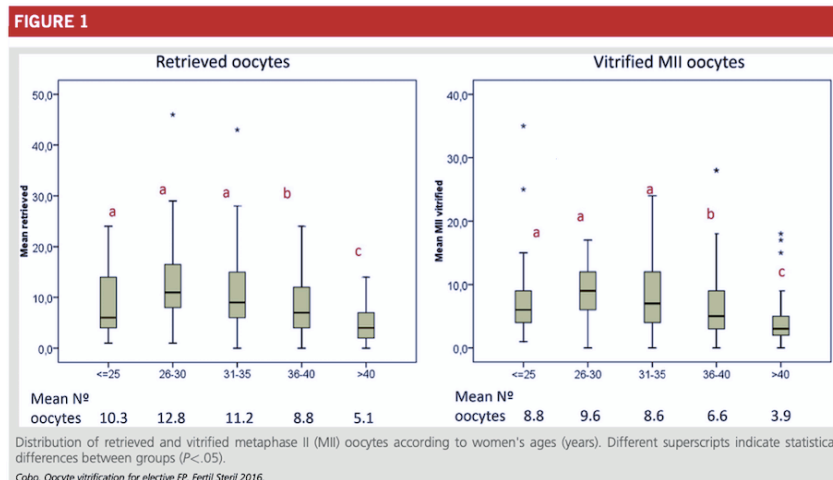


Figure 2 Number of eggs retrieved and embryos created.

Sunkara SK, Rittenberg V. Et Al. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. Human Reproduction, Vol 26, No. pp. 1768-1774, 2011.

La postergación de la maternidad, que es una tendencia demográfica en todos los países occidentales, contribuye considerablemente a la creciente proporción de parejas subfértiles. Que, a la larga, probablemente requerirán de Tecnologías de Reproducción Asistida. La edad femenina, es uno de los principales factores que influyen en los resultados clínicos de dichas técnicas. (17) La relación entre la disminución de la fecundidad, y la edad femenina; inicia a mediados de la tercera década de la vida, e incrementa a finales de esta; o principios de la cuarta. Dichas etapas, pueden considerarse razonablemente un estado reproductivo avanzada, con un riesgo incrementado de dimorfismo y aneuploidías ovocitarias



Cobo. Oocyte vitrification for elective FP. Fertil Steril 2016.

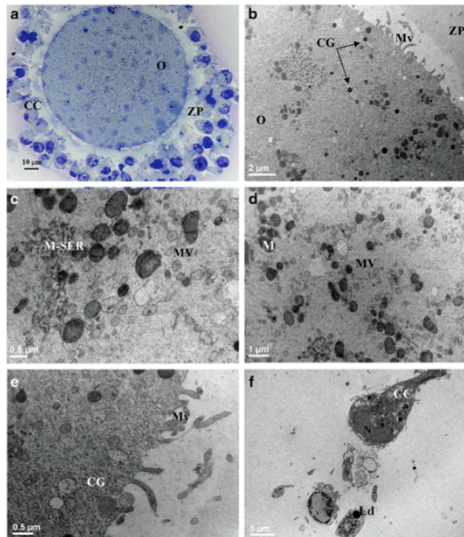
Las técnicas y protocolos de IVF están especialmente diseñadas para garantizar un rendimiento óptimo de ovocitos maduros y competentes (Metafase II), capaces de ser fertilizados. Sin embargo, aun con las diferentes técnicas de estimulación, disparo y/o maduración final ovocitaria, algunos ovocitos obtenidos pueden ser inmaduros. Se han reportado algunos datos de inmadurez ovocitaria, en los cuales se tiene que prestar especial interés, como son: La presencia de una vesícula germinal intacta, o en transición hacia metafase I; etapa en donde no se encuentra presente ningún cuerpo polar. Modificaciones del citoesqueleto, presencia o alteraciones en organelos. (18) Rubino Et Al. reportan que, en un ciclo

estimulado, hasta el 15% de los ovocitos recuperados serán inmaduros; de los cuales al rededor del 10% son vesículas germinales y el 5 % ovocitos Metafase I.

(19) Dichos ovocitos en metafase I capturados, pueden espontáneamente completar su maduración meiótica in vitro, y posteriormente ser utilizados para ICSI. Sin embargo, la obtención de una alta tasa de ovocitos inmaduros indudablemente conducirá a una reducción en la tasa de fertilización, embriones de mala calidad y mayores posibilidades de multinucleación. (20)

Al momento de realizar la evaluación ovocitaria, se tiene que prestar especial atención en dos componentes importantes: En primer lugar, el Compartimento citoplasmático (Presencia de vacuolas, granulaciones centrales densas, agregaciones del retículo endoplásmico liso). Y, en segundo lugar, los dimorfismos extra citoplasmáticos (Primer cuerpo polar, el tamaño del espacio perivitelino, granularidad, defectos de la zona pelúcida y alteraciones en su forma). De acuerdo con el “Consenso de Estambul de Evaluación Ovocitaria y Embrionaria”. La morfología ideal de un ovocito en metafase II es la siguiente: estructura esférica, cubierta por una zona pelúcida regular, citoplasma translúcido regular el cual tiene que estar libre de inclusiones, con un cuerpo polar de tamaño proporcional a las demás estructuras. Cada una de las estructuras antes mencionadas tendrá que poseer las siguientes características:

- a) Complejo cúmulo – ovocito: Cumulo y corona expandidos.
- b) Zona pelúcida: Adecuado color y grosor. (Actualmente, evidencia insuficiente sobre efecto en resultados reproductivos).
- c) Espacio perivitelino: Sin presencia de inclusiones.
- d) Cuerpo polar: Presencia o ausencia, tamaño y regularidad de este.
- e) Citoplasma: Homogéneo, sin agrupación de gránulos, sin agregaciones del Retículo Endoplásmico Liso.
- f) Vacuolización: Es aceptable la presencia de vacuolas pequeñas (5 – 10 micras), traslucidas. Mayores de 14 micras, se asocian con falla de fertilización.



Ovocitos MII y células de cúmulo. A - B. Morfología general, y organelos. C-D. Mitocondrias y REL.

Bianchi S, Macchiarelli G. Et Al. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:1343 – 1358.

Para la comprobación de fertilización, es necesario 16 a 18 horas después de la inseminación, la presencia de dos cuerpos polares;⁽²¹⁾ Los cuales deben ser de tamaño similar, centrales al ovocito, yuxtapuestos y con membranas definidas y separadas. Los pronúcleos con tamaño y cuerpos precursores nucleolares equivalentes, alineados en la región ecuatorial yuxtapuestos a la membrana. Cualquiera de las siguientes características debe de ser considerada atípica: pronúcleos separados, discordancia de tamaño. Respecto a la evaluación embrionaria. Parte fundamental de la evaluación es estadio de clivaje (día 2 -3); por un lado, es evaluar la división celular, y por otro, es el determinar la presencia de fragmentos; los cual se puede definir como: una estructura citoplasmática unida a la membrana extracelular, menor de 45 micras en día dos y menor de 40 micras en día tres. La fragmentación se divide en tres grados.

- a) Leve. Menor del 10 %.
- b) Moderada. 10 – 25 %.
- c) Severa. Mayor del 25%.

Los porcentajes equivalen al tamaño total del ovocito.

La existencia del más del 10% de fragmentación en embriones en día tres, impacta de manera significativa en la tasa de implantación. De igual manera, se han podido establecer correlaciones en el número de fragmentación y la presencia de aneuploidías.⁽²²⁾ Munné y Cohen reportan, que la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones con fragmentación mayor al 35%, puede llegar a ser hasta del 70 al 90%.⁽²²⁾ Parte importante de la evaluación del tercer día, de igual manera, la verificación de datos de “arresto” embrionario. El cual se define, como la falta de división celular en un periodo de 24 horas. Se considera desarrollo “lento”, si posee seis o menos células en día tres, pero han tenido división en las 24 horas previas. Las características que engloban a un embrión normal; son el que posea de siete a nueve células en día tres, menos del 15% de fragmentación, sin multinucleación, y haya sufrido división en el lapso previo de 24 horas. Un embrión acelerado, posee más de nueve células en día tres.

La importancia clínica de la evaluación de un embrión pos-compactación, es la evaluación del mecanismo de activación genómica, dicha evaluación se centrará en la identificación de ambos componentes celulares. En primera instancia, el trofoectodermo, que reflejará la capacidad del embrión de implantarse en el endometrio; y, por otro lado, el macizo celular interno, obviamente crucial para el futuro desarrollo fetal.⁽²²⁾ En resumen, las características de un blasto de buena calidad son las siguientes: Presencia de un macizo celular interno prominente, discernible y con celularidad abundante, siendo este compacto y unido entre sí. Respecto al trofoectodermo, este posee múltiples células, formando un epitelio cohesivo.

Por el contrario, un embrión no viable, es aquel que se ha arrestado por más de 24 horas en su desarrollo, o en el que todas sus células se encuentran degeneradas o han sufrido lisis.

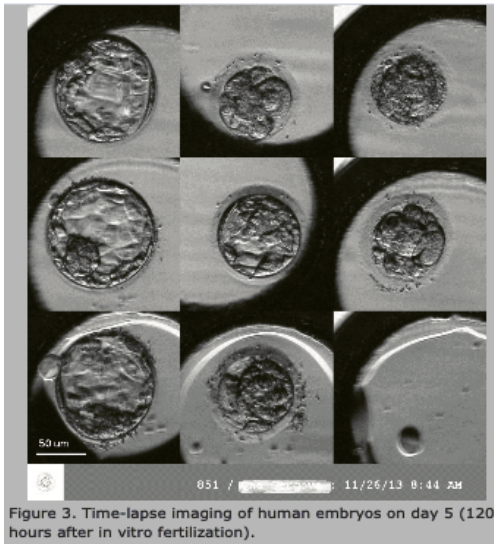


Figure 3. Time-lapse imaging of human embryos on day 5 (120 hours after in vitro fertilization).

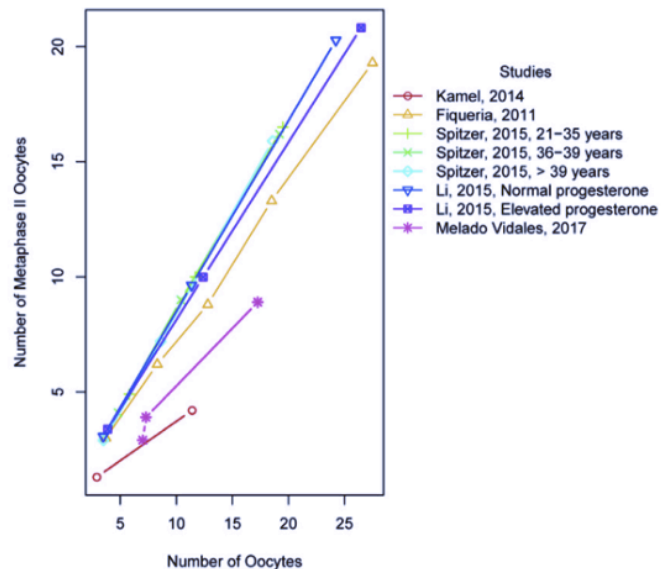
Table IV Timing of observation of fertilized oocytes and embryos, and expected stage of development at each time point.

Type of observation	Timing (hours post-insemination)	Expected stage of development
Fertilization check	17 ± 1	Pronuclear stage
Syngamy check	23 ± 1	Expect 50% to be in syngamy (up to 20% may be at the 2-cell stage)
Early cleavage check	26 ± 1 h post-ICSI 28 ± 1 h post-IVF	2-cell stage
Day-2 embryo assessment	44 ± 1	4-cell stage
Day-3 embryo assessment	68 ± 1	8-cell stage
Day-4 embryo assessment	92 ± 2	Morula
Day-5 embryo assessment	116 ± 2	Blastocyst

ICSI, intracytoplasmic sperm injection.

The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting.
Human Reproduction,
Vol. 26, No. 6 pp. 1270 – 1283, 2011.

Diversos estudios de corte prospectivos multicentricos, han intentado demostrar la cantidad de ovocitos Metafase II necesarios para obtener un recién nacido vivo. Rienzi Et Al reportaron un número de ocho ovocitos MII.⁽²³⁾ Cobo Et AL Encontraron como 7.2 el número necesario de ovocitos MII para obtener un recién nacido.⁽²⁴⁾ Otros estudios encontraron que las tasas de embarazo por ovocito en ciclos de descongelado variaban desde el 4.5 – 15%, en pacientes menores de 35 años. De nueva cuenta, la edad de la mujer es un tema fundamental para el éxito de las ART.⁽²⁵⁻²⁶⁾



Varmey B, Chua S. Et Al. Is there an association between oocyte number and embryo quality? A systematic review and meta-analysis. RBMO. Volume 39 ISSUE 5. 2019.

Estudios recientes, han demostrado que extender el cultivo de embriones a etapas de Blastocisto mejora los resultados de las ART,⁽²⁷⁾ aunque es importante aclarar, que los blastocistos morfológicamente normales, poseen un riesgo significativo de aneuploidías.⁽²⁸⁾ Una de las principal desventaja de la transferencia embrionaria en etapa de escisión, en lugar de en etapa de blastocisto, es que los criterios morfológicos que rigen la selección del embrión en día tres, son altamente subjetivos y reflejan con menos precisión la calidad genética; en comparación con los criterios utilizados en la evaluación en quinto día. Por otro lado, una posible desventaja del uso de embriones en etapa de blastocisto es que algunos embriones no pueden alcanzar esta etapa en cultivo.

⁽²⁸⁾

En una revisión realizada por Cochrane en donde se evaluó la transferencia de embriones en etapa de blastocisto en comparación con embriones en etapa de escisión; se concluyó que existe evidencia de calidad moderada con respecto a la tasa de recién nacido y embarazo clínico, en transferencia en fresco de embriones en etapa de blastocisto, y su asociación con tasas más altas que las transferencias de embriones en escisión. No hubo evidencia de una diferencia entre los grupos en la tasa de embarazo acumulado derivado de los ciclos de descongelación fresca y congelada.⁽²⁹⁾ De igual manera, se ha comprobado que en pacientes jóvenes existen mayores tasas de éxito en transferencias de embriones en etapa de blastocisto, sin embargo, la tasa de embarazo clínico acumulativo derivado de ciclos en fresco y criopreservados no mostraron este beneficio a favor de la transferencia de blastocisto. Posiblemente derivado de que existan mayores tasas de criopreservación y mayor cantidad de embriones preservados en etapa de clivaje.

⁽³⁰⁾

Hasta ahora es bien aceptado que el uso de transferencia de blastocisto tiene la ventaja de una mejor sincronía entre el endometrio y el embrión,⁽³¹⁾ lo que permite la autoselección del embrión y, por tanto, una mayor tasa de nacimientos vivos. Otra posible ventaja, es la mejor correlación entre la morfología y el estado de euploidía. La evidencia acumulada sugiere que, en

embriones en etapa de escisión de alta calidad, hasta el 60% podrían ser aneuploides. Mientras que, en los blastocistos de alta calidad, este porcentaje llega únicamente al 30%. Junto con la mejor sincronización antes descrita, y la mayor tasa de euploidía, se lograrán obtener tasas más altas de implantación, las cuales pueden ser superiores al 60% de lo total de blastocistos euploides obtenidos de las ART; en todas las categorías de edad, lo que indica que la disponibilidad de un blasto euploide para la transferencia puede compensar en gran medida el efecto deletéreo del aumento de la edad femenina en el éxito del embarazo. (32-33)

Sin embargo, estas conclusiones son debatidas por otros autores, quienes han encontrado que no existe alguna diferencia estadísticamente significativa entre un estadio y otro. Levi-Setti y cols. Concluyeron en un estudio controlado aleatorizado, que no existía diferencia significativa en términos de implantación y tasa de embarazo en mujeres más jóvenes. (34) Por otro lado, y una de las principales desventajas, es evidente que no todos los embriones en etapa de escisión podrán llegar a blastocisto.

Marco de referencia y antecedentes.

Pocas son las publicaciones (existe únicamente un modelo predictivo), que especifican la cantidad de ovocitos MII, necesarios para poder obtener un embrión en etapa de blastocisto. Aunque la tasa de recién nacidos vivos es el resultado final de la mayoría de los estudios que evalúan el éxito de las técnicas de reproducción asistida, depende de factores modificables y no modificables; controlables y no controlables, que hacen difícil, las predicciones individualizadas sobre la cantidad de ovocitos necesarios para lograr el resultado deseado. (35) Son dos los argumentos centrales por los que el cultivo de blastocistos tiene posibles ventajas sobre la transferencia tradicional de la etapa de escisión. En primer lugar, se considera que es fisiológicamente prematuro exponer los embriones en etapa temprana al entorno uterino, más aún, aquel que se ha

sometido a estimulación ovárica y, por lo tanto, a concentraciones supra fisiológicas de estrógenos. En condiciones fisiológicas, los embriones viajan a través de las trompas de Falopio y no alcanzan el útero antes de la etapa de mórula (16 células compactadas), lo que equivale al menos al día 4 de cultivo in vitro. El útero proporciona un ambiente nutricional diferente del oviducto; por lo tanto, se postula que el ambiente uterino puede causar estrés en el embrión, si se transfiere en la etapa de escisión, reduciendo posiblemente las posibilidades de implantación. También hay evidencia de una reducción significativa en la pulsatilidad uterina en el momento en que se transfieren los blastocistos y, por lo tanto, hay menos posibilidades de que los embriones puedan ser expulsados.

El segundo argumento para la transferencia de blastocistos es el mayor potencial de implantación reportado en comparación con los embriones en etapa de escisión. Como consecuencia de la autoselección, se postula que solo se espera que los embriones más viables se conviertan en blastocistos. Es ampliamente reconocido que los criterios morfológicos utilizados para la selección de los mejores embriones en los días dos a tres son limitados. Existe una proporción inquietantemente grande de embriones, catalogados como morfológicamente normales del día tres, que realmente son cromosómicamente anormales o mosaicos, lo que contribuye con una posible reducción en la tasa de implantación que se observa en los protocolos de transferencia en clivaje. Si bien la transferencia de los blastocistos del día cinco, no puede garantizar la ausencia de anomalías cromosómicas. Se ha demostrado, que al menos en mujeres mayores de 36 años, la incidencia puede reducirse del 59% en embriones en clivaje, al 35% en blastocistos.⁽²⁹⁾

Planteamiento del Problema.

La infertilidad es una enfermedad caracterizada por la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección. Se estima que afecta entre el ocho y el 12% de las

parejas en edad reproductiva en todo el mundo. Se reporta, que el factor masculino por sí solo puede llegar a estar presente en el 20 – 30% de los casos, pero puede contribuir hasta con el 50%. La infertilidad secundaria, es la forma más común. Los tres factores que la determinan la probabilidad de una concepción espontánea son: Edad de la pareja, enfermedades asociadas con infertilidad y el deseo de no concepción. La disminución de la fertilidad en las mujeres suele comenzar a partir de los 25 – 30 años. Y dentro de las principales causas reportadas en la pareja, se encuentran: hipogonadismo – hipogonadotrófico, hiperprolactinemia, trastornos de la función ciliar, fibrosis quística, infecciones, enfermedades sistémicas y factores / enfermedades relacionadas con el estilo de vida.

Desde el nacimiento de Louis Brown (primer bebe de un Tratamiento de Reproducción Asistida), en el año de 1978, el objetivo principal de estos procedimientos; es el nacimiento de un niño sano. Dicho objetivo depende de una multitud de factores independiente no mutuos, entre los principales se encuentran: la edad de la mujer, y el resultado de la estimulación ovárica. En donde juega un papel indispensable el número de ovocitos capturados después de esta. Considerándose como factor predictor independiente de la posibilidad de embarazo. En donde se ha planteado que una respuesta adecuada y razonable de ovocitos, es de 10 a 15. Sin embargo, una proporción significativa de pacientes tienen un número de ovocitos recuperados escasos (<4) o subóptimo (3-9), y como consecuencia, una reducción, en el número de embriones resultantes disponibles para transferencia o criopreservación. Derivado de lo anterior, recientemente se han postulado nuevos parámetros de éxito en las Tecnologías de Reproducción Asistida. Específicamente obtener el número de ovocitos necesarios para lograr obtener un blastocisto, ya que este puede tener mayor posibilidad de implantación, la cual disminuye con la edad.

Actualmente no existe un modelo en mujeres latinoamericanas que correlacione las características clínicas, bioquímicas y ultrasonográficas con el número necesario de ovocitos maduros a capturar para obtener un blastocisto;

optimizando así los ciclos de FIV – ICSI. Se utilizan ovocitos maduros preferentemente sobre los demás, ya que son estos los gametos con capacidad de apoyar el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocisto.

Justificación.

A nivel mundial, vivimos una transición epidemiológica muy marcada; en donde cada vez es más común priorizar aspectos sociales, laborales y económicos; sobre el deseo reproductivo. Secundario a estas transformaciones, cada vez es más común que el médico especialista en reproducción humana se enfrente con barreras con efectos deletéreos claros en la fertilidad. No es raro, que mujeres de mayor edad, acudan a nuestros consultorios por problemas de infertilidad, anovulación y padecimientos endocrino-metabólicos. En la literatura mundial, se estima que hasta el 10% de las parejas tendrán problemas para lograr un embarazo de manera espontánea. Tan solo, en el año 2015, en Estados Unidos de América y Europa, se estima que más del 2% del total de los nacimientos anuales (alrededor de ocho millones de bebés), son producto de alguna Técnica de Reproducción Asistida. Gracias a este auge e interés científico creciente por entender de una manera global la salud reproductiva femenina; se han podido perfeccionar tanto los protocolos de estudio y estimulación; así como tecnologías para lograr un recién nacido vivo. Prueba de esto, es que la tasas de recién nacido vivo en la década de los noventa pasó del 26 % , hasta más del 40% en la actualidad. Producto de las mejoras antes descritas, el abordaje de la infertilidad es más preciso e integral. Permitiendo describir con detalle cada una de las patologías tanto femeninas como masculinas que interfieren en la fertilidad de una pareja. Delimitando grupos vulnerables que requieren mayor atención tanto en el diagnóstico preciso, protocolos de tratamiento y pronóstico. Ejemplo claro de esto, es el cambio radical en los protocolos de estimulación, los cuales; han pasado de esquemas en donde se priorizaba el número de ovocitos recuperados; por el de una mejora en la calidad y el rendimiento de los ciclos. De ahí la necesidad de establecer el

número ideal de ovocitos maduros necesarios, para lograr un blastocisto; maximizando así la calidad de los gametos, con una posible mejora en la tasa de implantación, embarazo y recién nacido.

Hipotesis.

¿Es posible determinar los parámetros demográficos, bioquímicos, ultrasonográficos y biológicos que mejor correlacionan tanto con el número de ovocitos maduros y de blastocistos?. ¿Es posible ofertar esquemas de estimulación personalizados que permitan una mayor eficacia y eficiencia en los tratamientos de reproducción asistida?

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Precisar el efecto de los factores bioquímicos, ultrasonográficos, biológicos y demográficos que mejor se correlacionan con la obtención de ovocitos maduros y a su vez, con el número de blastocistos en ciclos de FIV/ICSI.

Objetivos Específicos.

La realización de este estudio permitirá:

1. Determinar la interacción de los diferentes parámetros con el número de ovocitos maduros a obtener durante un ciclo de FIV/ICSI
2. Determinar la correlación entre el número de ovocitos maduros necesarios para obtener por lo menos un blastocisto.
3. Integrar los diferentes parámetros en una fórmula matemática que permita conocer el número mínimo de ovocitos maduros a capturar para obtener un blastocisto.

MATERIALES Y METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

Diseño y Tipo de Estudio.

Estudio de tipo observacional, transversal, analítico, retrospectivo.

Población de Estudio.

Pacientes con diagnósticos de infertilidad primaria y secundaria, sometidas a Técnicas de Reproducción Asistida en el servicio de Biología de la Reproducción Humana. En el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. ISSSTE. En el periodo comprendido entre Enero del año 2014 al mes de Enero del año 2020.

Universo de Trabajo.

Pacientes del servicio de Biología de la Reproducción Humana, con antecedente de infertilidad primaria y secundaria. En el periodo comprendido entre Enero del año 2014 al mes de Enero del año 2020.

Antecedente de haber sido sometidas a ART.

Definición del grupo de intervención.

Se analizarán todos aquellos expedientes y hojas de estimulación de pacientes sometidas a tratamientos de FIV/ICSI en el Servicio de Biología de la Reproducción de enero del 2014 al mes de enero del 2020.

Criterios de Inclusión.

- Pacientes con el diagnóstico de infertilidad primaria / secundaria.
- Pacientes sometidas a ART.
- Pacientes con expediente clínico electrónico completo de acuerdo a la NOM-04.

Criterios de Exclusión.

- Pacientes con expedientes incompletos.
- Pacientes en donde los embriones no hayan sido cultivados hasta etapa de blastocisto.
- Ciclos en donde los ovocitos no se haya logrado fertilización.
- Ciclos en donde los ovocitos no hayan logrado madurez (Vesículas germinales, ovocitos en Metafase I).
- Ciclos cancelados.
- Ciclos en donde no se haya logrado obtener blastocistos.
- Datos incompletos en la hoja de estimulación ovarica.

Criterios de Eliminación.

- Pacientes que abandonaron el proceso de IVF.
- Ciclos cancelados por falta de respuesta.

Metodología para el cálculo de la muestra.

Se realizará muestreo por conveniencia. El tamaño de la muestra es el número de pacientes con infertilidad primaria y secundaria, en el periodo de tiempo establecido. En donde se haya podido obtener ovocitos maduros (Metafase II) y ciclos con blastocistos resultantes, en el mismo ciclo de estimulación ovarica controlada. Independiente de características hormonales, clínicas y ultrasonográficas.

Técnicas y procedimientos empleados.

Realizaremos un estudio que incluya a todas las pacientes que cumplan con los criterios de inclusión, sin importar la causa de infertilidad. Sometidas a tratamiento de FIV – ICSI desde enero del 2014 a enero del 2020.

El parámetro principal evaluado, es el número de ovocitos maduros necesarios para la obtención de un blasto. La reserva ovárica, se evaluó con el RFA (2-10 mm) usando una sonda endovaginal de 7.5MHZ 2D, los valores hormonales

basales (2° o 3° día del ciclo menstrual) fueron procesados, por el laboratorio clínico del CMN 20 de Noviembre. Los datos se obtendrán, de los expedientes y hojas de estimulación ovárica, del Servicio de Reproducción Humana, del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

Los protocolos de estimulación ovárica que se utilizan actualmente en el servicio de Reproducción Humana, CMN 20 de Noviembre, es una combinó FSHr (Gonal F Merck, Lyon Francia), LHr (Luveris Merck, Lyon Francia) y antagonista de GnRH (Cetrotide 0.2 mg Merk, Lyon, Francia). La dosis inicial de rFSH (75-450UI), Lh-r (75 – 150 UI), fue seleccionada por criterio del médico, de acuerdo con la edad, IMC y reserva ovárica. En el día 7-8, las dosis se ajustaron de acuerdo a los resultados del monitoreo ovárico, de igual manera, de haber sido requerido por el médico, se agrego LHr al esquema de estimulación. La ovulación fue desencadenada usando rHCG (Ovidrel, Merk, Lyon Francia) y/o HCG Urinaria. Cuando se tuvieran al menos 2 a 3 folículos mayores a 18 mm. Posterior a esto la captura se realizó de 34 a 36 horas después de la maduración final ovocitaria. La respuesta se evaluará comparando la cantidad de ovocitos maduros (Metafase II) necesarios para obtener un blastocisto.

Procesamiento y Análisis Estadístico.

El análisis univariado para el cálculo de estadística descriptiva se realizó de acuerdo con el tipo de variable, midiendo en las variables cualitativas frecuencias simples y porcentajes. En el caso de variables continuas medidas de tendencia central (media, moda, mediana, desviación estándar y límites superior e inferior).

A través de medidas de asociación tales como:

- Odds ratio
- Chi cuadrada
- Medidas de tendencia central.

Se realizó un análisis discriminante progresivo sobre aquellos parámetros que tengan una correlación significativa con la obtención de ovocitos maduros para

establecer una puntuación predictiva para la obtención de blastocistos. Las correlaciones se realizaron mediante coeficientes de correlaciones lineal o de Pearson.

Recursos.

- Hojas de estimulación ovárica.
- Expediente clínico electrónico.
- Computadora del Servicio de Reproducción Humana.
- Paquetería con programas estadísticos (Excel, SPSS).
- Hojas de cálculo.
- Laboratorio de IVF.
- Realización de una base de datos actualizada de los ciclos de IVF. Del servicio de Biología de la Reproducción Humana. CMN 20 de Noviembre.

Recursos Humanos.

1. 1.- Médicos Biólogos de la Reproducción Humana. Adscritos al Servicio de Biología de la Reproducción Humana.
2. 2.- Médicos residentes de la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana.
3. 3.- Embriólogo, adscrito al laboratorio del servicio de Biología de la Reproducción Humana.
4. 4.- Epidemiólogo.

Recursos Materiales.

1. 1.- Estudios hormonales.
2. 2.- Ultrasonido.
3. 3.- Laboratorio de IVF.
4. 4.- Hojas de estimulación ovárica controlada.
5. 5.- Estudios de abordaje diagnóstico y terapéutico para parejas con infertilidad.

IMPLICACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO.

Dado que se trata de un estudio observacional, analítico y retrospectivo en el que se revisaran expedientes clínicos. De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud se clasifica como una investigación Tipo I sin riesgo. Por lo que no contrapone las normas éticas de la investigación clínica-epidemiología.

Este estudio se basará en las leyes y principios éticos internacionales y nacionales establecidos en:

- La declaración de Helsinki de 1975, enmendada en 1983: refiere los principios éticos para la investigación médica que involucre sujetos humanos, incluyendo la investigación respecto a material y datos humanos identificables.
- Leyes y códigos de México establecidos en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos: artículo 4º. “Toda persona tiene derecho a la protección de la salud”.
- Ley General de Salud (título primero, disposiciones generales, artículo 2º fracción VII. Artículo 3º fracción IX. Artículo 17 fracción III, Artículo 41-bis fracción fracción II, de la formación de los comités de ética en investigación. Capítulo VI, Servicios de Planificación Familiar, artículo 68 fracción IV. Título quinto, Investigación Para la salud, Capítulo Único, artículo 96 y 97. Artículo 98 fracción I y II. Artículo 99. Artículo 100 fracciones I,4,6,7.
- Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación en salud: Establece los lineamientos y principios a los cuáles deberá someterse la investigación científica y tecnológica destinada a la salud, corresponde a la secretaría de salud en orientar su desarrollo. La investigación para la salud es un factor determinante para mejorar las acciones encaminadas a proteger, promover y restaurar la salud del individuo y de la sociedad en general; para desarrollar tecnología mexicana en los servicios de salud y para incrementar su productividad, conforme a las bases establecidas en dicha ley. El desarrollo de la

investigación para la salud debe atender a aspectos éticos que garanticen la dignidad y el bienestar de las personas sujetas a investigación. Artículo 17. Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Para efectos de este Reglamento, las investigaciones se clasifican en las siguientes categorías. I.- Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquéllos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

- El estudio no contrapone lo establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, del Expediente Clínico. Capítulo introductorio.

Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. ISSSTE.

RESULTADOS.

En este estudio se analizaron las hojas de estimulación ovárica de 563 pacientes sometidas a ciclos de IVF-ICSI (N=563), del servicio de Biología de la Reproducción Humana del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre; en el periodo comprendido entre el mes de enero del 2014 a enero del 2020. Las características antropométricas y diagnósticos de las pacientes son las siguientes: la media de edad fue de 35.4 años, la media de peso fue 65.7 kg, la media de IMC fue de 25.95 kg/m². Respecto al tipo de infertilidad; el 58.61% fue de tipo primaria y el 41.39% de tipo secundaria. La media de años de infertilidad fue de 6.6 años. Dentro de las características ultrasonográficas y hormonales basales de las pacientes; la media de folículos antrales fue de 11.8 folículos, la media de estradiol basal fue de 53 pg/ml, la media de FSH de 7.42 mUI/ml y la media de LH Basal de 4.68 mUI/ml. **Tabla No. 1.**

TABLA No. 1. Características antropométricas de las pacientes.

Información Demográfica.	
Total de Pacientes	563
Edad de las pacientes (media ± d.s.)	35.48 ± 3.75
Peso (Kg) (media ± d.s.)	65.7 ± 10.50
Talla (m) (media ± d.s.)	1.59 ± 0.07
IMC (media ± d.s.)	25.95 ± 3.58
Tipo de infertilidad / Características Hormonales y Ultrasonográficas Basales.	
Primaria (No.(%))	330 (58.61 %)
Secundaria (No.(%))	233 (41.39 %)
Edad materna avanzada (No.(%))	372 (66.07%)
Años de infertilidad (media ± d.s.)	6.65 ± 3.44
Recuento de folículos antrales (No.(%))	11.83 ± 7.95
E2 Basal (pg/mL) (media ± d.s.)	53.00 ± 26.96
FSH Basal (mUI/mL) (media ± d.s.)	7.42 ± 5.16
LH Basal (mUI/mL) (media ± d.s.)	4.68 ± 4.97

Los principales diagnósticos vinculados con las pacientes fueron los siguientes: el 41.3% poseían factor Tubo-peritoneal, el 22.2% factor ovárico, el 18.29 algún grado de endometriosis, el factor uterino se presentó en el 18.65% y el tiroideo en el 26.29%. El factor masculino se encontró en el 36.06% de las parejas. Como parte de pacientes sometidas a preservación de fertilidad, 13

pacientes (2.31%) poseían algún diagnóstico oncológico y 2 pacientes poseían un diagnóstico inmunológico / reumatológico (0.36%). (Cabe mencionar que gran parte de las pacientes poseen mas de un diagnóstico, por esta razón, los porcentajes no se ajustan a un 100%). **Tabla No. 2.**

TABLA No. 2. Diagnósticos de las pacientes estudiadas.

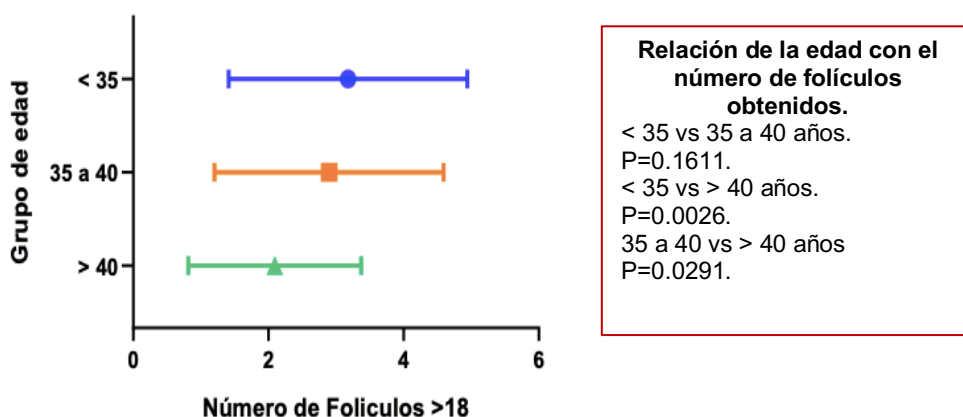
Diagnósticos Asociados.	No.	%
Tubo Peritoneal	231	41.03
Ovárico	125	22.20
Endometriosis	103	18.29
Insuficiencia Ovárica Primaria	0	0.00
Factor Masculino	203	36.06
Factor Uterino	105	18.65
Tiroideo	148	26.29
Cervical	6	1.07
Pobre Respondedora	71	12.61
Perdida Gestacional Recurrente	46	8.17
Inexplicable	10	1.78
Oncológico	13	2.31
Inmunológico	2	0.36
Alérgica a la FSH-R	1	0.18

En relación con los resultados de los ciclos de estimulación, en promedio se obtuvieron un total de 6.35 ovocitos por ciclo, con una media de 11.2 días de estimulación ovárica, con un 63.1% de ovocitos maduros MII. Del total de los ciclos, únicamente el 17.78% contaron con blastocistos disponibles para transferencia. **Tabla No. 3.**

TABLA No. 3. Resultados de los ciclos de estimulación ovárica.

Resultados de la Estimulación Ovárica.	
Días de EOC (media ± d.s.)	11.23 ± 1.61
Ovocitos totales (media ± d.s.)	6.35 ± 4.85
Porcentaje de ovocitos MII (media ± d.s.)	63.11 ± 28.83
Ovocitos fertilizados (media ± d.s.)	3.85 ± 3.27
Porcentaje de blastocistos (media ± d.s.)	17.78 ± 31.00
Grosor del endometrio al final de la estimulación (mm) (media ± d.s.)	9.65 ± 2.35
Endometrio tipo A (No.(%))	7 (1.24 %)
Endometrio tipo B (No.(%))	92 (16.34 %)
Endometrio tipo C (No.(%))	464 (82.42 %)

El número de folículos mayores de 18 mm previo a la maduración final ovocitaria, al comparar los diferentes grupos de edad; fue evidente la existencia de una relación inversamente proporcional con la edad. De tal manera que la media en pacientes menores de 35 años fue de 3.17, en el grupo de 35 a 40 años de 2.8 y finalmente en pacientes mayores de 40 años, de 2.09 folículos promedio. Con valores estadísticamente significativos en pacientes por arriba de 40 años (Valor de P = 0.0291).



Al comparar si alguna variable tenía relación directa con la posibilidad de obtener un blastocisto, se realizaron regresiones lineales (Coeficiente de correlación de Pearson) para conocer las tendencias de los datos. Los datos comparados fueron: Edad, índice de masa corporal, tipo de infertilidad, tipo de estimulación ovárica y el tipo de maduración final ovocitaria.

Edad de la paciente.

Al evaluar la edad, existió una relación inversamente proporcional, en la posibilidad de obtener tanto ovocitos maduros MII, como blastocistos. Como es de esperarse, a mayor edad, menor cantidad de ovocitos MII y secundario a esto, embriones disponibles.

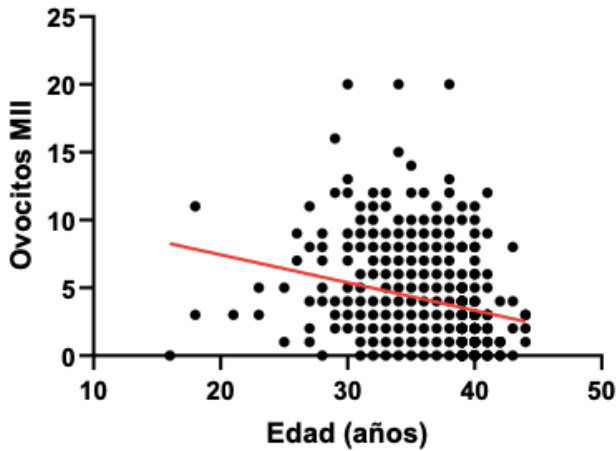


Gráfico No. 1.

Correlación del Número de ovocitos maduros MII, con la Edad. 563 Ciclos De IVF – ICSI.

Existió una relación inversamente proporcional entre la edad con el número de ovocitos maduros MII.

- $R^2 = 0.04840$.

- $P = < 0.0001$.

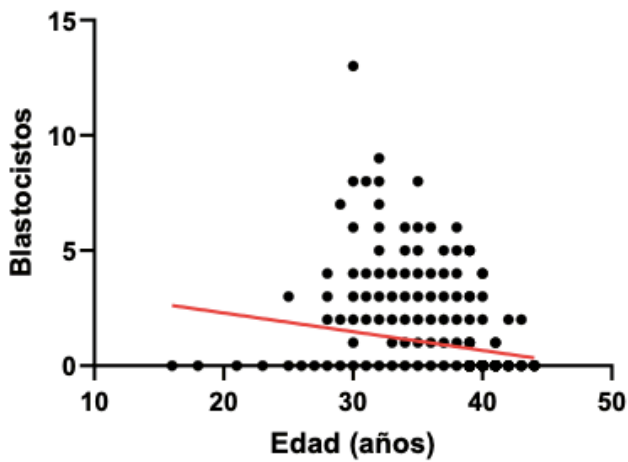


Gráfico No. 2.

Correlación del Número de Blastocistos con la Edad. 563 Ciclos De IVF – ICSI.

Existió una relación inversamente proporcional entre la edad con el número de Blastocistos obtenidos.

- $R^2 = 0.02725$

- $P = < 0.0001$.

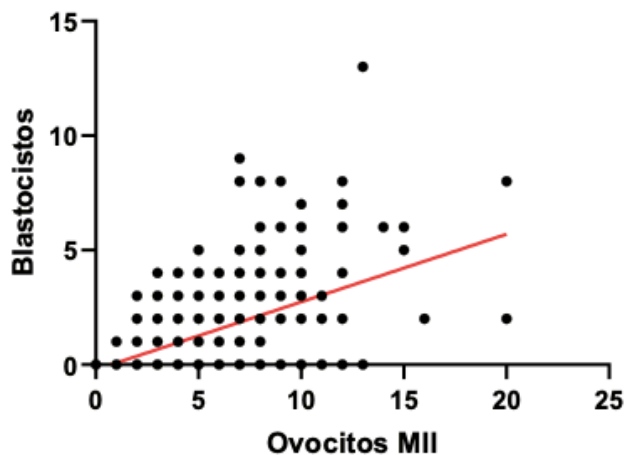


Gráfico No. 3.

Correlación del Número de Blastocistos con el número de Ovocitos Maduros MII. 563 Ciclos De IVF – ICSI.

Existió una relación inversamente proporcional entre la edad con el número de Blastocistos obtenidos.

- $R^2 = 0.3026$

- $P = < 0.0001$.

Se realizó una subclasificación de acuerdo con grupos específicos de edad; se observó que en el grupo de pacientes menores de 35 años y de 35 a 40 años, existió una significancia estadística en cuanto a la posibilidad de obtener ovocitos maduros MII y blastocitos; la cual desapareció posterior a los 40 años.

Tabla No. 4.

TABLA No. 4. Relación de la edad (subgrupos), con el número de ovocitos maduros MII y Blastocistos.

	< 35	35 a 40	> 40
Número total de pacientes	191	340	32
N=563			
Valor mínimo	16.00	35.00	41.00
Percentil 25 %	30.00	36.00	41.00
Mediana	32.00	37.00	41.00
Percentil 75 %	34.00	38.00	42.75
Valor máximo	34.00	40.00	44.00
Rango	18.00	5.000	3.000
Media	31.51	37.12	41.81
Desviación estándar de la media	2.984	1.673	1.091
Error estándar de la media	0.2159	0.09075	0.1928
VALOR DE R2.	0.3425	0.2823	0.07001
VALOR DE P.	<0.0001	<0.0001	0.1433

Se calculó el porcentaje de éxito que se tiene en cada grupo de edad, respecto al número de ovocitos maduros MII, como mínimo para lograr obtener un blastocisto. Encontrando que el éxito de igual manera está relacionado con la edad; ente más joven la paciente, mayor posibilidad de obtener blastocistos y menor número de ovocitos maduros MII requeridos. (Las medias de blastocistos en menores de 35 años fue de 1.44, de 35 a 40 años 0.88 y mayores de 40 años de 0.18). Se observó que en el grupo de pacientes mayores de 40 años, es menor la posibilidad no solo de obtener blastocistos, sino de ovocitos maduros. Para las pacientes del grupo de edad menor de 35 años, el 23.54 % poseían por lo menos un blastocisto; requiriendo un mínimo total de 4.18 ovocitos maduros para su obtención. Para el grupo de edad de 35 a 40 años, el 15.60% lograron un

blastocisto, requiriendo en promedio 6.49 ovocitos maduros; y finalmente únicamente el 6.51% de las mujeres mayores de 40 años tenían blastocistos, requiriendo en promedio 15.36 ovocitos maduros MII necesarios para lograrlo.

Figura No. 1-2.

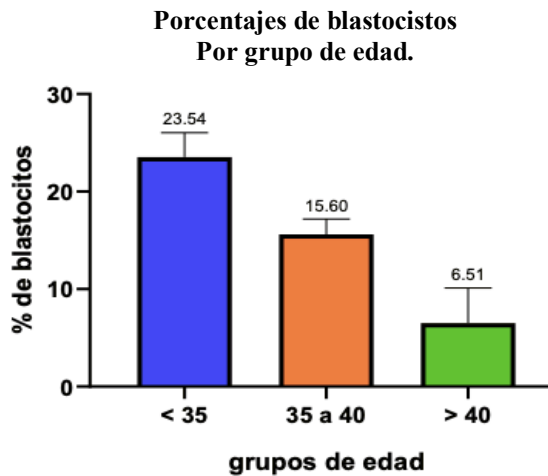


FIGURA No. 1.
Porcentaje de paciente con blastocistos disponibles. De acuerdo con la edad. De la paciente.

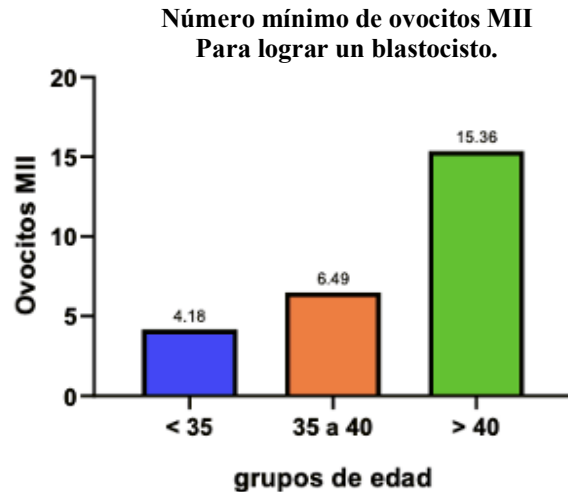


FIGURA No. 2.
Número mínimo requerido de ovocitos maduros MII; para obtener por lo menos un blastocisto.

Índice de masa corporal.

Posterior al realizar un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el índice de masa corporal (IMC); observamos como no existieron resultados significativos; en primer lugar, con el IMC y el grupo de edad, (Valor de P de 0.8400. Figura 3, Tabla 6). En segundo lugar, en relación con el IMC y posibilidad de obtener un blastocisto (Valor de P de 0.6593. Figura 4, Tabla 6). De igual manera al comparar el Índice de Masa Corporal con cada uno de los grupos de edad, no se encontró significancia estadística. (Pacientes menores de 35 años. P = 0.6467. Pacientes de 35 a 40 años. P = 0.2399. Pacientes mayores de 40 años. P= 0.4432). **Tabla No. 6.**

Figura No. 3
Relación del IMC con los grupos de edad.

No existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos de edad y el Índice de Masa Corporal.
P = 0.8400

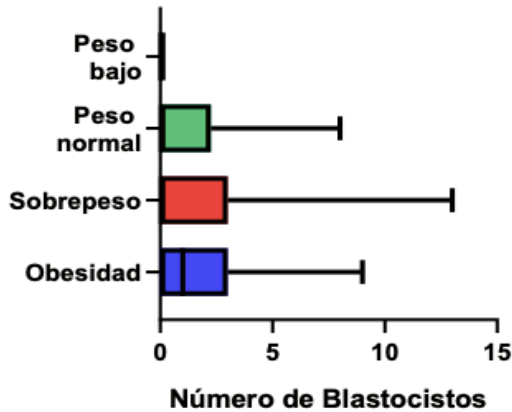
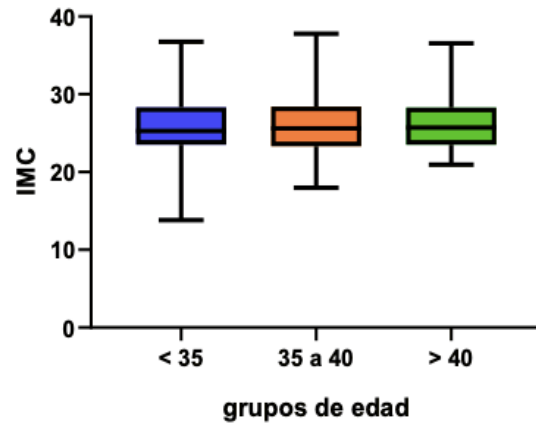


Figura No. 4 .
Relación del IMC y Posibilidad de obtención de Blastocistos.

Sin relación entre el estrato de peso y la posibilidad de obtención de blastocistos.
(P = 0.6503)

Tipo de Infertilidad.

Referente al tipo de infertilidad, como ya se mencionó; el 58.61 % de las pacientes tienen diagnósticos de infertilidad primaria (22.02 % menores de 35 años / 33.39 % entre 35 y 40 años / 3.20 % mayores de 40 años); el 41.39 % de tipo secundario (11.90% menores de 35 años / 27 % entre 35 y 40 años / 2.49 % mayores de 40 años). **Figura No. 6.**

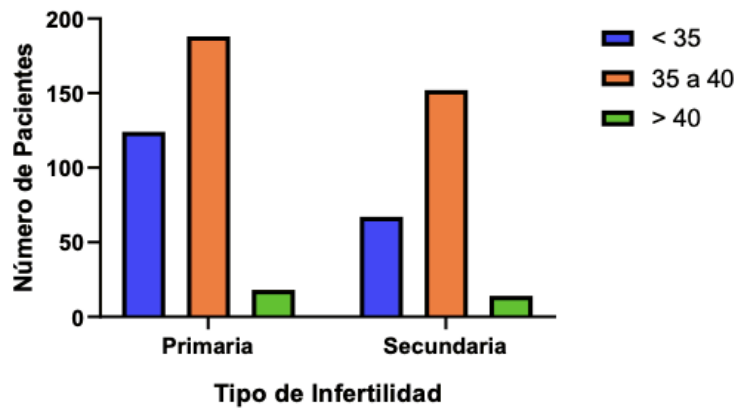
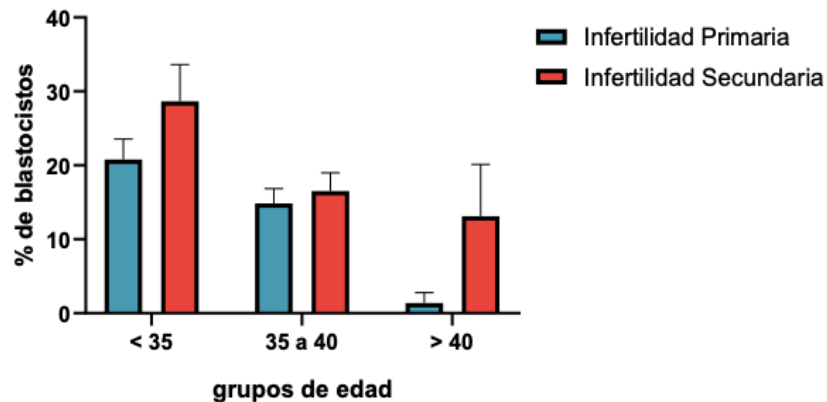


Figura No 6. Tipo de infertilidad y su relación con los diferentes grupos de edad.

Para calcular el efecto de la infertilidad con respecto a la posibilidad o no de obtención de blastocistos, se realizó un análisis ANOVA de dos vías; en donde se demostró que no existía una relación directa entre el tipo de infertilidad y el éxito en obtención de blastocistos (Valor de P = 0.4310). **Figura No. 7.**

Figura No. 7.
No existe una relación entre el tipo de infertilidad y la posibilidad de obtención de un blastocisto.



Sin embargo, si existió una diferencia en el subanálisis por grupo de edad (Valor de P = 0.0008); se demostró que pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria existe diferencia significativa entre las menores de 35 y las mayores de 40 años. Respecto a la infertilidad secundaria, existió diferencia entre las pacientes menores de 35 años y las de 35 a 40 años. **Tabla No. 5.**

TABLA No. 5. Relación del tipo de infertilidad, estratos de edad y posibilidades de obtener un blastocisto.

TIPO DE VARIABLE.	Diff.	95.00% CI	P Value
Infertilidad Primaria			
< 35 vs. 35 a 40	5.940	-2.323 to 14.20	0.2101
< 35 vs. > 40	19.40	1.386 to 37.42	0.0312
35 a 40 vs. > 40	13.46	-4.161 to 31.08	0.1722
Infertilidad Secundaria			
< 35 vs. 35 a 40	12.11	1.636 to 22.58	0.0186
< 35 vs. > 40	15.54	-5.449 to 36.53	0.1913
35 a 40 vs. > 40	3.430	-16.52 to 23.38	0.9140

Tipo de protocolo de estimulación ovárica.

Respecto al tipo de estimulación ovárica, los protocolos utilizados, fueron los siguientes: Mínima estimulación, convencional, dosis altas, únicamente fármacos orales y protocolo de Shanghai. Al realizar prueba de ANOVA de una vía, se demostró que no existía relación con la posibilidad de obtención de blastocistos, y que esta era independiente al protocolo empleado (Valor de $P = 0.1993$). **Figura No. 8.** No solo para el tipo de esquema, sino también para la subclasificación de la edad. Pacientes menores de 35 años (Valor de $P = 0.1913$); pacientes de 35 a 40 años (Valor de $P = 0.5968$) y pacientes mayores de 40 años (Valor de $P = 0.9779$).

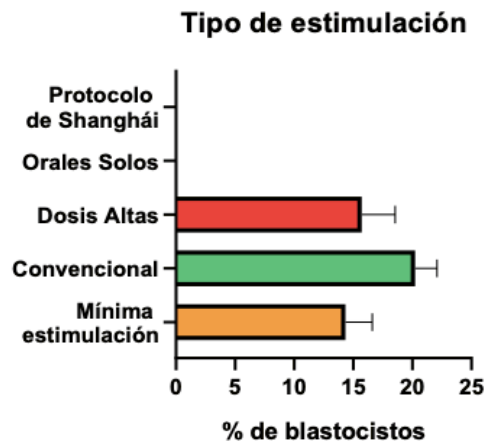


Figura No. 8.
Sin diferencia entre el esquema de estimulación y la posibilidad de blastocisto. ($P = 0.1993$).

Tipo de maduración final ovocitaria.

Posterior a comparar ambas estrategias de disparo, no se logró establecer alguna diferencia significativa entre HCG vs Agonista de GnRH. Ambas alternativas, no generaron mayor posibilidad de obtener blastocistos (Valor de $P = 0.9382$). Es interesante mencionar que el 93.2% del total de los ciclos en el servicio, son disparados con HCG.

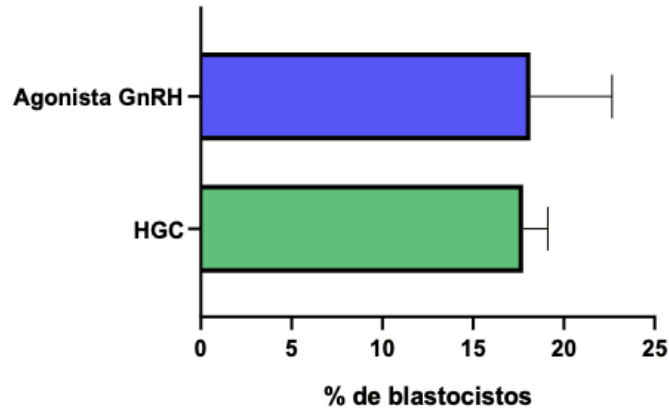


Figura No. 9.
Sin diferencia significativa en la obtención de blastocistos, respecto al tipo de maduración final.

Tabla No. 6. Resumen de cada uno de los factores evaluados y su resultado estadístico en la obtención de blastocistos.

Factores asociados al ciclo de IVF con posible efecto en la obtención de blastocistos.		Valor de P	
Factores Antropométricos.	Peso (IMC).	0.8400	
	Edad.	< 35 años.	< 0.0001
		35 a 40 años.	< 0.001
		> 40 años.	< 0.001
			0.1433
	Edad y Folículos obtenidos.	0.0028	
Edad y ovocitos obtenidos.	<0.001		
Factores relacionados con el ciclo de IVF – ICSI.	Protocolo de estimulación.	0.1993	
	Tipo de Maduración ovocitaria.	0.9382	
Factores asociados al diagnóstico.	Infertilidad Primaria vs Secundaria.	0.4310	

DISCUSIÓN.

Nuestro estudio permitió evaluar de una manera global las características demográficas, bioquímicas y ultrasonográficas de las pacientes del servicio de Biología de la Reproducción Humana del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. Se identificó que los principales diagnósticos son: en primer lugar el factor tubo peritoneal, en segundo lugar el factor ovárico, en tercer lugar el factor tiroideo⁽³⁶⁾; de igual manera se identificó que la mayoría de las pacientes poseen más de un diagnóstico asociado; respecto al factor masculino, este se presentó en el 36% de las parejas; coincidiendo con la literatura internacional, que lo suele mencionar exclusivo en el 20%, pero estando presente hasta en el 30 – 40% de las parejas infértiles⁽³⁷⁾.

La mayoría de las pacientes se encontraban en el grupo de edad de 35 a 40 años, con una media de 6.65 años de infertilidad y el tipo que fue mas prevalente fue la primaria con el 58.61% del total de las pacientes. Respecto al tipo de protocolos utilizados en el servicio, el más común fue el protocolo convencional, seguido del protocolo de dosis altas y en tercer lugar el de mínima estimulación. Se encontró, que el protocolo de dosis altas se utiliza más en pacientes menores de 35 años, y el protocolo convencional en pacientes mayores de 35 años. Respecto a los resultados de la estimulación ovárica; únicamente el 63.11% del total de ovocitos obtenidos eran maduros MII (menor al 80% de madurez por ciclo, considerado como normal); una media de fertilización de 3.85 ovocitos por ciclo, de los cuales sólo el 17.78% de estos llegaban a estadio de blastocisto. Es importante mencionar, que la cantidad de ovocitos maduros MII para lograr un blastocisto es un parámetro de medida importante, ya que estos son los gametos que originarán un embrión y posterior un recién nacido vivo. Actualmente, cada vez son mas los artículos que plantean la necesidad de realizar protocolos de estimulación personalizados, estableciendo desde un principio objetivos claros sobre dosis de estimulación, ovocitos y número de embriones requeridos⁽³⁹⁾. Si bien es cierto que la tasa de nacidos

vivos sería el parámetro que con mayor objetividad traduce el éxito de un tratamiento de reproducción asistida; este depende de un número muy amplio de factores que algunos van ligados con el médico y otros están fuera de su alcance, lo que hace difícil establecer predicciones sobre la cantidad de folículos, ovocitos y embriones para lograr el objetivo deseado.

Respecto a los objetivos principal de esta investigación; determinar el o los parámetros; demográficos, ultrasonográficos, bioquímicos y/o farmacológicos que puedan interferir con la posibilidad de obtener un blastocisto en un ciclo de IVF-ICSI. Se demostró mediante el cálculo de coeficiente de Pearson y el análisis de varianza ANOVA, que la edad en la mujer es por mucho, el predictor de mayor peso en la obtención de blastocistos, (Resultados similares fueron publicados por Esteves Et AL)⁽³⁸⁾. Ningún otro factor demostró una relación directa y clara en la obtención de blastocistos, específicamente medidos, fueron el: Índice de masas corporal, el tipo de estimulación, el fármaco para inducir la maduración final ovocitaria y la infertilidad. Conclusiones semejantes a las de Vaiareli et Al ⁽³⁹⁾; de interés es el cálculo de ovocitos maduros MII mínimos necesarios para poder llegar a obtener un blastocisto, que por grupo de edad encontramos que fueron los siguientes: pacientes menores de 35 años 4.18 ovocitos MII, pacientes de 35 a 40 años 6.49 ovocitos MII y mayores de 40 años 15.36 ovocitos MII. Siendo esta una relación inversamente proporcional con la edad.

Algunas de las limitaciones de este estudio son el diseño de la investigación (observacional), así como la incapacidad de demostrar la euploidia o aneuploidía de los blastocistos, siendo necesaria la realización de una biopsia de trofoectodermo (PGT-A), la cual no se encuentra disponible en el instituto. Partiendo de la premisa que no por tratarse de un blastocisto, se garantiza su integridad cromosómica. Por otro lado algunas de las fortalezas son la amplia descripción de la población de estudio, en cuanto a aspectos clínicos, demográficos, bioquímicos y ultrasonográficos; así como demostrar que factores pueden interferir en la obtención de un embrión de mejor calidad.

Por otro lado, no se cuenta con publicaciones similares en la literatura nacional y/o con población mexicana o latinoamericana, ya que gran parte de las revisiones al momento, son grupos europeos, asiáticos o norteamericanos.

CONCLUSIONES.

De los parámetros estudiados, el único relacionado con la obtención de un blastocisto, fue la edad. Independiente a esto, fueron los parámetros bioquímicos, ultrasonográficos, índice de masa corporal, tipo de estimulación ovárica y el fármaco desencadenante de la maduración final ovocitaria. Es de suma importancia individualizar los protocolos de estimulación de acuerdo con las características de las pacientes; así como plantear objetivos / metas desde el inicio del tratamiento reproducción asistida.



GOBIERNO DE
MÉXICO



ISSSTE
INSTITUTO DE SEGURIDAD
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO



2020
LEONA VICARIO
ANIVERSARIO DE LA UNIÓN

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

Dirección

Subdirección de Enseñanza e Investigación

Coordinación de Investigación

Oficio N°. 96.202.13.2/1142/2020

Asunto: **Protocolo Aprobado**

Ciudad de México a 30 de junio de 2020

Dr. Jesús Daniel Moreno García
Servicio de Biología de la Reproducción Humana
Presente.

Se hace de su conocimiento que el protocolo de investigación Titulado: **Correlación de los parámetros demográficos, ultrasonográficos, bioquímicos y biológicos; con el número de Blastocistos en pacientes sometidas a ciclos de FIV - ICSI.**

Donde funge como responsable del trabajo de investigación de fin de curso del servicio de **Biología de la Reproducción Humana** a del residente: **Dr. David Emiliano Hernández León.**

El cual ha sido evaluado por los comités de Investigación. Ética en Investigación y Bioseguridad locales quienes lo han aprobado y ha quedado registrado en el Departamento de Investigación dependiente de la Dirección Médica con Folio: **216.2020**

Por lo que a partir de esta fecha podrá iniciar la investigación y **deberá** cumplir cabalmente con lo estipulado en la Ley General de Salud en materia de Investigación en seres humanos.


Así mismo, deberá entregar a esta Coordinación de forma trimestral el **"Formato de Seguimiento"** donde se consignent los avances de la investigación en cuestión. De la misma manera en el mismo formato al término de la investigación se deben de incluir los resultados y conclusiones del mismo, para poder dar por concluida la investigación.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo y lo invito a seguir en el camino de la investigación en salud.

Atentamente

Vo. Bo.


Dr. Paul Mondragón Terán
Coordinador de Investigación


Dr. Félix Octavio Martínez Alcalá
Encargado de la Subdirección de
Enseñanza e Investigación.

De acuerdo al Oficio No. 96.200.11.1/0252/2020 de fecha 01/04/2020

c.c.p.- Minuta Coordinación de Investigación.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Zagers-Hochschild. International Glossary on Infertility and Fertility Care. Fertil Steril 2017.
- 2.- Mascarenhas, M.N., et al., National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med, 2012. 9(12): p. e1001356.
- 3.- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic Evaluation of the infertile female: a committee opinion. Fertility and Sterility. Vol. 103, No. 6, June 2015.
- 4.- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic Evaluation of the infertile male: a committee opinion. Fertility and Sterility. Vol. 103, No. 3, March 2015.
- 5.- Hur C, Rehmer J. Et Al. Uterine factor infertility: A Clinical Review. Clinical Obstetrics and Gynecology. Volume 62, Number 2. 2019. Pp 257 – 270.
- 6.- Men Q, Ren A. Et Al. Incidence of infertility and risk factors of impaired fecundity among newly married couples in a Chinese population. Reproductive BioMedicine Online. Volume 30, No. 1. January 2015.
- 7.- Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes. RBMO. Volume 38, ISSUE 2. 2019.
8. Rudnicka E, Kruszewska J. Et Al. Premature Ovarian Insufficiency – etiopathology, epidemiology; and diagnostic evaluation. Menopause Rev 2018; 17(3): 105 – 108.
- 9.- Milachich T, Shterev A. Et Al. Are there optimal number of oocytes, spermatozoa and embryos in assisted reproduction? JBRA Assisted Reproduction 2016; 20(3): 142-149.
- 10.- Varmey B, Chua S. Et Al. Is there an association between oocyte number and embryo quality? A systematic review and meta-analysis. RBMO. Volume 39 ISSUE 5. 2019.
- 11.- Baker L, Brown M. Et Al. Association of number of retrieved oocytes with live birth rate and birth weight: an analysis of 231,815 cycles of in vitro fertilization. Fertility and Sterility, Vol 103, No. 4, April 2015.
- 12.- Labarta E, Bosch E. Et Al. A Higher Ovarian Response after Stimulation for IVF Is Related to a Higher Number of Euploid Embryos. BioMed Research International. Volume 2017.
- 13.- Sunkara SK, Rittenberg V. Et Al. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. Human Reproduction, Vol 26, No. 7pp. 1768-1774, 2011.
- 14.- Labarta E, Bosch E. Et Al. A Higher Ovarian Response after Stimulation for IVF Is Related to a Higher Number of Euploid Embryos. BioMed Research International. Volume 2017.
- 15.-Baart E, Et Al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. Human Reproduction. Vol 22, No. 4 pp 980-988, 2007.
- 16.- Vaneties C.A, Kolibianakis E.M. Et Al. Progesterone Elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. Human Reproduction Update, Vol 19, No. 5 pp 433-457, 2013.

- 17.- Bianchi S, Macchiarelli G. Et Al. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:1343 – 1358.
- 18.- Margalit T, Ben-Haroush A. Et Al. Morpho kinetic characteristics of embryos derived from in-vitro-matured oocytes and their in-vitro-matured siblings after ovarian stimulation. *Reproductive BioMedicine Online*, 2018.
- 19.- Rubino P, Viagnó P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Human Reproduction Update*, Vol 22, No. 2 pp. 194 – 227, 2016.
- 20.- De Vincetis S, De Martino E. Et Al. Use of Metaphase I oocytes matured in vitro is associated with embryo multinucleation. *Fertility and Sterility*, Vol. 99, No. 2, February 2013.
- 21.- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, Vol. 26, No. 6 pp. 1270 – 1283, 2011.
- 22.- Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *RBM Online*. Vol 12. No 2. 2006 234 – 253.
- 23.- Rienzi L, Cobo A. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort. *Human Reproduction*, Vol. 27, No.6 pp. 1606 – 2012.
- 24.- Cobo A, Garrido N. Et Al. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reproductive BioMedicine Online* (2012) 24, 424 – 432.
- 25.- The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility* Vol 99, No 1. January 2013.
- 26.- Cobo A, Garcia-Velasco J. Oocyte Vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and Sterility* Vol 105, No 3, March 2016.
- 27.- Esteves S, Carvalho J. Et Al. A Novel Predictive Model to Estimate the Number of Mature Oocytes Required for Obtaining at Least One Euploid Blastocyst for Transfer in Couples Undergoing in vitro Fertilization / Intracytoplasmic Sperm Injection: The ART Calculator. *Frontiers in Endocrinology*. February 2019. Volume 10. Article 99.
- 28.- Papanikolaou E, Camus M. Et Al. In Vitro Fertilization with Single Blastocyst-Stage versus Single Cleavage-Stage Embryos. *N Engl J Med* 2016; 354: 1139 – 46.
- 29.- Forman E, Tao X. Et Al. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improve ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Human Reproduction*, Vol. 27, No.4 pp. 1217- 1222, 2012.
- 30.- Glujovsky D, Farquhar C. Et Al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review). *Cochrane Database of Systemic Review*, 2016. Issue 6. Art No.: CD002118.
- 31.- Papanikolaou E, Kolibianakis M. Et Al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocyst or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and

meta-analysis.

32.- De Vos C, Van Lisbet. Et Al. Cumulative live birth rates after fresh and vitrified cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in the first treatment cycle. *Human Reproduction*, Vol. 31, No. 11 pp. 2442 – 2449, 2016.

33.- Esteves S, Carvalho F. Et Al. A Novel Predictive Model to Estimate the Number of Mature Oocytes Required for Obtaining at Least One Euploid Blastocyst for Transfer in Couples Undergoing *in vitro* Fertilization / Intracytoplasmic Sperm Injection: The ART Calculator. *Frontiers in Endocrinology*. February 2019. Volume 10. Article 99.

34.- Forman E. Hong K. Et Al. *In vitro* Fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*. Vol 100, No 1. July 2013. 0015 – 0282.

35.- Levi-Setti P, Cirillo F. No advantage of fresh blastocyst versus cleavage stage embryo transfer in women under the age of 39: a randomized controlled study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2018) 35: 457 – 465.

36.- Khachikovna Et Al. Does subclinical hypothyroidism and/or thyroid autoimmunity influence the IVF/ ICSI outcome Review of the literatura. *Gynecologica Endocrinology*. 2019. Vol 35. No 1.

37.- Practice committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male. A committee Opinion. Vol 103, No 3. 2015.

38.- Esteves Et Al. A Novel Predictive Model to Estimate the Number of Mature Oocytes Required for Obtaining at Least One Euploid Blastocyst for Transfer in Couples Undergoing *in vitro* Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection: The ART Calculator. *Frontiers in Endocrinology*. 2019.

39.- Esteves Et Al. A Novel Predictive Model to Estimate the Number of Mature Oocytes Required for Obtaining at Least One Euploid Blastocyst for Transfer in Couples Undergoing *in vitro* Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection: The ART Calculator. *Frontiers in Endocrinology*. 2019.