

Universidad de Oviedo

Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción

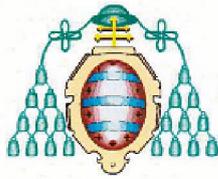
Calidad ovocitaria y embrionaria en pacientes con alta respuesta ovárica a tratamientos de FIV

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

Santiago Rubén Carro Esteban

Junio 2013



Universidad
de Oviedo



D. Ignacio Santiago Álvarez Miguel, Catedrático de la Universidad de Extremadura y Director Científico de IERA-GC, y

D. Celestino González González, Coordinador del Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción y Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Oviedo, por la presente

INFORMAN:

Que el alumno del Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción de la Universidad de Oviedo *D. Santiago Rubén Carro Esteban* ha realizado bajo su supervisión el Trabajo Fin de Máster titulado “CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA EN PACIENTES CON ALTA RESPUESTA OVÁRICA A TRATAMIENTOS DE FIV”. Dicho trabajo cumple con las directrices exigidas y por ello autorizan la presentación del mismo.

Para lo cual firman la presente en Oviedo a 4 de junio de 2013.

Fdo. Dr. I. Santiago Álvarez Miguel

Fdo. Dr. Celestino González González

Quiero expresar mi agradecimiento a todo el personal de IERA-GC de Badajoz y especialmente a mi tutor, el Dr. I. Santiago Álvarez Miguel, por dirigir este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Celestino González González todo su apoyo como mi tutor en Oviedo.

Índice

1. Introducción.....	3
1.1 Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.....	3
1.2 Análogo de GnRH.....	6
1.3 Vitrificación de embriones.....	7
1.4 Calidad ovocitaria y embrionaria.....	8
2. Hipótesis y Objetivos.....	10
3. Materiales y Métodos.....	11
3.1 Poblaciones de estudio.....	11
3.2 Obtención y procesamiento de los ovocitos.....	11
3.3 Obtención y procesamiento de los espermatozoides.....	13
3.4 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.....	13
3.5 Valoración de la fecundación y de la calidad embrionaria.....	14
3.6 Vitrificación de embriones.....	15
3.7 Transferencia de embriones.....	15
3.8 Diagnóstico de embarazo.....	16
3.9 Análisis estadístico.....	16

4. Resultados.....	17
4.1 Edad y niveles hormonales.....	17
4.2 Calidad ovocitaria y fecundación.....	20
4.3 Calidad embrionaria y embarazo.....	24
5. Discusión.....	26
6. Conclusiones.....	30
7. Bibliografía.....	31

1. Introducción

1.1 Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es el desorden hormonal más común en mujeres en edad reproductiva, con una prevalencia de entre el 10 y el 15%. Para su diagnóstico la manifestación clínica debe incluir dos de los siguientes factores: oligomenorrea o amenorrea, hiperandrogenismo y la presencia de ovarios poliquísticos en ecografía (Fauser y cols., 2012). La causa principal de este síndrome parece tener base genética. Existe una relación del SOP con aneuploidías y poliploidías del cromosoma X, además de otras alteraciones genéticas, como deleciones del cromosoma 11 (Meyer y cols., 2000; Hickey y cols., 2002). El SOP es el principal factor de riesgo que predispone para desarrollar el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO).

El SHO es una de las complicaciones más graves secundaria a los tratamientos de reproducción asistida y consiste en una respuesta anormalmente alta de los ovarios a la estimulación hormonal. El primer caso de SHO debido a una estimulación artificial en un ciclo de FIV (fecundación *in vitro*) tuvo lugar en 1984 (Friedman y cols., 1984). Desde entonces, su incidencia en los ciclos de FIV varía entre el 0,6% y el 10% mientras que la incidencia de las formas graves oscila entre 0,25-1,8% (Azcona y cols., 2009). Su evolución es autolimitada y cursa paralela a los niveles de β -hCG en sangre. En función del momento de aparición, podemos definir un SHO temprano que está desencadenado por la hCG exógena y se presenta 3-7 días después de la administración de ésta; mientras que el SHO tardío sucede de 10 a 17 días después de la administración de la hCG y prolonga o agrava un síndrome inicial, pues está en relación con la producción endógena de hCG por el trofoblasto.

El síndrome cursa de forma variable y, en los casos graves, presenta, entre otras manifestaciones, ascitis, hipotensión, derrame pleural, hemoconcentración y oliguria e, incluso en casos extremos, síndrome de distrés respiratorio, fallo renal, fallo hepático, shock hipovolémico, fenómenos tromboembólicos y fallecimiento (Whelan y cols., 2000) (Tabla 1). La característica principal de estas manifestaciones es el aumento de permeabilidad capilar ocasionada por diversos mediadores de la acción de la hCG. El

factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), entre las moléculas vasoactivas implicadas en la etiopatogenia, presenta un papel preponderante, como sugieren varios trabajos (Gómez y cols., 2010; Ajonuma y cols., 2011; Pietrowski y cols., 2012). Otros factores posiblemente implicados son el sistema renina-angiotensina ovárico, citoquinas como la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6), y las prostaglandinas (Amato y cols., 2003; Wei y cols., 2013).

Tabla 1. Síntomas según el grado del SHO (modificado de Azcona y cols., 2009).

Grado	Síntomas
SHO leve Grado I	Distensión abdominal Dolor abdominal leve Tamaño ovárico habitualmente menor de 8 cm.*
SHO moderado Grado II	Dolor abdominal moderado Náuseas, vómitos y/o diarrea Evidencia ecográfica de ascitis Tamaño ovárico habitualmente de 8-12 cm.*
SHO grave Grado III	Ascitis clínica, frecuentemente con hidrotórax Oliguria con aumento de la creatinina Hemoconcentración (Hto. > 45% o incremento de > 30%, respecto al valor previo) Hiponatremia Trastornos de la coagulación Trastornos de la función hepática (apreciables en el 25-40% de los casos) Tamaño ovárico habitualmente mayor de 12 cm.*
SHO crítico	Ascitis a tensión o hidrotórax severo Hematocrito >55% Leucocitosis > 25.000/ml Fallo renal. Creatinina >1,6mg/dl. Accidente tromboembólico Síndrome de distress respiratorio del adulto

* El tamaño ovárico puede no estar relacionado con la severidad del SHO en los casos de reproducción asistida debido al efecto de la aspiración folicular.

Además del SOP, otros factores de riesgo primarios para el desarrollo del SHO serían: edad joven (menos de 35 años), historia de SHO previo, niveles altos de la hormona antimülleriana (AMH, *anti-müllerian hormone*), recuento alto de folículos antrales (más de 20 folículos en ecografía), estradiol (E2) mayor de 3.000 pg/ml, niveles altos de progesterona y más de 15 ovocitos recuperados en punción (Enskog y cols., 1999; Chen y cols., 2003) (Figura1). Otro factor de riesgo parece ser la presencia de alergias previas a diferentes sustancias, debido a que en la hiperestimulación participan citoquinas inmunomoduladoras. Existen estudios que afirman que las diferencias en la

sensibilidad inmunológica de estas mujeres podrían ser una señal predictiva de SHO (Enskog y cols., 1999; Delvigne & Rozenberg, 2002).



Figura 1. Ecografía de la hiperestimulación ovárica (modificado de Azcona y cols., 2009).

Una vez identificadas las pacientes con riesgo de SHO se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de prevención:

- Estimulación con bajas dosis de gonadotropinas.
- Inducción de la maduración final ovocitaria con un análogo de la GnRH que provocará el pico endógeno de LH (Humaidan y cols., 2011).
- Soporte de la fase lútea con progesterona en vez de con hCG (Aboulghar y cols., 2003).
- Mantenimiento de los agonistas de la GnRH tras la captación ovocitaria o cuando se cancela el ciclo (Giles y cols., 2009).
- Administración continuada de un inhibidor de la aromatasa, como el letrozol (García-Velasco y cols., 2009).
- Uso de agonistas de la dopamina (Busso y cols., 2009).

- *Coasting*, que consiste en el retraso de la aplicación de la hCG, pero con el mantenimiento de los análogos de la GnRH hasta que los valores de E2 descienden a valores seguros (Mansour y cols., 2005).
- Maduración *in vitro* de los ovocitos de estas pacientes (Yang y cols., 2005; Huang y cols., 2010).
- Vitrificación de ovocitos o embriones y transferencia en un ciclo posterior (Sills y cols., 2008).
- Cancelar el ciclo y no administrar hCG.

En el caso de que la paciente desarrolle el SHO deberá someterse a un estricto control médico que incluya tratamientos como: perfusión de albúmina u otros coloides, uso de heparina de bajo peso molecular, o paracentesis evacuadora (Chen y cols., 2003). El tratamiento en las formas leves y moderadas puede ser ambulatorio y se basa en el reposo, empleo de analgésicos y antieméticos, junto con una correcta hidratación (Aboulghar y cols., 2010). Entre los criterios de hospitalización se incluye el dolor abdominal intenso, aparición de náuseas y vómito, oliguria grave o anuria, ascitis, disnea, hipotensión y alteraciones electrolíticas graves (*The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2008). En la actualidad, con la combinación de bajas dosis de gonadotropinas en protocolos con antagonistas de la GnRH y con el uso de los agonistas de la GnRH en la inducción del pico ovulatorio, la incidencia del SHO debería ser muy baja (Humaidan y cols., 2011).

1.2 Análogo de GnRH

Uno de los análogos de la GnRH más ampliamente utilizados en la actualidad en los tratamientos de FIV es la triptorelina. Actúa a nivel adenohipofisario, estimulando la síntesis y liberación de las gonadotropinas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículoestimulante). El incremento de los niveles de gonadotropinas ocasiona el aumento de la producción de estrógenos en ovario, que a su vez inhiben la producción hipotalámica de GnRH, por feed-back negativo, retroalimentando el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. La triptorelina es una molécula formada por

(Sills y cols., 2008). Varios estudios han puesto de manifiesto que no hay diferencias significativas entre las tasas de embarazo de transferencias de embriones o blastocistos frescos y congelados (Pavone y cols., 2011). Además, la vitrificación de embriones para moderar la severidad y duración del SHO no compromete el resultado para las mujeres en riesgo de SHO (Fitzmaurice y cols., 2008). Incluso en un estudio llevado a cabo en 2011 se obtuvieron tasas de fecundación y de embarazo mayores con embriones congelados de pacientes con SHO que con embriones transferidos en fresco de mujeres sin síntomas de hiperestimulación (Sabatini y cols., 2011).

Otros autores afirman que los embriones congelados de pacientes con SHO presentan una peor calidad, incidiendo de forma negativa en las tasas de embarazo. El daño de la congelación se agravaría en los embriones procedentes de ovocitos madurados *in vitro* (Chen y cols., 2007). Asimismo, en una revisión sobre esta estrategia (Angelo y cols., 2002) no se encontraron diferencias significativas en la incidencia del SHO cuando se comparó la criopreservación de todos los embriones con la administración intravenosa de albúmina y la transferencia en fresco de los embriones en mujeres con riesgo de desarrollar SHO.

La combinación de varias estrategias de prevención del SHO, como son la utilización de un análogo de la GnRH y la vitrificación de los embriones, parece ser el tratamiento más efectivo y recomendado para disminuir los riesgos del SHO y obtener una buena tasa de embarazos (Ferraretti y cols., 1999; Griesinger y cols., 2007; Imbar y cols., 2012).

1.4 Calidad ovocitaria y embrionaria

Por lo general las pacientes con SHO presentan una tasa mayor de aborto, que podría deberse a varias causas: hipersecreción de LH, hiperandrogenismo o hiperinsulinemia (Van der Spuy y cols., 2004). Otros factores implicados en la patogénesis del aborto podrían ser: disminución del inhibidor del activador del plasminógeno o disfunciones del endotelio. Aunque durante años se propuso la utilización de agentes sensibilizantes a la insulina, como la metformina (Kjotrod y cols., 2004), para la disminución de esta mayor incidencia de aborto, estudios más recientes

no demuestran ningún tipo de efecto positivo sobre la tasa de aborto (Palomba y cols., 2009).

La observación de un elevado número de ovocitos inmaduros en las punciones de mujeres con SHO se relaciona con la alta repuesta ovárica a la cual este grupo de pacientes tiene especial tendencia y se traduce en menores tasas de gestación y mayores tasas de aborto respecto a las pacientes que responden con normalidad (Cano *et al.*, 1997). El SHO se relaciona con una calidad ovocitaria deficiente mediante la alteración en la maduración de los ovocitos de los folículos intermedios. Las concentraciones excesivamente altas de E2 sérico podrían explicar los porcentajes significativamente más bajos de ovocitos de buena calidad (Santos y cols., 2010). Existen estudios que encuentran una disminución significativa en la calidad ovocitaria cuando aumenta el número de ovocitos recuperados (Giles y cols., 2009; *Humaidan* y cols., 2011). Sin embargo, a pesar de encontrar un defecto de calidad y madurez ovocitaria, que se traduce en bajas tasas de fecundación, en general no se describen peores tasas de embarazo ya que el número de embriones de buena calidad por ciclo no está alterado significativamente (Pellicer y cols., 1989). En muchos casos, los factores que conlleva el SOP podrían ser los responsables de la baja calidad ovocitaria y embrionaria, ya que muy frecuentemente se encuentra presente en los casos de SHO (Berker y cols., 2009; Mashlach y cols., 2010; Qiao y cols., 2011).

Otros estudios no observan ningún dato que relacione de forma significativa la mala calidad ovocitaria con el SHO (Anuradha y cols., 2005; Jeroen y cols., 2006). Igualmente, se han obtenido resultados en los que la calidad ovocitaria no se ve comprometida en mujeres con SHO, independientemente de si las pacientes tenían o no SOP (Fàbregues y cols., 2004).

2. Hipótesis y Objetivos

Trabajaremos sobre la hipótesis de que el SHO afecta negativamente a la calidad ovocitaria y embrionaria y, por lo tanto, se obtendrán menores tasa de fecundación y de embarazo. La utilización de un análogo de la GnRH y la vitrificación de los embriones, sería el tratamiento más efectivo para disminuir los riesgos del SHO y obtener buenos resultados.

El objetivo de este trabajo es evaluar la calidad ovocitaria y embrionaria en pacientes con SHO, así como todos aquellos factores relacionados con el SHO.

3. Materiales y Métodos

3.1 Poblaciones de estudio

El estudio se ha llevado a cabo en el Instituto Extremeño de Reproducción Asistida-González Carrera (IERA-GC), Badajoz, España. Se incluyen un total de 172 pacientes que realizaron un ciclo de ICSI en el periodo transcurrido desde mayo de 2009 a diciembre de 2012, distribuidas en tres poblaciones:

- Estradiol alto (E2 alto) (n=60). Son pacientes con alta respuesta ovárica. Presentan niveles altos de estradiol (≈ 3000 pg/ml) el día en que se desencadena la inducción de la ovulación con hCG, pero sin riesgo de desarrollar SHO. Se lleva a cabo la transferencia de los embriones en fresco.
- Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO) (n=52). Son pacientes con alta respuesta y cuya transferencia ha sido anulada por riesgo de SHO. La ovulación se desencadena con Decapeptyl. Se realiza una transferencia posterior de los embriones que han sido vitrificados.
- Receptoras de ovocitos donados (Ovodón) (n=60). Son pacientes con respuesta ovárica normal. Las donantes han tenido una ovulación desencadenada con Decapeptyl y la transferencia de los embriones se ha realizado en fresco.

Antes de iniciar el ciclo, a ambos miembros de la pareja se les realiza un cariotipo y sólo los que presentan un resultado normal son admitidos. La calidad seminal no se ha tenido en cuenta en el estudio a la hora de evaluar la calidad embrionaria.

3.2 Obtención y procesamiento de los ovocitos

En los tres grupos de pacientes se sigue un protocolo de estimulación con antagonistas de la GnRH y con Gonal (Merck[®], Alemania) como FSH y Menopur

(Ferring[®], Alemania) como hMG. Las dosis normales son 150-225UI de FSH diarias desde el tercer día, aunque las pautas y dosis administradas son personalizadas para cada paciente. El día 5 del ciclo de estimulación se añade el antagonista, Orgalutrán (Merck[®]) y si la respuesta ha sido baja ese día también se añade una ampolla de Menopur. La estimulación se mantiene hasta el día 8 como mínimo y la media de días de estimulación es 9. Cuando se alcanzan al menos 3 folículos mayores de 17 mm en ecografía vaginal se desencadena la inducción de la ovulación. En el grupo de pacientes con E2 alto la ovulación se desencadena con una inyección de hCG recombinante, Ovitrelle (Merck[®]). En el caso de las pacientes con SHO y las donantes del grupo de Ovodón se les administra un análogo de la GnRH, 3 ampollas de Decapeptyl. Ese mismo día se miden los niveles séricos de estradiol y progesterona. La punción folicular se realiza 36 horas después.

Las pacientes receptoras de ovocitos del grupo de Ovodón son tratadas con estrógenos para asegurar un crecimiento endometrial adecuado. Se puede hacer un ciclo natural, pero ante la posibilidad de que no se produzca un endometrio adecuado (la edad media de estas pacientes es de 38,32 años) y al estar la donante programada para un día determinado, es mejor un ciclo tratado con estradiol.

La punción folicular transvaginal se lleva a cabo en el quirófano bajo sedación total. Se realiza la aspiración del líquido folicular en el cual están contenidos los ovocitos. Una vez pinchados todos los folículos, el líquido aspirado se observa a la lupa en el laboratorio de FIV para localizar todos los complejos cúmulo oóforo-ovocito. Estos complejos son lavados con medio G-Mops Plus (Vitrolife[®], Suecia), que está tamponado y tiene albúmina sérica humana en su composición. A continuación, son incubados a 37°C y 6% CO₂ en medio ISM-1(Origio[®], Dinamarca) durante 2 horas. Después, se desnudan los ovocitos de sus cúmulos mediante digestión enzimática con hialuronidasa y con ayuda de pipetas Stripper de Origio[®]. Se procede a evaluar el estado de maduración de los ovocitos al microscopio invertido, seleccionando sólo aquellos que se encuentran en metafase II (MII) para realizar la inyección entracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*). Estos ovocitos son incubados de nuevo en medio ISM-1 en las mismas condiciones anteriores durante aproximadamente 1 hora hasta la realización de la ICSI.

3.3 Obtención y procesamiento de los espermatozoides

Las muestras de semen se obtienen en las instalaciones de la clínica mediante masturbación después de 3-5 días de abstinencia sexual. Para recoger la muestra se utilizan recipientes estériles recubiertos con quimi tripsina para acelerar la licuefacción del semen. Una vez obtenida la muestra, el recipiente se deposita sobre una placa calefactada a 37°C en la cabina de flujo y se espera unos 15-30 minutos hasta que licue por completo. Una vez licuadas, se mide el volumen y el pH de las muestras seminales, y se deposita una gota en una cámara Makler para observar la concentración, motilidad y morfología espermática iniciales.

En la preparación del semen para la ICSI se utiliza un método combinado de gradientes de densidad y swim-up. Primero se realiza un gradiente 90/45% con medio Supra Sperm (Origio[®]) y con el pellet de espermatozoides obtenido se lleva a cabo el swim-up con Sperm Preparation Medium (Origio[®]). El sobrenadante que contiene los espermatozoides con motilidad progresiva se recoge después de 45 minutos aproximadamente y se deja en la incubadora a 37°C y 5,5 % de CO₂ hasta la ICSI. Antes de realizar la ICSI, se evalúa la concentración y motilidad seminal en la cámara Makler, según los parámetros estándar de calidad seminal establecidos por la OMS (*World Health Organization laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, 2010).

En aquellos casos en los que se tiene que recurrir a semen de donante, las muestras proceden del Centro de Estudio e Investigación de la Fertilidad (CEIFER, Granada, España). Una vez descongeladas, estas muestras siguen el mismo método de preparación que las obtenidas en la clínica.

3.4 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Los ovocitos se colocan individualmente en microgotas de 5-8 µl de G-Mops Plus (Vitrolife[®]) y los espermatozoides se colocan en una gota de medio con Polivinil Pirrolidona (PVP) para disminuir su movimiento y poderlos inmovilizar. La gota de

PVP se deposita de forma que quede extendida formando una carrera que permita seleccionar los espermatozoides más fácilmente.

La selección de los espermatozoides que se van a inyectar se realiza en base a parámetros morfológicos y de motilidad. El espermatozoide debe ser inmovilizado con la pipeta de inyección, dañando la membrana plasmática del tercio proximal de la zona media de la cola. Al inmovilizar el espermatozoide, se rompe la membrana plasmática de la cola, lo que permite que moléculas de bajo peso molecular entren en la cabeza del espermatozoide y se liberen factores espermáticos de la región ecuatorial, que junto a factores ovocitarios facilitan la activación del ovocito (capacitación y reacción acrosómica).

Una vez inmovilizado el espermatozoide, se aspira en la pipeta de inyección por la cola y se lleva a la microgota donde está el óvulo para proceder a su microinyección para que penetre primero la cabeza, evitando la zona del corpúsculo polar.

Una vez microinyectados, se depositan en una placa GPS[®] con medio ISM-1(Origio[®]) y se introducen en el incubador a 37°C y 6% de CO₂. Se mantienen en cultivo en el mismo tipo medio hasta el día de la transferencia, cambiando la placa y renovando el medio en día +2.

3.5 Valoración de la fecundación y de la calidad embrionaria

A la mañana siguiente de haber realizado la ICSI se valora el número de ovocitos fertilizados en el microscopio invertido. Los cigotos presentarán de una forma clara dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

El desarrollo y la calidad embrionaria se valoran en día +2 y día +3 también al microscopio invertido. Para ello, se siguen los criterios para la clasificación de los embriones establecidos por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR, Madrid, España). Se clasifican siguiendo criterios morfológicos (número de células, tamaño, grado de fragmentación, presencia de vacuolas, contorno celular, nivel de compactación, tipo de zona pelúcida, etc.) y el ritmo de división, teniendo en cuenta el día de desarrollo embrionario en el que se

encuentran. En base a ello, los embriones se clasifican en cuatro categorías de calidad decreciente antes de su transferencia:

- Categoría A: embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
- Categoría B: embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: embrión de calidad mediocre con bajas posibilidades de implantación.
- Categoría D: embrión de mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación.

En el estudio sólo se transfirieron embriones de las categorías A y B.

3.6 Vitrificación de embriones

En el grupo de pacientes con SHO se cancela la transferencia de embriones en fresco para prevenir de los efectos de la hiperestimulación, por lo que es necesario vitrificar todos los embriones. Se utilizó el kit MediCult Vitrification (Origio[®]) para la vitrificación y desvitrificación, y como soporte de la misma Cryoleaf (Origio[®]). Los embriones de estas pacientes fueron transferidos en un ciclo posterior.

3.7 Transferencia de embriones

Las transferencias se llevan a cabo en una sala de la clínica habilitada para tal efecto. Los embriones a transferir se depositan en una placa con pocillo central con medio UTM (Origio[®]) y se lavan durante 5 minutos en dicha placa. Se utiliza parte del medio UTM para purgar el catéter de transferencia. El proceso se realiza con ayuda del ecógrafo y en los casos en los que es difícil canalizar el cuello uterino se utiliza una guía.

A los tres grupos de pacientes se les transfirieron embriones A y B en día +3 de desarrollo. Generalmente se transfirieron 2 embriones por paciente o un único embrión en el caso de que no se dispusiera de más embriones de calidad aceptable. La ley vigente en España sobre técnicas de reproducción asistida (Ley 14/2006) permite la

transferencia de un máximo de 3 embriones cada vez, lo que incrementaría las posibilidades de una gestación múltiple.

El suplemento de la fase lútea se realiza con progesterona micronizada Progeffik 200 mg (Effik[®], Francia) cada 8 horas.

3.8 Diagnóstico de embarazo

A los 12 días de la transferencia embrionaria se determina el diagnóstico de embarazo bioquímico mediante la detección de la β -hCG en la orina con un kit comercial (Lisubel[®], España). El embarazo se comprueba posteriormente mediante la presencia de saco embrionario y latido fetal por ecografía.

3.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido analizados mediante el programa estadístico SPSS (Illinois, EE.UU.). En las comparaciones de datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de chi cuadrado. Los valores de las variables continuas son expresados como medias y desviaciones y los valores de las variables categóricas como porcentajes. Sólo se representan las diferencias estadísticamente significativas, considerando como tales aquellas que mostraron una $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1 Edad y niveles hormonales

Se calculó la edad media de las tres poblaciones de estudio. Se obtuvieron diferencias significativas entre la edad media de las pacientes con SHO (32,98 años) y la edad de las pacientes con E2 alto y las receptoras de ovocitos donados (36,2 y 38,32 años respectivamente). También se representa la edad media de las donantes de ovocitos (23,76 años) para poner de manifiesto la amplia diferencia de edad que hay con las receptoras.

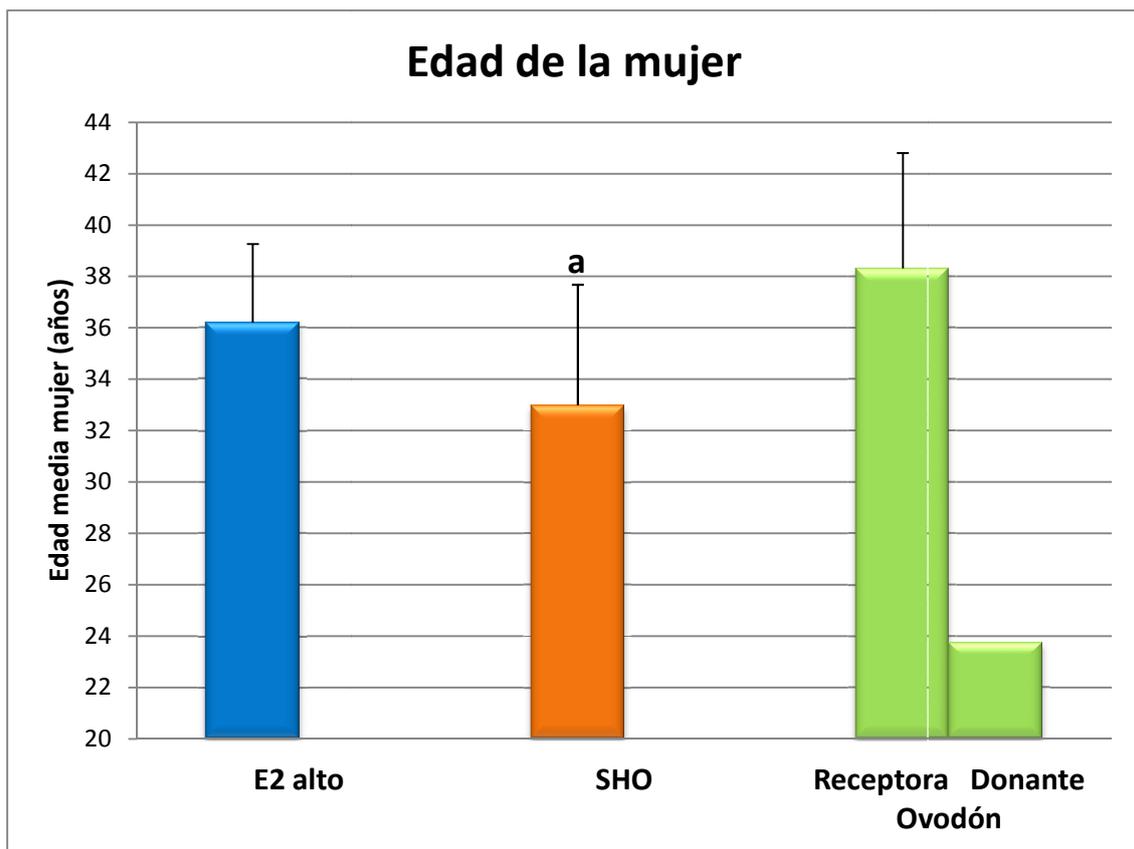


Figura 3. Representación gráfica de la edad de las mujeres pertenecientes a las tres poblaciones de estudio. Se representa la media y su desviación. a = SHO vs. E2 alto, Receptora Ovodon.

Se obtuvo la media de los niveles de estradiol que las pacientes presentaban el día de la inducción de la ovulación: E2 alto 3003,51 pg/ml, SHO 3964,18 pg/ml y donante de Ovodón 2638,59 pg/ml. No se encontraron diferencias significativas entre las tres poblaciones, siendo más elevados los niveles de estradiol en el grupo con SHO.

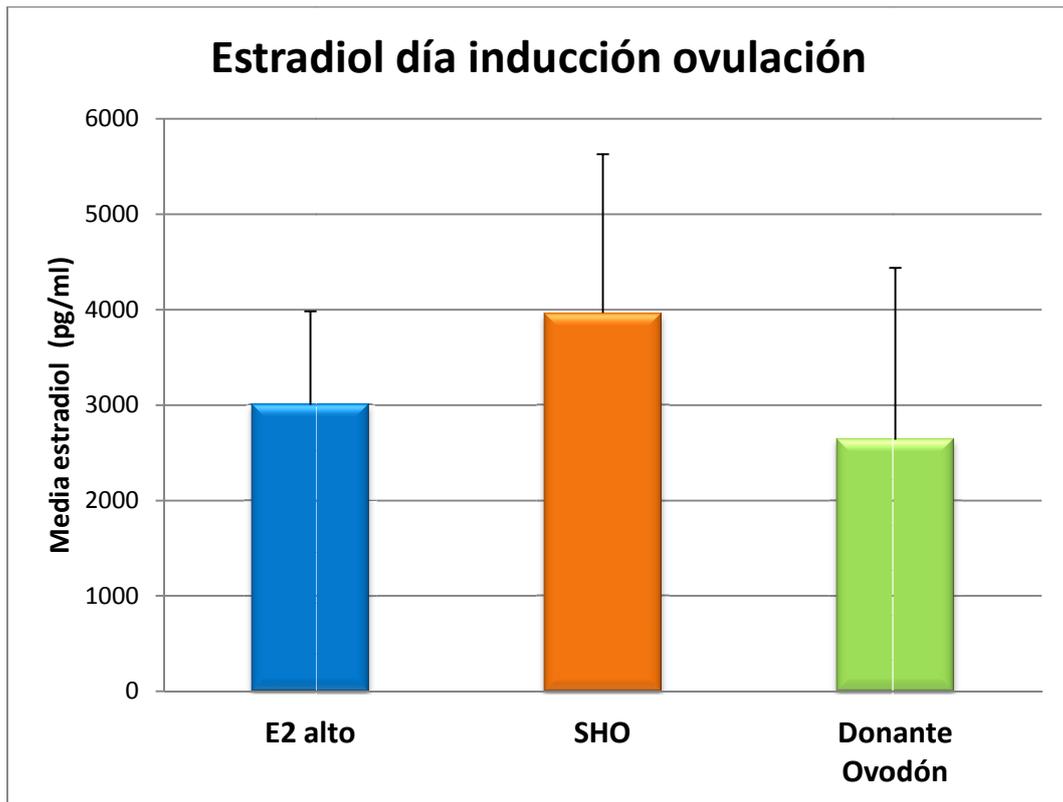


Figura 4. Representación gráfica de los niveles de estradiol el día de la inducción de la ovulación en las tres poblaciones de estudio. Se representa la media y su desviación.

En cuanto a los niveles de progesterona en el día de la inducción de la ovulación, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes. Las mujeres con SHO presentaban un valor mayor (1,46 ng/ml), mientras que las mujeres con E2 alto y las donantes tenían unos valores de progesterona bastante similares (1,07 y 1,2 ng/ml respectivamente).

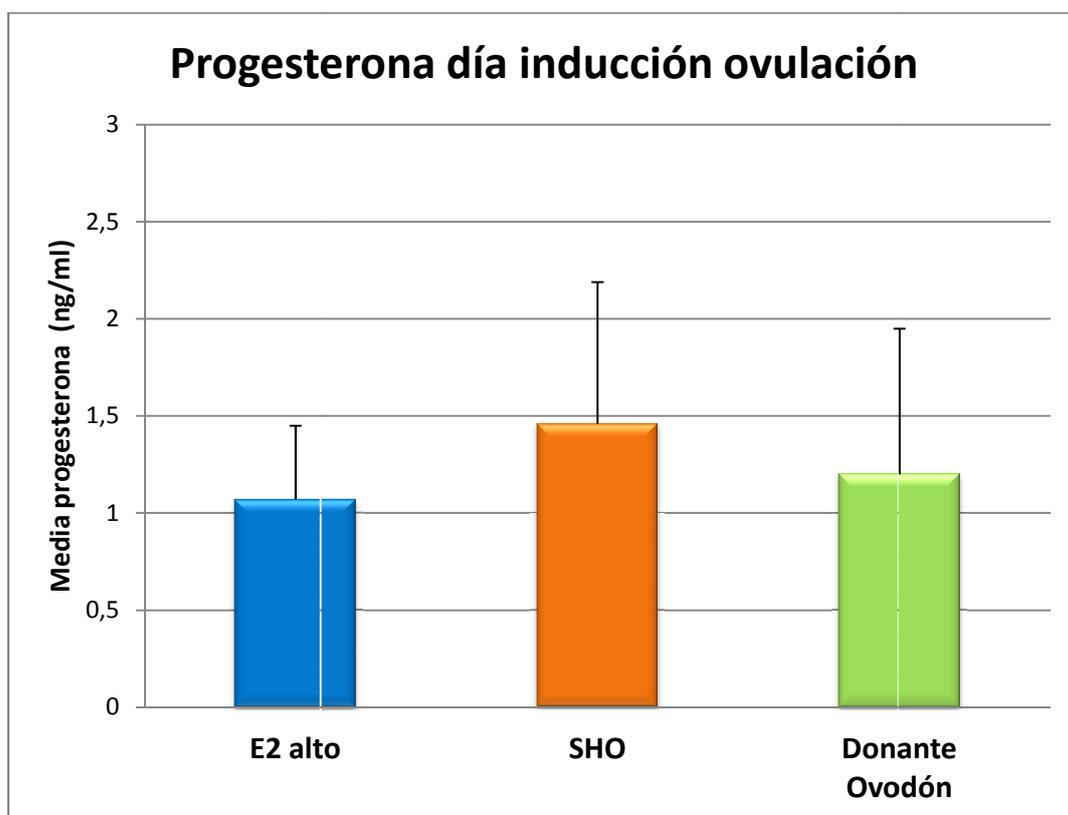


Figura 5. Representación gráfica de los niveles de progesterona el día de la inducción de la ovulación en las tres poblaciones de estudio. Se representa la media y su desviación.

4.2 Calidad ovocitaria y fecundación

Se calculó el número medio de ovocitos por paciente, obteniéndose diferencias significativas entre las pacientes con SHO (20,77 ovocitos/paciente) y las otras dos poblaciones (E2 alto 13,22 y Ovodón 15,43 ovocitos/paciente).

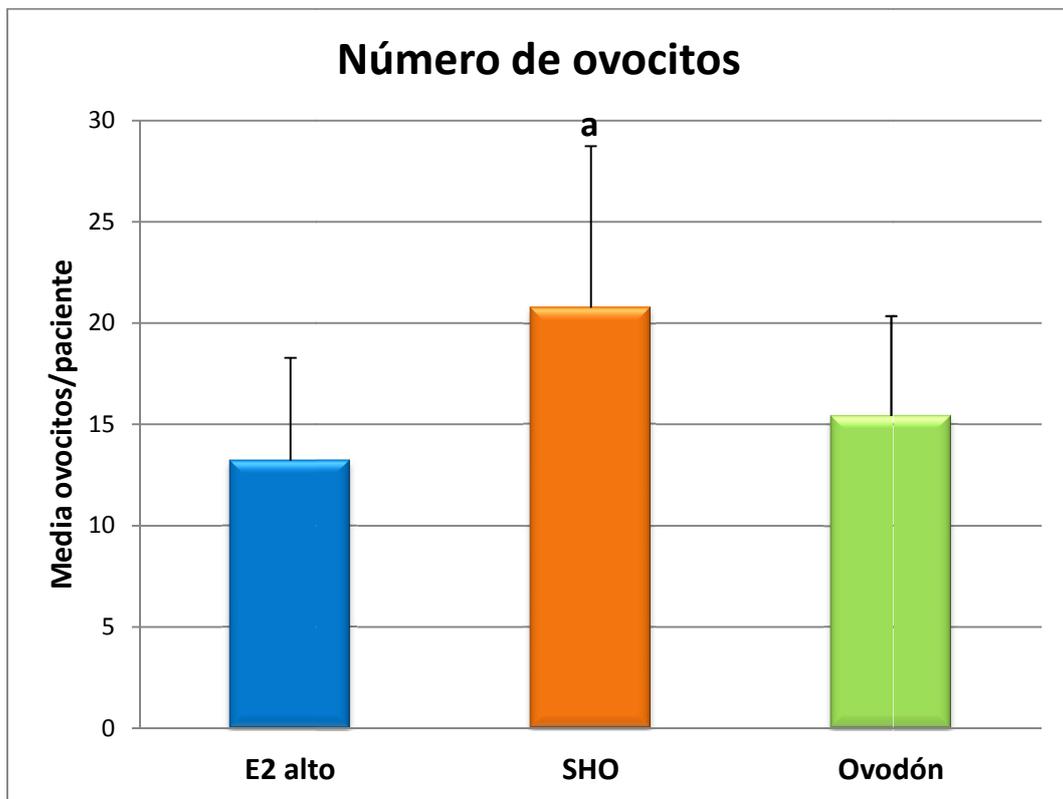


Figura 6. Representación gráfica del número medio de ovocitos por paciente en las tres poblaciones de estudio. Se representa la media y su desviación. a = SHO vs. E2 alto, Ovodón.

Respecto a la calidad ovocitaria, los ovocitos se clasificaron en metafase II (MII), metafase I y vesicular germinal (MI+VG), y alterados. El grupo de alterados aglutina todos los ovocitos en metafase II alterados y los atrésicos.

Se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de ovocitos MII del grupo de SHO (67,28%) y el grupo de Ovodón (83,19%); pero no de estos dos grupos con el de E2 alto (71,74%).

No hubo diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos MI+VG, siendo los valores de 16,55% para la población de E2 alto, 11,83% para SHO y 8,37% para Ovodón.

En cuanto al porcentaje de ovocitos alterados, el valor del grupo de SHO (20,87%) fue significativamente mayor al de los otros dos (11,02% en E2 alto y 8,43% en Ovodón).

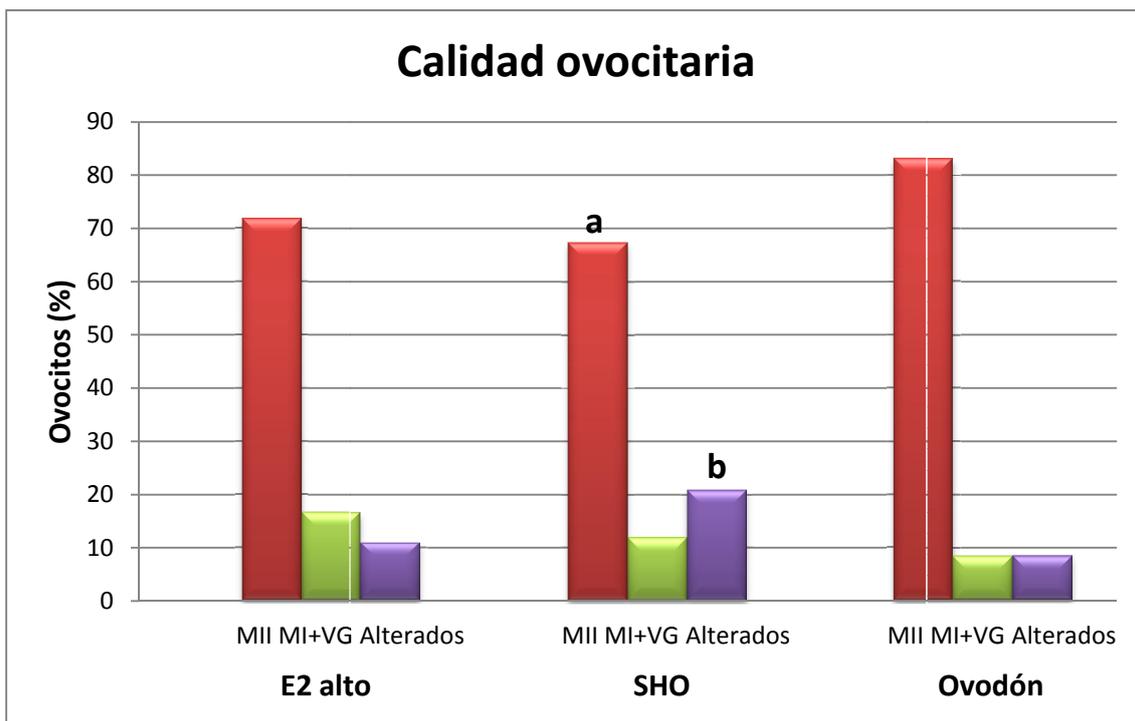


Figura 7. Representación gráfica de la calidad ovocitaria en las tres poblaciones de estudio. Se representa el porcentaje de ovocitos de cada clase. a = SHO vs. Ovodón. b = SHO vs. E2 alto, Ovodón.

Se compararon los porcentajes de ovocitos MII de las tres poblaciones, que son los que se emplean en la ICSI, con el resto de ovocitos desechados por su mala calidad (la suma de los MI+VG y los ovocitos alterados). El porcentaje de ovocitos de mala calidad fue significativamente mayor en el grupo de SHO (30,97%) respecto al de Ovodón (16,22%), pero no respecto al grupo de E2 alto (27,27%).

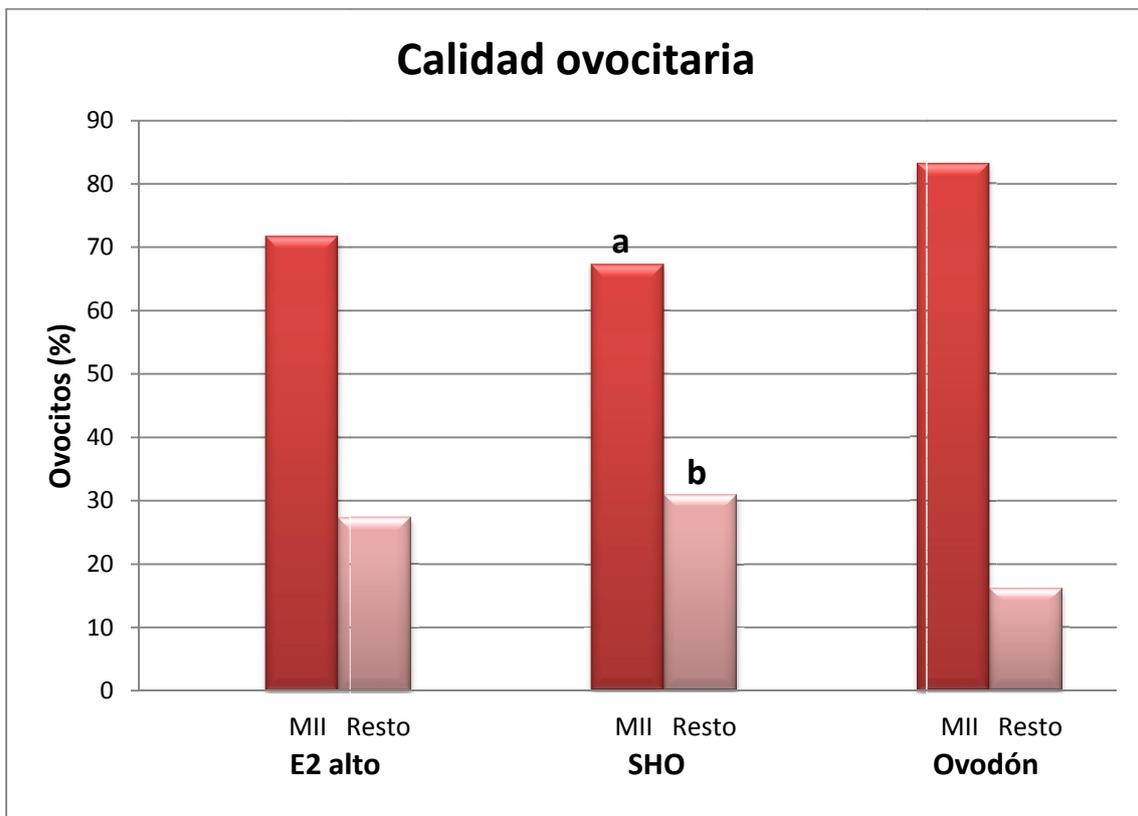


Figura 8. Representación gráfica de la calidad ovocitaria en las tres poblaciones de estudio. Se representa el porcentaje de ovocitos MII y el resto de ovocitos que no sirven para la ICSI. a = SHO vs. Ovodón. b = SHO vs. Ovodón.

También se evaluó la tasa de fecundación al día siguiente de hacer la ICSI. Los valores obtenidos fueron: 70,01% en E2 alto, 72,98% en SHO y 82,29% de fecundación en Ovodón. No se encontraron diferencias significativas entre las tres poblaciones.

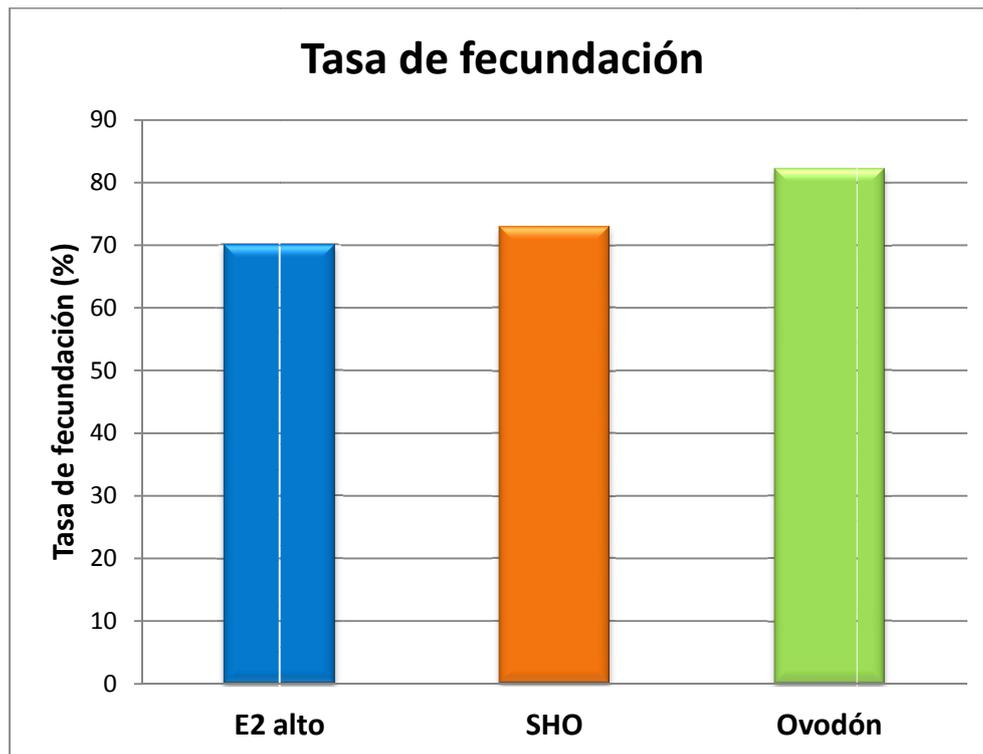


Figura 9. Representación gráfica de la tasa de fecundación en las tres poblaciones de estudio. Se representa el porcentaje de ovocitos fecundados.

4.3 Calidad embrionaria y embarazo

La calidad embrionaria se evaluó en día +3 y sólo se transfirieron embriones A y/o B. Respecto a los embriones clasificados como A no se obtuvieron diferencias significativas (27,94% en E2 alto; 25,62% en SHO; 34,46% en Ovodon). Los embriones de categoría B de las pacientes de E2 alto (42,46%) presentaron diferencias significativas respecto a los otros dos grupos (32,64% en SHO y 33,45% en Ovodon).

En la suma de los embriones a transferir (A+B), se encontraron diferencias significativas entre la población de E2 alto (70,4%) y la de SHO (58,26%); pero no de éstas con la tercera población (Ovodon, 67,91%).

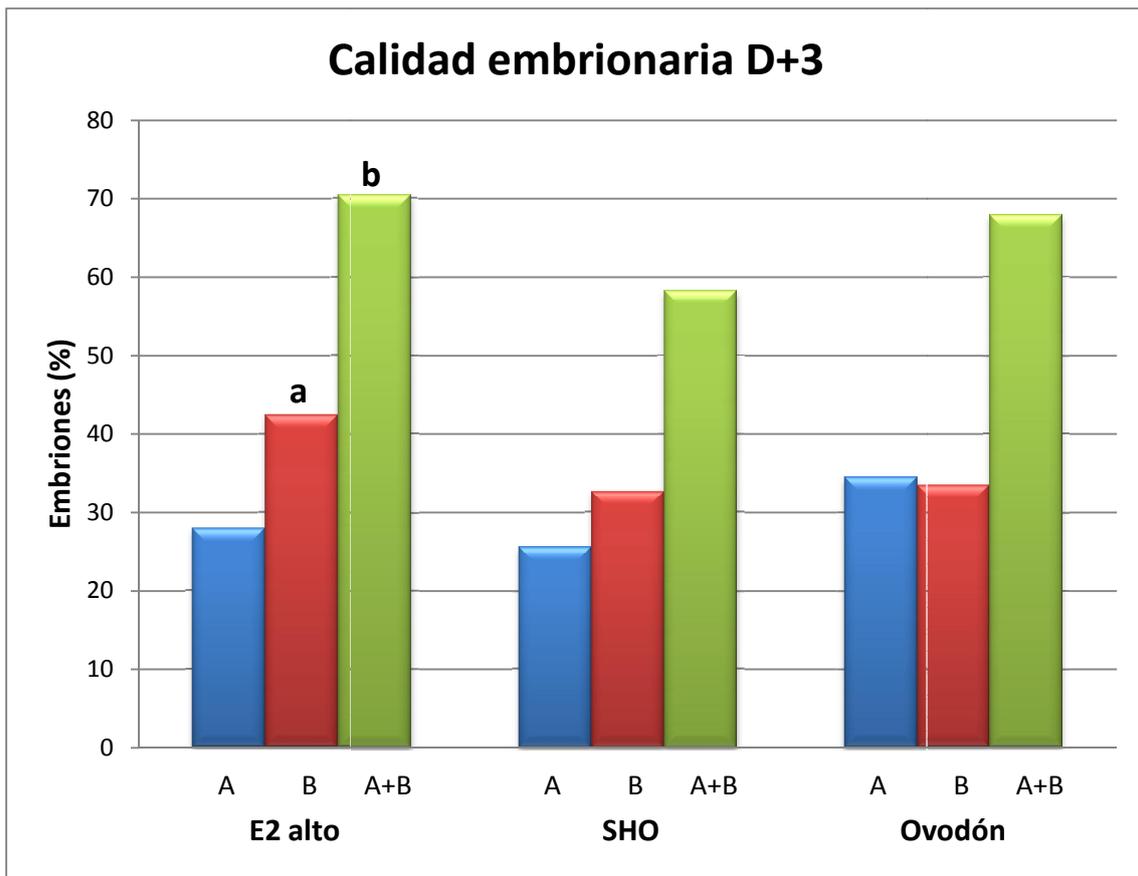


Figura 10. Representación gráfica de la calidad embrionaria en día +3 en las tres poblaciones de estudio. Se representa el porcentaje de embriones A, B y su suma respecto al total de embriones en día +3 (A+B+C+D). a = E2 alto vs. SHO, Ovodon. b = E2 alto vs. SHO.

Por último, se evaluó el resultado de los test de embarazo teniendo en cuenta el porcentaje de positivos obtenidos para cada grupo de pacientes. No se obtuvieron diferencias significativas entre los resultados, que fueron 35% de positivos para E2 alto, 44,23% para SHO y 53,33% para Ovodón.

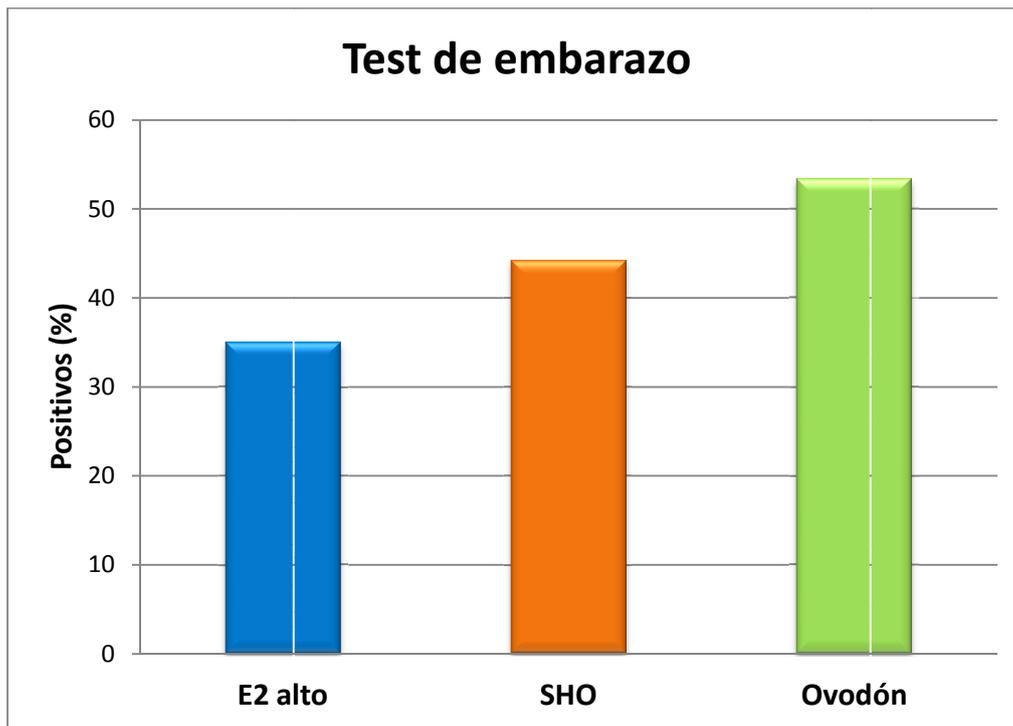


Figura 11. Representación gráfica de los resultados del test de embarazo en las tres poblaciones de estudio. Se representa el porcentaje de test positivos.

5. Discusión

El SHO es la complicación más grave secundaria a los tratamientos de reproducción asistida. Se produce por una respuesta desmesurada de los ovarios al tratamiento de estimulación hormonal. En su forma crítica puede conllevar la muerte de la paciente si no se toman las medidas adecuadas (Whelan y cols., 2000).

Existen muchas estrategias para prevenir la aparición del SHO en un ciclo de FIV. Actualmente se utilizan análogos de la GnRH, como el Decapeptyl (triptorelina), para desencadenar la ovulación y evitar así que se produzca el fenómeno de hiperestimulación (Humaidan y cols., 2011). Otra medida eficaz es la administración de progesterona como soporte de la fase lútea en vez de con hCG, que agravaría más el problema (Aboulghar y cols., 2003).

Pese a ello, se siguen produciendo casos de SHO y la única solución es cancelar el ciclo y tratar médicamente a la paciente si es necesario. En estos casos, se procede a vitrificar todos los embriones obtenidos para transferirlos en un ciclo posterior sin que exista perjuicio para la mujer (Sabatini y cols., 2011).

Diversos autores afirman que el SHO ejerce un efecto negativo sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, comprometiendo la posibilidad de conseguir un embarazo (Aboulghar y cols., 1997; Raziel y cols., 2002). Por otro lado, estudios más recientes no han demostrado tal relación. (Fàbregues y cols., 2004; Jeroen y cols., 2006).

Para comprobar el efecto que tiene el SHO sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, llevamos a cabo un estudio en el que se compararon pacientes que presentaban SHO con pacientes sanas con niveles de E2 alto y con receptoras de ovocitos donados. En las pacientes con SHO se combinaron varias estrategias para prevenir los síntomas: inducción de la ovulación con Decapeptyl (al igual que en el grupo de donantes) y vitrificación de embriones. Las pacientes con E2 alto fueron tratadas con hCG para desencadenar la ovulación. Tanto en éste grupo como en el de receptoras la transferencia de los embriones se realizó en fresco. Además, evaluamos otros factores que están directamente relacionados con la calidad ovocitaria y embrionaria, como son, la edad y los niveles de estradiol y progesterona.

Respecto a la edad de las pacientes, las mujeres con SHO presentaron una edad significativamente menor (32,98 años) que las pacientes con E2 alto y las receptoras de ovocitos donados. Es el resultado que cabría esperar, ya que estas mujeres más jóvenes poseen unos ovarios que responden de manera más activa a la estimulación artificial, aumentando el riesgo de SHO. La edad joven (menos de 35 años) ya ha sido descrita como uno de los principales factores de riesgo para desarrollar el SHO (Enskog y cols., 1999; Whelan y cols., 2000).

Niveles elevados de estradiol y progesterona son característicos del estado de hiperestimulación (Santos y cols., 2010). Los niveles de estradiol fueron mayores en el grupo con SHO (3964,18 pg/ml), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las tres poblaciones. Este valor concuerda con el obtenido en otros estudios (Levi y cols., 2001; Gera y cols., 2010). Igualmente, las mujeres con SHO presentaban un valor mayor de progesterona (1,46 ng/ml), mientras que las mujeres con E2 alto y las donantes tenían unos valores de progesterona bastante similares (1,07 y 1,2 ng/ml respectivamente). Tampoco se observaron diferencias significativas en la progesterona.

El hecho de que no se observen diferencias significativas en los niveles de estradiol y progesterona, a pesar de que las pacientes con SHO presentan valores mayores, puede deberse a varios motivos. Por un lado, puede haber ocurrido que alguna de las pacientes incluidas en el grupo de E2 alto presentase realmente un SHO no detectado. Por otro lado, las donantes de ovocitos son en su gran mayoría mujeres jóvenes con una edad media de 23,76 años, lo que haría aumentar los valores de ambas hormonas.

En cuanto al número de ovocitos recuperados de cada paciente, se obtuvieron diferencias significativas entre las pacientes con SHO (20,77 ovocitos/paciente) y las otras dos poblaciones (E2 alto 13,22 y Ovodon 15,43 ovocitos/paciente). Los resultados coinciden con otros trabajos publicados (Levi y cols., 2001; Gera y cols., 2010). Existen estudios que encuentran una disminución significativa en la calidad ovocitaria cuando aumenta el número de ovocitos recuperados (Giles y cols., 2009; Humaidan y cols., 2011).

En lo que respecta a la calidad ovocitaria, hemos obtenido resultados que constatan la baja calidad que presentan los ovocitos de mujeres con SHO. El porcentaje

de ovocitos de buena calidad (MII) del grupo de SHO (67,28%) fue significativamente inferior al grupo de Ovodon (83,19%). Además, el porcentaje de ovocitos de mala calidad (MI+VG y ovocitos alterados) fue significativamente mayor en el grupo de SHO. De estos últimos, cabe destacar el alto porcentaje de ovocitos alterados del grupo de SHO (20,87% frente a 11,02% en E2 alto y 8,43% en Ovodon). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a ovocitos MII y de mala calidad entre el grupo de SHO y el de E2 alto. Asimismo, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos MI+VG entre los tres grupos. Las concentraciones excesivamente altas de E2 sérico (mayor de 3.000 pg/ml) podrían explicar los porcentajes significativamente más bajos de ovocitos de buena calidad en el SHO. La observación de un elevado número de ovocitos inmaduros en las punciones de estas mujeres se relaciona con la alta repuesta ovárica (Cano *et al.*, 1997).

Los resultados de la calidad ovocitaria contrastan con la tasa de fecundación. Se obtuvieron valores elevados de fecundación en los tres grupos sin diferencias significativas. Esto se debe a que el elevado número de ovocitos obtenidos de mujeres con SHO compensan una calidad inferior. La tasa de fecundación observada fue mayor que la que se obtuvo en otro estudio con ovocitos procedentes de pacientes con SHO (Jeroen y cols., 2006).

En la evaluación de la calidad embrionaria en día +3, se observó que el grupo de SHO presentaba los menores porcentajes tanto de embriones A (25,62%) como de B (32,64%). Como cabría esperar, el grupo de Ovodon poseía el mayor porcentaje de embriones A (34,46%), mientras que el grupo de E2 alto tenía el mayor porcentaje de embriones B (42,46%). En el caso de los embriones de mejor calidad clasificados como A no se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos. En el caso de los embriones de categoría B, las pacientes de E2 alto presentaron un valor significativamente mayor respecto a los otros dos grupos (32,64% en SHO y 33,45% en Ovodon). En la suma de los embriones A y B, se encontraron diferencias significativas entre la población de E2 alto (70,4%) y la de SHO (58,26%); pero no de éstas con la tercera población (Ovodon, 67,91%). Por lo tanto, la calidad embrionaria de pacientes con SHO es ligeramente inferior a la del resto de pacientes.

Los resultados obtenidos de calidad embrionaria de embriones de los grupos E2 alto y SHO son discordantes respecto a los resultados positivos del test de embarazo. El mayor porcentaje de test de embarazo positivos tiene lugar en el grupo de Ovodón (53,33%), ya que se transfirieron más embriones de mejor calidad. Al contrario de lo que cabría esperar, el grupo de SHO obtiene una mejor tasa de embarazo (44,23%) que el grupo de E2 alto (35%). Aún así, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de test de embarazo de los tres grupos. El porcentaje de positivos del grupo de SHO es muy similar al obtenido por otros autores (Gera y cols., 2010).

Estos resultados corroboran el hecho de que la obtención de un mayor número de ovocitos de mujeres con SHO no afecta negativamente a la tasa de embarazo (Jeroen y cols., 2006). Además, la hiperestimulación tampoco comprometería una correcta implantación (Levi y cols., 2001).

Existen pocos estudios que analicen exhaustivamente la calidad ovocitaria y embrionaria en pacientes con SHO y ninguno de ellos compara las tres poblaciones que hemos utilizado. Para reducir al mínimo los riesgos del SHO y obtener los mejores resultados posibles es necesario llevar a cabo más investigaciones.

6. Conclusiones

Del presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1- La edad joven y unos niveles altos de estradiol y progesterona son factores de riesgo para desarrollar un SHO e influyen negativamente sobre la calidad ovocitaria y embrionaria.

2- Las pacientes con SHO presentan una calidad ovocitaria significativamente inferior a las pacientes sanas. Esta calidad disminuye significativamente cuando aumenta el número de ovocitos recuperados.

3- El SHO no afecta significativamente a la tasa de fecundación.

4- El SHO no afecta significativamente a la tasa de embarazo.

5- Cancelar el ciclo y vitrificar todos los embriones es una buena estrategia para reducir el riesgo de SHO. Continuar el ciclo con niveles altos de E2 reduce la tasa de embarazo.

7. Bibliografía

Aboulghar M. Treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. *Semin Reprod Med* 2010;28:532-9.

Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1997;68:1017–1021.

Aboulghar MA, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update* 2003;9:275-289.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Decapeptyl. 2013.

Ajonuma LC, Ajuonuma MU, Ajuonuma BC, Ogbedeagu VM, Ajuonuma JU, Chukwu CL. EG-VEGF concentrations may predict OHSS. *Fertil Steril* 2011;95(7):e37.

Amato G, Conte M, Mazziotti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker AT, Bellastella A, Carella C, Izzo A. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol* 2003;101:1177-82.

Angelo AD, Amso NN. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002;17:2787-2794.

Anuradha BS, Thankam RV. Does Ovarian Hyperstimulation Syndrome influence embryo quality and thereby the outcome of a frozen embryo replacement cycle ? – A preliminary observation. *J Obstet Gynecol India* 2005;55:538-540.

Azcona B, Campo G, Zabaleta J. Ovarian hyperstimulation syndrome. *An Sist Sanit Navar* 2009;32(Supl.1): 19-27.

Berker B, Kaya C, Aytac R, Satiroglu H. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with por oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 2009;24:2293– 2302.

Busso CE, García-Velasco J, Gómez R, Álvarez C, Simón C, Pellicer A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Prevention of OHSS-dopamine agonists. *Reprod Biomed Online* 2009;19:43-51.

- Cano F, García-Velasco JA, Millet A, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J Assist Reprod Genet* 1997;14: 254-61.
- Chen D, Burmeister L, Goldschlag D, Rosenwaks Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: strategies for prevention. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:43-9.
- Chen J, Qian Y, Feng T, Cai LB, Liu JY, Zhang Y, Ding W, Mao YD. Delivery after transfer of frozen-thawed embryos from *in vitro*-matured oocytes in a woman at risk for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Reprod Dev* 2007;53:449-453.
- Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update* 2002;8:559-577.
- Enskog, A., Henriksson, M., Unander, M., Nilsson, L. and Brannstrom, M. Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1999;71:808-814.
- Fàbregues F, Peñarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril* 2004;82:827-33.
- Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW y cols. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril* 2012;97:28-38.
- Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli C, Fortini D, Selman HA, Feliciani E. Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety. *Hum Reprod* 1999;14:1457-1460.
- Fitzmaurice GJ, Boylan C, McClure N. Are pregnancy rates compromised following embryo freezing to prevent OHSS? *Ulster Med J* 2008;77(3)164-167.
- Friedman CI, Schmidt GE, Chang FE, Kim MH. Severe ovarian hyperstimulation following follicular aspiration. *Am J Obstet Gynecol* 1984;15,436-437.

García-Velasco JA, Quea G, Piró M. Letrozole administration during the luteal phase after ovarian stimulation impacts corpus luteum function: A randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2009;92:222-5.

Gera PS, Tatpati LL, Allemand MC, Wentworth MA, Coddington CC. Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertil Steril* 2010; 94:173-178.

Giles J, Requena A, García-Velasco JA, Pacheco A, Pellicer J, Pellicer A. GnRH analogue for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: A pilot study. *Fertil Steril* 2009;91:1366-9.

Gómez R, Soares SR, Busso C, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Semin Reprod Med* 2010;28:448-57.

Gong F, Cai S, Zhang S, Lu C, Lin G, Lu G. A case report: successful pregnancy after controlled ovarian hyperstimulation by using short-acting gonadotropin releasing hormone agonist only. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:329–330.

Griesinger G, Otte S, Schroer A, Ludwig AK, Diedrich K, Al-Hasani S, Schultze-Mosgau A. Elective cryopreservation of all pronuclear oocytes after GnRH agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of developing OHSS: a prospective, observational proof-of-concept study. *Hum Reprod* 2007;22:1348–1352.

Hickey T, Chandy A, Norman RJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:161-165.

Huang JY, Chian RC, Tan SL. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention strategies: *In vitro* maturation. *Semin Reprod Med* 2010;28:519-31.

Humaidan P, Kol S, Papanikolaou EG, Copenhagen GnRH Agonist Triggering Workshop Group. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: Time for a change of practice? *Hum Reprod Update* 2011;17:510-24.

Imbar T, Kol S, Lossos F, Bdolah Y, Hurwitz A, Haimov-Kochman R. Reproductive outcome of fresh or frozen-thawed embryo transfer is similar in high-risk patients for

ovarian hyperstimulation syndrome using GnRH agonist for final oocyte maturation and intensive luteal support. *Hum Reprod* 2012;27:753–759.

Jeroen DK, Caspar WNL, Sjerp MW, Egbert RV. A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2006;85:918-24.

Kjotrod SB, Düring V, Carlsen SM. Metformin treatment before IVF/ICSI in women with polycystic ovary syndrome; a prospective, randomized, double blind study. *Hum Reprod* 2004;19:1315-22.

Levi AJ, Drews MR, Bergh PA, Miller BT, Scott RT. Controlled ovarian hyperstimulation does not adversely affect endometrial receptivity in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2001;76:670-674:

Mansour R, Aboulghar M, Serour G, Amin Y, Abou-Setta AM. Criteria of a successful coasting protocol for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:3167–3172.

Mashiach R, Amit A, Hasson J, Amzalag S, Almog B, Ben-Yosef D, Lessing JB, Limor R, Azem F. Follicular fluid levels of anti-Mullerian hormone as a predictor of oocyte maturation, fertilization rate, and embryonic development in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2010;93:2299-2302.

Meyer MF, Gerresheim F, Pfeiffer A, Eppelen JT, Schatz H. Association of polycystic ovary syndrome with an interstitial deletion of the long arm of chromosome 11. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108:519–23.

Palomba S, Falbo A, Orio F Jr, Zullo F. Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2009;92:1646-58.

Papanikolaou EG, Verpoest W, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P, Tournaye H. A novel method of luteal supplementation with recombinant LH, when a GnRH-Agonist is used instead of HCG for ovulation triggering. A randomized prospective proof of concept study. *Fertil Steril* 2011;3:1174 –1177.

Pavone ME, Innes J, Hirshfeld-Cytron J, Kazer R, Zhang R. Comparing thaw survival, implantation and live birth rates from cryopreserved zygotes, embryos and blastocysts. *J Hum Reprod Sci* 2011;4:23-28.

Pellicer A, Ruiz A, Castellví RM, Calatayud C, Ruiz M, Tarin JJ. Is the retrieval of high numbers of oocytes desirable in patients treated with gonadotrophinreleasing hormone analogues (GnRHa) and gonadotrophins? *Hum reprod* 1989; 4:536-40.

Pietrowski D, Szabo L, Sator M, Just A, Egarter C. Ovarian hyperstimulation syndrome is correlated with a reduction of soluble VEGF receptor protein level and a higher amount of VEGF-A. *Hum Reprod* 2012;27(1):196-9.

Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update* 2011;17:17–33.

Raziel A, Friedler S, Schachter M, Strassburger D, Mordechai E, Ron-El R. Increased early pregnancy loss in IVF patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2002;17:107-110.

Sabatini ME, Wolkovich AM, Macklin EA, Wright DL, Souter I, Toth LT. Pronuclear embryo cryopreservation experience: outcomes for reducing the risk of ovarian hyperstimulation syndrome and for fertility preservation in cancer patients. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:279–284.

Santos MA, Kuijk EW, Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reprod* 2010;139:23–34.

Sills ES, McLoughlin LJ, Genton MG, Walsh DJ, Coull GD, Walsh APH. Ovarian hyperstimulation syndrome and prophylactic human embryo cryopreservation: analysis of reproductive outcome following thawed embryo transfer. *J Ovari Res* 2008, 1:7.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2008;90:188-193.

Van der Spuy ZM, Dyer SJ. The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2004;18:755-71.

Wei LH, Chou CH, Chen MW, Rose-John S, Kuo ML, Chen SU, Yang YS. The role of IL-6 trans-signaling in vascular leakage: implications for ovarian hyperstimulation syndrome in a murine model. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(3):E472-84.

Whelan JG, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000;73:883-896.

Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod* 2005;20:2097–2103.

