

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN

Influencia del grupo sanguíneo y factor Rh sobre la fertilidad humana

Trabajo Fin de Máster

Laura Suárez Ceballos

Tutor: Dr. Abel Gayo Lana

Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

Tras finalizar estos intensos meses de dedicación al presente trabajo, es lógico que me invada la necesidad de agradecer a cada una de las personas e instituciones que contribuyeron a la realización de este proyecto.

En primer lugar me gustaría darle las gracias a mi tutor, el Dr. Abel Gayo Lana, director del laboratorio de Biología de la Reproducción en FIV4, por su apoyo incondicional, paciencia y disponibilidad, a pesar de estar trabajando casi las 24 horas del día. Gracias por poner todo de su parte para que este trabajo pudiera llevarse a cabo y sobre todo por su confianza, que me permitió ganar seguridad en mí misma.

En segundo lugar debo agradecer a María Fernández Díaz y a Sara Atienza de Nava, porque aparte de ser unas grandísimas profesionales, son aún mejores personas. Gracias por ayudarme tanto, por tener siempre una sonrisa y por enseñarme con esa capacidad que solo tienen ellas.

Gracias a todo el equipo de FIV4 por permitirme pasar estos meses allí y no parar de aprender ni un segundo. Gracias, gracias y mil veces gracias por enseñarme el gran mundo de la Reproducción Asistida.

Por último agradecer a todas las personas que me acompañaron en este camino y aguantaron mis “agonías”, que no fueron pocas. Sin ellos probablemente no hubiera llegado hasta aquí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Grupo sanguíneo y factor Rh	4
1.2. Reserva ovárica.....	7
1.3. Fallos de implantación y abortos de repetición	12
1.4. Influencia del grupo sanguíneo sobre la fertilidad.....	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Determinación de FSH y AMH	17
3.2. Estimulación ovárica.....	18
3.3. Inducción de la ovulación	19
3.4. Punción ovárica.....	19
3.5. Procesamiento del semen.....	20
3.6. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	21
3.7. Transferencia embrionaria	23
3.8. Diagnóstico de embarazo y aborto.....	23
3.9. Análisis estadístico de los datos.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Distribución demográfica de la población	25
4.2. Efecto del grupo sanguíneo y el factor Rh sobre la tasa de embarazo y aborto bioquímico	28
4.3. Influencia del factor Rh sobre la baja reserva ovárica medida en términos de la AMH... ..	29
4.4. Efecto del grupo sanguíneo y del factor Rh sobre la calidad seminal	30
5. DISCUSIÓN.....	31
6. CONCLUSIONES	41
7. BIBLIOGRAFÍA.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AMH:** *Anti-Müllerian Hormone* (Hormona Antimülleriana).
- **ASEBIR:** Asociación Española sobre el Estudio de la Biología de la Reproducción.
- **CP:** Corpúsculo Polar.
- **E₂:** Estradiol.
- **EOC:** Estimulación Ovárica Controlada.
- **EOD:** Esterilidad de Origen Desconocido.
- **ERA:** *Endometrial Receptivity Assay* (Test de Receptividad Endometrial).
- **FIV:** Fecundación *in vitro*.
- **FSH:** *Follicle-Stimulating Hormone* (Hormona Folículo Estimulante).
- **FVIII:** *Factor VIII* (Factor de coagulación VIII).
- **GnRH:** *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Hormona liberadora de Gonadotropinas).
- **HCG:** *Human Chorionic Gonadotropin* (Gonadotropina Coriónica humana).
- **β-HCG:** *beta subunit Human Chorionic Gonadotropin* (subunidad beta de Gonadotropina Coriónica humana).
- **IAC:** Inseminación Artificial Conyugal.
- **IAD:** Inseminación Artificial con semen de Donante.
- **ICSI:** *Intracytoplasmatic Sperm Injection* (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides).
- **IMC:** Índice de Masa Corporal.
- **LH:** *Luteinizing Hormone* (Hormona Luteinizante).
- **M (II):** Metafase II.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **PVP:** Polivinilpirrolidona.
- **P₄:** Progesterona.
- **RFA:** Recuento de Folículos Antrales.
- **factor Rh:** factor Rhesus.
- **gen RHD:** *Rh blood group D antigen* (Antígeno D del factor Rh).
- **gen RHCE:** *Rh blood group C c E e antigens* (Antígenos C c E e del factor Rh).
- **ROD:** Reserva Ovárica Disminuida.
- **SEF:** Sociedad Española de Fertilidad.

- **SHO:** Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.
- **SOP:** Síndrome de Ovario Poliquístico.
- **TGF- β :** *Transforming Growth Factor beta* (Factor de Crecimiento Transformante beta)
- **TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida
- **TSH:** *Thyroid-Stimulating Hormone* (Hormona Estimulante del Tiroides).
- **UI:** Unidades Internacionales.
- **VWF:** *Von Willebrand Factor* (Factor de Von Willebrand).

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el concepto de infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que impide la consecución de embarazo o que éste no llegue a término tras 12 meses manteniendo relaciones sexuales sin empleo de métodos anticonceptivos (Zegers-Hochschild et al. 2009).

En España se estima que la infertilidad afecta a un 10-15 % de la población en edad reproductiva y la tendencia de esta cifra va en ascenso. La causa de esta infertilidad puede ser de diferente naturaleza. Actualmente casi el 40 % de los casos se asocian a factor masculino, otro 40 % a infertilidad femenina debida en gran parte a endometriosis, factor ovulatorio, tubárico o uterino, reserva ovárica disminuida (ROD), o factor genético. Por último en el 20 % de los casos no es posible diagnosticar el origen de esta infertilidad, es lo que se conoce como esterilidad de origen desconocido (EOD). Además, los cambios sociales y demográficos han contribuido a un retraso de la maternidad, lo que se traduce con un descenso de la fertilidad debido a la ROD por edad y a la mala calidad ovocitaria (Zegers-Hochschild et al. 2009; López 2010).

Para tratar esta infertilidad existen las técnicas de reproducción asistida (TRA) que engloban; la inseminación artificial conyugal (IAC), inseminación artificial con semen de donante (IAD), fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática (ICSI). Estos procedimientos requieren una estimulación ovárica previa, diferente en función de si se busca el desarrollo de uno o dos folículos (IAC o IAD), o de un mayor número de los mismos (FIV o ICSI) (Alamá & Remohí 2010).

En condiciones naturales, en cada ciclo menstrual se ovula un único ovocito contenido en el folículo dominante. La elección de esta dominancia está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, de tal manera que el hipotálamo tras recibir una señal externa, promueve la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Ésta actúa a nivel de la adenohipófisis desencadenando la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH). Estas hormonas ejercen su función en el ovario, estimulando el crecimiento y maduración folicular, y activando la producción de esteroides sexuales como estrógenos, progesterona, andrógenos y péptidos gonadales como activina e inhibina. Estas sustancias, por su parte, realizan una retroalimentación a nivel hipotalámico e hipofisario para aumentar o inhibir la liberación de GnRH y gonadotropinas. El folículo dominante será aquel con

mayor capacidad para sintetizar estrógenos y producir inhibina, la cual inhibe la liberación de FSH garantizando de este modo la no selección de más de un folículo dominante (López 2012).

Lo que se pretende con la estimulación ovárica es el crecimiento y la selección de más de un folículo dominante, por lo que se realiza la administración exógena de gonadotropinas. Aunque el tratamiento es dependiente de cada paciente, es fundamental la inyección de FSH que permite el crecimiento y desarrollo de los folículos y la administración de gonadotropina coriónica humana (HCG) que presenta función LH para desencadenar la ovulación. También se utilizan análogos o antagonistas de la GnRH, con el fin de evitar el pico endógeno de LH inducido por el incremento de los niveles de estradiol, que provocaría la ovulación espontánea y la consecuente cancelación del ciclo. Estos análogos o agonistas se obtienen mediante modificaciones del decapeptido de la GnRH (Galliano 2016).

Los agonistas de la GnRH tienen una alta afinidad por el receptor de GnRH y producen una fase inicial de estimulación (*flare-up*). Su administración continua provoca una regulación a la baja de los receptores de GnRH, que se traduce con una disminución en la liberación endógena de gonadotropinas (Engmann et al. 2016).

Por su parte, los antagonistas de la GnRH se han introducido recientemente en el campo de la reproducción humana. Su objetivo es el mismo, evitar el pico prematuro de LH durante la estimulación ovárica controlada. Actúan de forma competitiva, uniéndose al receptor de la GnRH, bloqueándolo y causando así una supresión hipofisaria que se caracteriza por ser profunda e inmediata. Las pautas y dosis de estimulación son personalizadas para cada paciente (Engmann et al. 2016).

Hoy en día, cada vez hay más casos de infertilidad por factor masculino, esto es debido fundamentalmente a alteraciones en el seminograma por diversas causas. Una buena calidad seminal se traduce en un semen normozoospermico, que es aquel que presenta una concentración superior a 15 millones de espermatozoides/ml, un porcentaje de motilidad igual o superior a 32 % (suma entre los espermatozoides tipo A, movimiento progresivo recto, y tipo B, motilidad progresiva pero no rectilínea) y al menos un 4 % de formas normales, entre otros parámetros seminales que se evalúan según los criterios de la OMS (OMS 2010).

El desarrollo de las TRA ha permitido en muchos casos solventar el problema de la infertilidad. El descubrimiento de la ICSI en 1992 por el doctor Palermo supuso un hito en la reproducción asistida. Desde entonces su utilización ha aumentado significativamente las tasas de éxito en los tratamientos de fertilidad (Neri et al. 2014).

A pesar de los grandes avances en el ámbito de la reproducción, existen pacientes que no son capaces de cumplir su deseo reproductivo con sus propios gametos y deben recurrir a la donación. Así, aquellas mujeres con imposibilidad para concebir con sus ovocitos tienen dos opciones reproductivas, recepción de ovocitos de donante o adopción de embriones. Normalmente la recepción de ovocitos es la que se perfila como primera opción ya que permite que el futuro embrión tenga al menos el material genético paterno. Numerosas clínicas poseen programas de ovodonación que consisten en encontrar a la donante con mayor similitud fenotípica y genotípica con la pareja receptora, siendo fundamental la coincidencia del grupo sanguíneo (Hoorn et al. 2010; Weissman et al. 2014).

Según la Ley 14/2006 sobre las técnicas de reproducción asistida, la donación de gametos debe ser anónima y altruista. Las donantes deben ser mayores de 18 años con plena capacidad de obrar y en buen estado de salud psicofísica. Deben realizarse una serie de pruebas que garanticen que las donantes no padecen enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia. Además el número máximo autorizado de hijos nacidos en España generados con los gametos del mismo donante no puede ser superior a seis.

Las receptoras de ovocitos no se someten a la estimulación ovárica pero si es necesario que antes de la transferencia de embriones realicen una leve preparación endometrial. Ésta consiste en la administración de estradiol y progesterona para lograr un grosor endometrial óptimo y permitir el mantenimiento de la fase lútea (Hoorn et al. 2010).

Como se mencionaba anteriormente son numerosas las causas que provocan infertilidad, así como las que conducen a una recepción ovocitaria, y en muchas ocasiones se desconocen. En los últimos años se ha puesto atención especial a un posible factor que pudiera tener relación con la infertilidad humana, el grupo sanguíneo.

1.1. Grupo sanguíneo y factor Rh

El sistema AB0 fue descubierto por Karl Landsteiner en 1901, convirtiéndolo en el primer sistema de grupo sanguíneo conocido, su nombre proviene de los tres tipos de grupos que se identifican: antígeno A, antígeno B o sin antígeno (grupo sanguíneo 0). Los antígenos se expresan en la superficie de los eritrocitos y en función del mismo se desarrollan una serie de anticuerpos en el plasma. Así las personas con grupo sanguíneo A poseen anticuerpos contra los antígenos B, el grupo sanguíneo B produce anticuerpos contra el antígeno A, el grupo sanguíneo AB no produce ningún anticuerpo, al contrario que las personas con grupo sanguíneo 0, que desarrollan anticuerpos anti-A y anti-B. De este modo se puede determinar que el donante universal es el grupo 0 y el receptor universal el grupo AB (Arbeláez 2009; Abdollahi et al. 2013; Noiphung et al. 2015).

La expresión de los antígenos AB0 está controlada por tres genes. El gen *H*, ubicado en el cromosoma 19, codifica un enzima transferasa (transferasa H) que cataliza una reacción entre un azúcar y la galactosa terminal de un precursor común (sustancia precursora) que da lugar al antígeno H, el cual es el paso anterior en la formación de los antígenos de los grupos sanguíneos AB0 (Figura 1). Los individuos que son homocigotos para el gen nulo (*h/h*) no producen antígeno H y por lo tanto tampoco antígenos A o B. Su suero contiene anti-A, anti-B y anti-H. Este fenotipo se conoce como fenotipo Bombay, y las personas que lo poseen solo pueden recibir sangre del mismo fenotipo (Arbeláez 2009; Delaney 2013).

El gen *ABO* ubicado en el cromosoma 9, posee tres alelos, A, B y 0 que varían en función de las sustituciones nucleotídicas, las cuales determinan las especificidades de los enzimas para los cuales codifican. El alelo A codifica para el enzima transferasa A que cataliza la adición de un residuo de N-acetilgalactosamina al antígeno H, generándose así el antígeno A. El alelo B codifica para el enzima transferasa B que cataliza la adición de un residuo de D-galactosa al antígeno H, generándose el antígeno B. El alelo 0 sólo difiere del alelo A en la delección de un nucleótido, lo que tiene como consecuencia un cambio en la pauta de lectura y la producción de una proteína sin actividad transferasa. Los alelos A y B dominan sobre el 0. Las personas AB tienen ambos genotipos debido a que existe una relación de codominancia entre A y B (Arbeláez 2009; Delaney 2013).

Por último se encuentra el gen *Se*, ubicado en el cromosoma 19, codifica para un enzima (fucosiltransferasa) que se expresa en el epitelio de tejidos secretores. Este

enzima cataliza la producción de antígeno H en secreciones del organismo, así los individuos “secretores” poseen al menos una copia del gen *Se* (*Se/Se* o *Se/se*) que codifica para un encima funcional, produciendo antígeno H en las secreciones, el cual a su vez será procesado como antígeno A y/o B, dependiendo del genotipo ABO del individuo. Por su parte, los individuos “no secretores” son homocigóticos para el gen nulo (*se/se*) y por lo tanto no pueden producir la forma soluble del antígeno H (Arbeláez 2009; Delaney 2013).

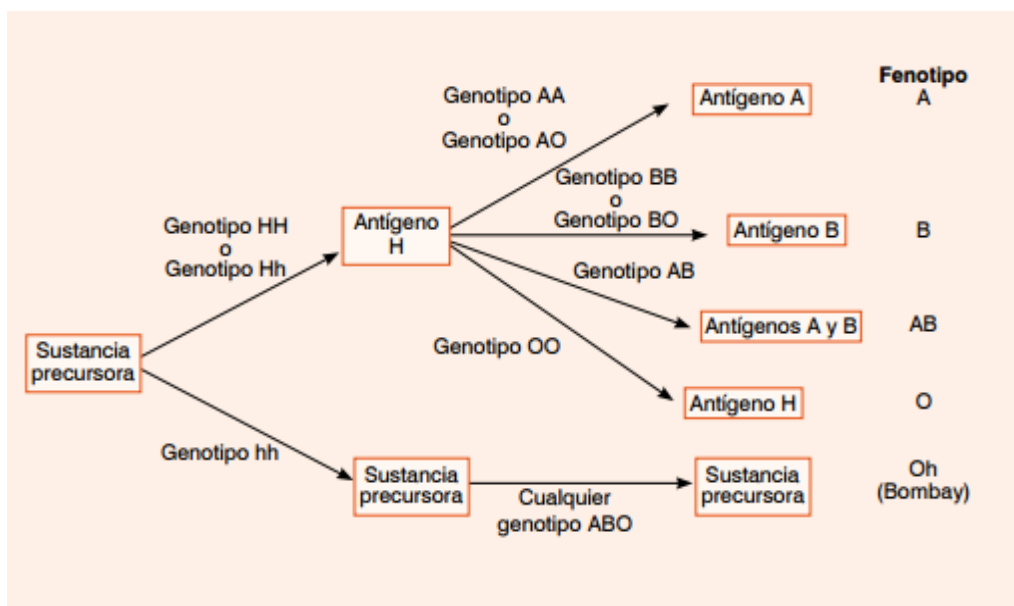


Figura 1: Desarrollo de los antígenos ABO del sistema ABO. Tomado de Arbeláez 2009

En el año 1940, nuevamente el Doctor Landsteiner descubrió otro grupo de antígenos que se denominaron factores Rhesus (factores Rh), ya que fueron descubiertos durante unos experimentos con monos Rhesus (*Macaca mulatta*). El factor Rh es una proteína integral de la membrana de los glóbulos rojos. Existen más de 45 antígenos Rh pero los más habituales son el D, C, E, c y e. El antígeno D es el más antigénico y el más prevalente en la población. Las personas Rh positivo son aquellas que presentan el antígeno Rh D en la membrana de los eritrocitos. Los individuos Rh negativo no poseen el antígeno D pero si desarrollan anticuerpos anti-D. La herencia de los antígenos Rh está determinada por un complejo de dos genes, *RHD* que codifican la proteína transportadora del antígeno D y *RHCE* que codifica la proteína transportadora de los antígenos "C" y "c", o "E" y "e". Las personas Rh positivas poseen ambos genes, mientras que los individuos Rh negativos poseen únicamente el gen *RHCE*. Los dos genes se encuentran en el cromosoma 1 (Arbeláez 2009; Noiphung et al. 2015).

Este descubrimiento fue vital para las transfusiones sanguíneas y los trasplantes, ya que fue posible evitar los errores entre receptores y donantes de sangre que conducían, en la mayoría de los casos, a una reacción hemolítica transfusional, que provoca la destrucción de los glóbulos rojos (Noiphung et al. 2015).

Desde que en 1953 se descubriera una asociación del cáncer de estómago con el grupo sanguíneo A, se han realizado múltiples estudios para evaluar la relación de los diferentes grupos sanguíneos con distintas enfermedades. Por este motivo se ha llegado a estudiar su relación con la fertilidad humana (Abdollahi et al. 2013).

El grupo sanguíneo, junto a otra serie de factores, podría ser determinante de la reserva ovárica (Nejat et al. 2011; Lin et al. 2014) y se ha apuntado como posible responsable en fallos de implantación y abortos de repetición entre parejas con grupos sanguíneos diferentes. Además se ha estudiado la influencia del grupo sanguíneo materno en la consecución de embarazo (Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012; Abdollahi et al. 2013; Mengoli et al. 2015).

Aunque hasta hoy los estudios sobre la influencia del grupo sanguíneo y la fertilidad son escasos y controvertidos, constituyen una nueva vía de investigación que podría permitir la mejora de las TRA y la optimización de los resultados.

1.2. Reserva ovárica

La reserva ovárica es un término utilizado para definir el potencial funcional de los ovarios y es indicativo del número de ovocitos disponibles, en el interior de los folículos, para lograr un embarazo. A medida que las mujeres envejecen, esta reserva ovárica disminuye de forma natural. El declive de la fertilidad se inicia alrededor de los 30 años, cuando comienza a decrecer el número de folículos, alcanzando la esterilidad sobre los 41 años, aunque no es hasta los 50-51 años cuando se pierde totalmente la función ovárica (Figura 2) (Timberlake et al. 2013; Şengül et al. 2014; Spitzer et al. 2014).

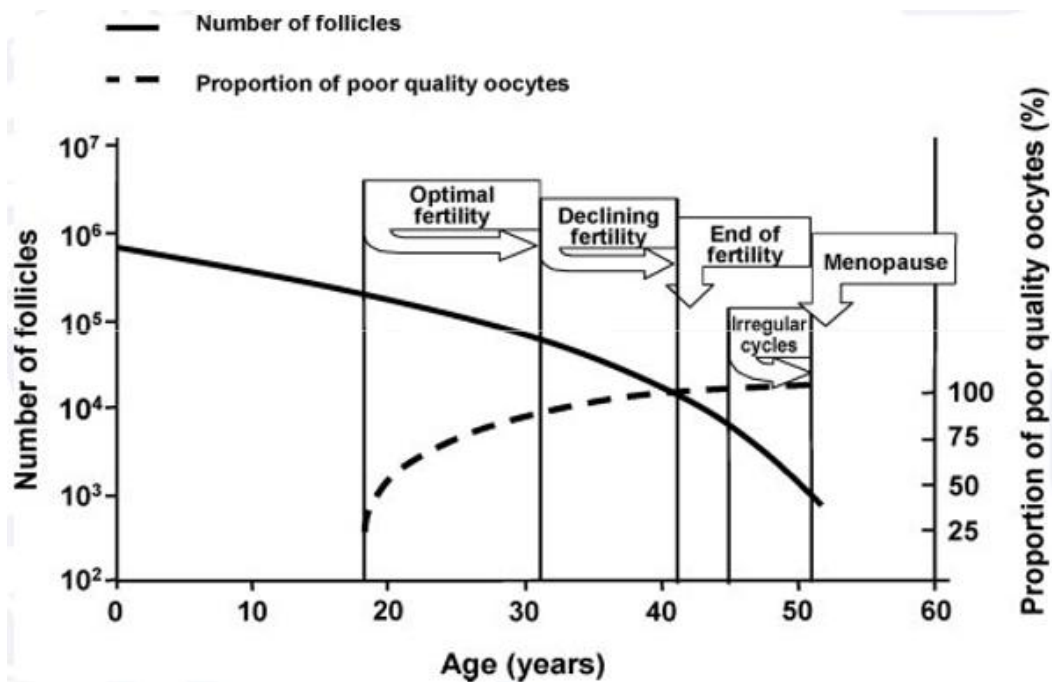


Figura 2: Representación esquemática del número de folículos primordiales presentes en los ovarios (—) y de la calidad ovocitaria (- - -) (anomalías cromosómicas) en relación con la edad de la mujer. Tomado de Broekmans et al. 2009

La ROD es la responsable de casi un 12% de todos los tratamientos de fecundación *in vitro* independientemente de la edad de la paciente. La edad materna avanzada y factores como el tabaquismo, la quimioterapia, la radiación abdominal, endometriosis, y la cirugía ovárica también se han asociado con la ROD (Timberlake et al. 2013). Del mismo modo causas genéticas o cromosómicas se han propuesto como responsables de una baja carga folicular al nacimiento o un aceleramiento en la atresia folicular, hechos que conllevan a una disminución en la reserva ovárica (Pu et al. 2014). La identificación de los pacientes con agotamiento folicular acelerado es fundamental

para que los profesionales puedan aconsejarles sobre sus opciones reproductivas (Timberlake et al. 2013; Li et al. 2015).

Además la ROD puede corresponderse en muchas ocasiones con una pobre respuesta a la estimulación ovárica. Entre un 8 y 15 % de los ciclos de FIV se cancelan debido a esta baja respuesta. Los pacientes con ROD, ya sea fisiológica debido a la edad o como consecuencia de un fallo ovárico prematuro, tienen mayores tasas de cancelación de ciclos y menores tasas de embarazo, entre un 2 - 4 %. Pese a las distintas opciones de tratamiento, mayores dosis de gonadotropinas, administración de andrógenos, etc. no existe un consenso de cuál es el mejor protocolo de estimulación ovárica para este tipo de pacientes, es por este motivo por lo que suponen un reto para las TRA. Muchas de estas pacientes deben recurrir a donación de ovocitos, ya que se obtienen muy pocos y son muchas las ocasiones en las que la calidad de los mismos se ve comprometida (Yilmaz et al. 2013; Li et al. 2015).

- **Hormona folículo estimulante (FSH)**

A pesar de que la edad de la mujer es el marcador de mayor valor predictivo para evaluar la reserva ovárica, a lo largo de los años se han ido descubriendo otros parámetros que podrían contribuir a esa predicción. El más comúnmente utilizado, ya desde los años 80, es la determinación de los niveles basales de FSH en la fase folicular temprana, más concretamente en el día tres del ciclo. La FSH es una hormona sintetizada por la adenohipófisis en respuesta a la producción de GnRH por el hipotálamo. A nivel del ovario, la FSH estimula el crecimiento de los folículos. Un aumento de los niveles de FSH en suero es consecuencia de una disminución en la producción de esteroides sexuales provocada por un descenso de los folículos, por lo que un valor de FSH superior a 10 mUI/ml es representativo de ROD (Scott et al. 2009).

El problema práctico de la utilización de los niveles de FSH para la predicción de la reserva ovárica es su variación intercíclica e intracíclica lo que conlleva a una cierta inestabilidad entre ciclos de la misma paciente (Nejat et al. 2011; Timberlake et al. 2013; Şengül et al. 2014).

- **Inhibina B**

La inhibina B es una proteína heterodimérica de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Es la inhibina dominante durante la fase folicular temprana, mientras que la inhibina A es dominante en la fase lútea. La inhibina B está

sintetizada por los folículos preantrales y antrales. Su función es la inhibición hipofisaria de FSH, por lo que cuando la inhibina B disminuye como consecuencia de un decrecimiento en el número de folículos, la FSH aumenta. También se ha observado que la determinación de FSH combinada con la cuantificación de inhibina B en el día tres del ciclo proporciona una predicción ligeramente más sensible de reserva ovárica. Se ha encontrado que mujeres con valores por debajo de 45 pg/ml en suero presentan baja respuesta al tratamiento con gonadotropinas, mayores tasas de cancelación de ciclos, menor número de ovocitos recuperados y menores tasas de embarazo en comparación con pacientes que presentaban más de 45 pg/ml (Scott et al. 2009).

La determinación de inhibina B posee el inconveniente de que no existe una técnica unánime para todos los laboratorios, por lo que no puede ser reproducible y su utilización como marcador de reserva ovárica está limitada (Scott et al. 2009).

- **Hormona Antimülleriana (AMH)**

La AMH, también llamada sustancia inhibidora Mülleriana, es una glicoproteína dimérica perteneciente a la superfamilia del factor de crecimiento TFG- β . Su existencia fue sugerida por primera vez por el científico francés Alfred Jost en la década de 1940. Jost demostró que una sustancia producida por los testículos, diferente de la testosterona, era la responsable de la degeneración de los conductos de Müller en los fetos masculinos (Timberlake et al. 2013; Lukaszuk et al. 2014; Peluso et al. 2014).

Durante la diferenciación sexual masculina, la AMH es producida y sintetizada por las células de Sertoli e induce la degeneración de los conductos de Müller, mientras que las células de Leydig producen testosterona, que estimula la diferenciación del conducto de Wolff en epidídimo, conductos deferentes y las vesículas seminales. En las mujeres, la ausencia de esta hormona durante el desarrollo embrionario permite el desarrollo de los conductos de Müller, que se diferencian en las trompas de Falopio y el útero. La AMH se produce exclusivamente en las gónadas. En las mujeres es sintetizada cuando se alcanza la pubertad por las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales hasta que alcanzan un tamaño de 4-6 mm (Peluso et al. 2014).

La principal función de AMH es inhibir la sensibilidad de los folículos antrales a la FSH en el reclutamiento, de tal manera que impide el paso de folículos primordiales a folículos en crecimiento una vez establecida la dominancia (Figura 3). También actúan sobre la actividad de la aromatasas, reduciendo la biosíntesis de estrógenos (Marca et al. 2010; Peluso et al. 2014).

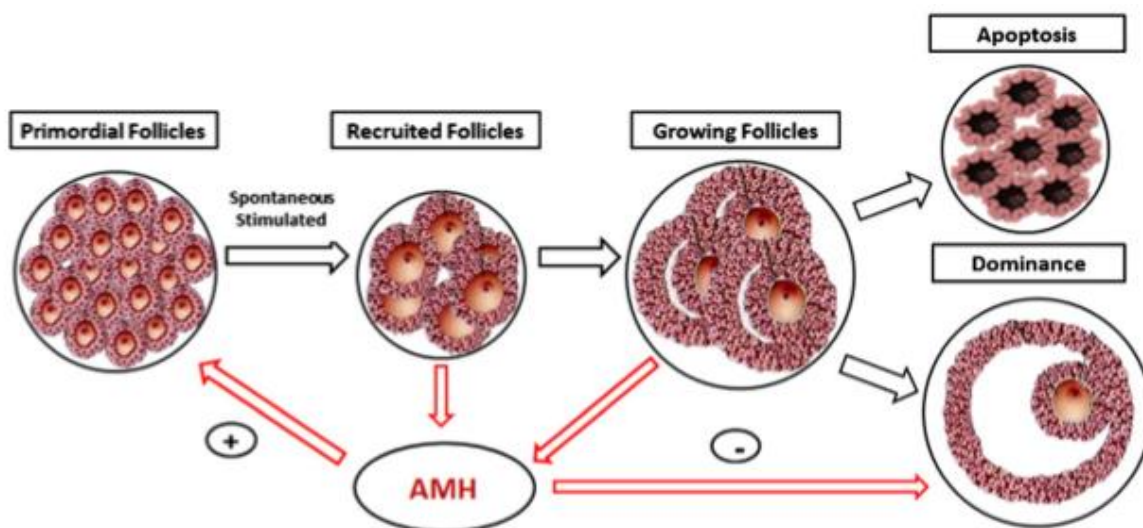


Figura 3: Producción de AMH por los folículos primordiales y su efecto inhibitorio sobre FSH. Tomado de Peluso et al. 2014.

El efecto de la AMH en la actividad ovárica es complejo, y hasta el momento, el papel de esta hormona no se conoce completamente. Sin embargo, la AMH parece regular el número de folículos en crecimiento y su selección para la ovulación. Se ha observado que la transición de folículos primordiales a folículos en crecimiento es mayor en ausencia de AMH, lo que resulta en un agotamiento prematuro del *pool* de folículos primordiales (Marca et al. 2010; Peluso et al. 2014).

Recientes investigaciones han establecido la utilización de AMH como marcador de reserva ovárica y como factor predictivo de respuesta a la estimulación ovárica en ciclos de FIV (Marca et al. 2010; Fleming et al. 2013; Lukaszuk et al. 2014).

La disminución de los niveles de AMH en suero se relaciona con una disminución en el número de folículos, por lo que parece ser un buen marcador de reserva ovárica. Varios estudios sostienen que los niveles de AMH se mantienen constantes a lo largo de todo el ciclo lo que la convierte en un parámetro endocrino único, comparado con los niveles de FSH, inhibina B y esteroides sexuales que presentan niveles fluctuantes a lo largo del ciclo menstrual. Además los niveles de

AMH también permiten diagnosticar el fallo ovárico prematuro, e incluso algunos autores postulan su mayor capacidad para predecir embarazo en comparación con la edad, aunque este hecho es muy discutido. La capacidad reproductiva disminuye con la edad debido a la reducción del *pool* folicular y de su calidad, por lo que a mayor edad, menor será el nivel de AMH en sangre (Fleming et al. 2013; Lukaszuk et al. 2014).

Los niveles de AMH se utilizan en reproducción asistida para predecir la respuesta al tratamiento de estimulación ovárica, ya que son indicativos del número de ovocitos recogidos tras la punción. Permite predecir tanto una baja como una alta respuesta antes de la estimulación ovárica, lo que posibilita la mejora de los tratamientos y reduce las tasas de cancelación del ciclo. Su determinación no debe realizarse durante la administración exógena de gonadotropinas, ya que los niveles de AMH disminuyen debido a la estimulación con FSH. Esta FSH permite el desarrollo de más folículos que pierden su expresión de AMH (Marca et al. 2010).

Valores de AMH inferiores a 0,5 ng/ml podrían ser indicativos de baja respuesta y ROD, mientras que valores superiores a 5 ng/ml se corresponderían con una hiperrespuesta (Lukaszuk et al. 2014).

Adicionalmente, un estudio ha revelado una posible correlación entre los niveles de AMH y el síndrome de ovario poliquístico (SOP), ya que estos son superiores en estas mujeres debido a que tienen un mayor número de folículos preantrales y antrales (Tal et al. 2014).

A pesar de los avances que ha permitido la determinación de los niveles de AMH en el ámbito de la reproducción, aún no hay estudios que relacionen estos niveles con la tasa de nacido vivo (Lukaszuk et al. 2014).

- **Recuento de folículos antrales (RFA)**

Otro marcador que se postula como un buen predictor de reserva ovárica es el recuento de folículos antrales (RFA) en día uno o dos del ciclo menstrual mientras se encuentran en situación basal. El recuento se realiza mediante ecografía transvaginal y representa la reserva ovárica funcional. Al igual que la AMH puede utilizarse para predecir la baja respuesta o hiperrespuesta al tratamiento con gonadotropinas (Scott et al. 2009).

La determinación es susceptible de la variación interobservador y del equipamiento utilizado. Además es fundamental que su medida se realice en la fase

folicular temprana ya que puede haber variaciones intercíclicas. No obstante se considera un marcador de respuesta y reserva ovárica más eficaz que la FSH o la inhibina B. Un RFA menor de 5 se considera ROD (Scott et al. 2009).

Actualmente la AMH junto con el RFA son los marcadores más sensibles de reserva ovárica y óptimos para la predicción de respuesta frente a un tratamiento (Marca et al. 2010; Lukaszuk et al. 2014).

1.3. Fallos de implantación y abortos de repetición

Los fallos de implantación y abortos de repetición afectan a un 3% de las mujeres en edad reproductiva. Diversos factores genéticos, endocrinos, anatómicos, infecciosos así como sanguíneos se asocian a este hecho (Tan et al. 2015).

El fallo de implantación se produce cuando el embrión no es capaz de penetrar en el endometrio uterino cinco días después de producirse la fecundación. Una de las principales causas es la no receptividad endometrial, que dificulta la invasión y adhesión previas a la implantación (Tan et al. 2015).

Cuando se realiza un ciclo de FIV, la transferencia debe coincidir con la “ventana de implantación” que se corresponde con un corto periodo de receptividad endometrial, entre el día 19 y 21 del ciclo menstrual o siete días después del pico de LH, marcado por una serie de cambios en las células proliferativas y secretoras. Un endometrio receptivo desde el punto de vista ecográfico es aquel que presenta un patrón trilaminar y un grosor de 9 a 14 mm (Simon & Laufer 2012; Revel 2012).

El conocimiento de la receptividad endometrial es limitado, pero de vital importancia para el éxito de las TRA. Un gran avance en el entendimiento de esta receptividad ha sido el desarrollo del test de receptividad endometrial (ERA) que permite el análisis de la expresión de 238 genes implicados en la ventana de implantación, tras una biopsia endometrial. Este *array* diagnóstica si la muestra obtenida pertenece a un endometrio receptivo, pre receptivo o post receptivo, independientemente de su aspecto histológico (Nejat et al. 2012).

Por otra parte se ha visto que diferencias entre el grupo sanguíneo materno y el grupo sanguíneo fetal pueden desencadenar abortos o fallos de implantación (Abdollahi et al. 2013).

1.4. Influencia del grupo sanguíneo sobre la fertilidad

Atendiendo en primer lugar a la reserva ovárica, su relación con el grupo sanguíneo es aún desconocida. En el artículo de Nejat y colaboradores del 2011, los investigadores establecieron una relación entre el grupo sanguíneo y ROD. Concluyeron que el antígeno A situado en la superficie de los eritrocitos protege la reserva ovárica, es decir, las pacientes con grupo sanguíneo A o AB no presentan, por lo general, ROD, mientras que las pacientes con grupo sanguíneo 0 pueden asociarse con ROD, ya que éstas son doblemente propensas a exhibir valores de FSH por encima de 10 mUI/ml. Esta relación es independiente de la edad avanzada (Nejat et al. 2011).

La explicación para este hecho reside en que los pacientes con grupo sanguíneo 0 no poseen el enzima transferasa A presente en los individuos con grupo sanguíneo A. Este enzima podría ser el responsable de la protección de la reserva ovárica y se especula que ejecuta un papel importante en los procesos de formación y pérdida de gametos. La ausencia de la actividad transferasa A, como en el caso del grupo sanguíneo 0, podría ser estar implicada de forma negativa en estos procesos. No obstante, los autores sostienen que se requieren más estudios para establecer una correcta relación entre el grupo sanguíneo y la reserva ovárica (Nejat et al. 2011).

Sin embargo, este artículo se contradice con el publicado por Lin y colaboradores en 2014, donde se evaluaba el efecto de grupo sanguíneo con la reserva ovárica de mujeres chinas. Los investigadores también encontraron una relación entre el grupo sanguíneo y ROD, pero en este caso el mayor porcentaje de pacientes con valores de FSH inferiores a 10 UI/ml eran aquellas con grupo sanguíneo 0. Por el contrario las mujeres con antígeno de superficie B, grupo sanguíneo B o AB, eran más susceptibles a presentar ROD, por poseer niveles superiores a 10 UI/ml de FSH. En esta ocasión el grupo sanguíneo A no pudo relacionarse con la reserva ovárica (Lin et al. 2014).

Por otra parte, existen otra serie de estudios en los que no se encontró ningún tipo de relación entre el grupo sanguíneo y la reserva ovárica. Así en el artículo publicado por Sengül y colaboradores en 2013 se manifiesta que únicamente la edad de la mujer puede asociarse con la reserva ovárica independientemente del grupo sanguíneo (Şengül et al. 2014). Lo mismo se traduce del artículo escrito por Timberlake y colaboradores en 2013, en el que tampoco se establece ninguna relación del grupo sanguíneo y la reserva ovárica, en cambio esta última si se puede ver influenciada por la obesidad, ya que mujeres con un índice de masa corporal (IMC) superior o igual a 30

kg/m² tienen riesgo aumentando de padecer ROD (Timberlake et al. 2013).

Como respuesta al artículo de Nejar, en 2012 De Mouzon y colaboradores publicaron un artículo en el que utilizaban como marcador de reserva ovárica la AMH. Estos autores no pudieron establecer ningún tipo de relación entre el grupo sanguíneo y los niveles de AMH ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre los cuatro grupos sanguíneos estudiados (De Mouzon et al. 2012).

Adicionalmente se ha observado que el grupo sanguíneo parece no asociarse con la respuesta a la estimulación ovárica en pacientes con una ROD (Pereira et al. 2015). Tampoco se relaciona con el número y grado de madurez de los ovocitos recuperados ni con la tasa de fertilización tras un ciclo de FIV (Spitzer et al. 2014).

Recientemente se han publicado trabajos que demuestran que el espermatozoide posee antígenos de grupos sanguíneos detectables, por tanto, la presencia de sustancias grupo específicas en las secreciones cervicales femeninas podrían impedir la fecundación al reaccionar contra ellos. En caso de que se llegará a producir, los anticuerpos naturales maternos podrían reaccionar contra los antígenos del espermatozoide. Si hay suficiente estímulo antigénico, la carga de anticuerpos materna será la que determine el grado y el tiempo de reacción. Una alta carga de anticuerpos evitaría la fecundación, mientras que una carga más baja (pero todavía elevada) ocasionaría la pérdida fetal temprana (Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012; Abdollahi et al. 2013).

Con respecto a la relación entre la incompatibilidad ABO y abortos de repetición, se ha descrito que existe una mayor incidencia de los mismos cuando ambos miembros de la pareja son incompatibles. Esto se agudiza cuando la mujer presenta grupo sanguíneo 0 y el varón es homocigoto para el antígeno A, ya que el feto podría ser incompatible con la madre. Sin embargo, la incompatibilidad ABO solo ocurre en el 20% de los embarazos, y solo en el 20% de los casos se desarrolla la enfermedad hemolítica, en la cual los anticuerpos maternos atacan a los glóbulos rojos del feto. La clínica de esta enfermedad, salvo en casos excepcionales, es más leve que la incompatibilidad Rh (Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012).

Por su parte la incompatibilidad Rh se produce cuando la madre es Rh negativo, es decir, no presenta la proteína en la membrana de los eritrocitos y el feto es Rh positivo. Los anticuerpos maternos en respuesta al antígeno RhD atraviesan la placenta,

causando la enfermedad hemolítica, que conduce a la hiperbilirrubinemia en el feto y posterior daño cerebral en el recién nacido (Freedman et al. 2011).

Evaluando los fallos de implantación, parece ser que el factor Von Willebrand (VWF), glucoproteína de la sangre que interviene en el momento inicial de la hemostasia, y el factor de coagulación VIII (FVIII) que se une a él, juegan un papel fundamental. Se ha descrito un mayor porcentaje de embarazos en mujeres con grupo sanguíneo B, frente a las mujeres que presentaban grupo sanguíneo 0. Esto se explica debido a que las mujeres con grupo sanguíneo B y AB presentan mayores niveles de VWF y FVIII que las que no poseen antígeno en la superficie de los eritrocitos. Estas últimas experimentan mayores tasas de fallos de implantación (Abdollahi et al. 2013; Mengoli et al. 2015).

En el caso de la fertilidad masculina, se ha relacionado el grupo sanguíneo 0 con un mayor índice de pérdida fetal. Además el grupo sanguíneo 0 se ha asociado con la infertilidad masculina, y esto podría ser debido a la presencia de antígenos (no pertenecientes al sistema AB0) en el plasma seminal que conducirían a la producción de anticuerpos antiespermáticos. También se ha encontrado una relación entre el Rh negativo y la infertilidad masculina (Khan et al. 2010; Abdollahi et al. 2013).

Finalmente es necesario apuntar que todos los artículos presentes en la literatura sobre esta línea de investigación difieren, por lo que se requiere el aporte de más estudios para esclarecer la posible relación entre el grupo sanguíneo y la fertilidad humana.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

A la vista de los datos recogidos por el Instituto de Reproducción Humana FIV4, un gran porcentaje de mujeres con baja reserva ovárica poseen factor Rh negativo. Por lo tanto, la hipótesis que se plantea es la siguiente:

El grupo sanguíneo junto con el factor Rh de pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida influye sobre el éxito de las mismas.

Para confirmar esta hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Determinar la relación entre el grupo sanguíneo y el factor Rh con la tasa de embarazo y aborto bioquímico, en mujeres sometidas a TRA con sus propios ovocitos.
2. Estudiar la relación entre el factor Rh y la baja reserva ovárica en mujeres receptoras de ovocitos.
3. Analizar la influencia del grupo sanguíneo y factor Rh sobre la calidad seminal, en hombres sometidos a TRA.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se ha desarrollado en el Instituto de Reproducción Humana FIV4 con pacientes que realizaron ciclos de estimulación o de preparación endometrial (en el caso de receptoras de ovocitos) para posterior transferencia embrionaria, durante el periodo de tiempo transcurrido entre octubre de 2015 y marzo de 2016. La guía de las buenas prácticas clínicas en el ámbito de la reproducción recomienda no tratar a aquellas mujeres con una edad superior a los 50 años, por lo que en este estudio la edad límite de las pacientes son los 50 años (Abellán 2010).

El estudio retrospectivo analiza 109 ciclos de estimulación ovárica con ovocitos propios y 54 ciclos de preparación endometrial en receptoras de ovocitos. Las pacientes se dividen en dos grupos en función de la edad, con edad inferior o igual a 37 años (≤ 37 años) y mayores de 37 años (> 37 años). En la tabla 1 se muestra la edad media acompañada de su desviación estándar para cada grupo de edad.

No se incluyen en el estudio parejas con IMC por encima de 29 kg/m^2 , tabaquismo o enfermedades autoinmunes.

Tabla 1: Características de los pacientes sometidos a estimulación ovárica o preparación endometrial.

	Estimulación ovárica ($n=109$)		Preparación endometrial ($n=54$)	
	≤ 37 años ($n=54$)	>37 años ($n=55$)	≤ 37 años ($n=10$)	>37 años ($n=44$)
♀ Edad	$34,8 \pm 2,5$	$40,2 \pm 2,1$	$35,1 \pm 2,4$	$42,2 \pm 3,6$
IMC	$23,5 \pm 6,3$	$22,4 \pm 2,9$	$20,5 \pm 3,1$	$22,4 \pm 3,1$
♂ Edad	$34,2 \pm 2,7$	$41,7 \pm 3,4$		

3.1. Determinación de FSH y AMH

Previamente a la estimulación ovárica, las pacientes realizan un análisis hormonal en condiciones basales (entre el 2º y el 4º día del ciclo menstrual) para conocer el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Es fundamental la determinación de FSH, ya que permite pronosticar la reserva ovárica y de AMH que también predice la respuesta al tratamiento.

Adicionalmente se analizan los niveles de LH, progesterona (P₄), estradiol (E₂), hormona estimulante del tiroides (TSH) y prolactina. Además se solicitan serologías a ambos miembros de la pareja para descartar cualquier tipo de infección. A los varones se les realiza un seminograma para evaluar la calidad seminal y motilidad espermática.

En todos los casos estudiados se utiliza la técnica FIV/ICSI por lo que fue indispensable la solicitud de un cariotipo de ambos miembros de la pareja para descartar anomalías cromosómicas.

3.2. Estimulación ovárica

En primer lugar se debe comprobar por ecografía que los ovarios se encuentran en situación basal, es decir, que no haya folículos mayores de 10 mm. Es entonces cuando comienza la estimulación ovárica, a partir del segundo día del ciclo. Habitualmente se administran anticonceptivos el ciclo previo al tratamiento para conocer con exactitud cuándo se producirá la menstruación.

Durante la estimulación ovárica se administra FSH o FSH combinado con LH, en función de las necesidades de la paciente, y análogos o antagonistas de la GnRH para evitar la ovulación espontánea y posterior cancelación del ciclo.

Existen tres protocolos basados en la administración de agonistas de la GnRH:

- Protocolo de larga duración: el análogo se administra desde la mitad de la fase lútea del ciclo anterior de esta forma la supresión hipofisaria conseguida es más eficaz.
- Protocolo de corta duración: aprovecha el efecto de estimulación inicial que tiene el análogo sobre la hipófisis. Este efecto se mantiene durante dos días aproximadamente y puede ser beneficioso para el reclutamiento folicular. En este caso el análogo comienza a administrarse entre el día uno y tres del ciclo en el que se realiza la estimulación. El tratamiento con gonadotropinas se inicia el tercer día del ciclo y se mantiene hasta la inducción de la ovulación.
- Protocolo ultracorto: la paciente recibe el análogo solo durante los tres primeros días del ciclo. Las gonadotropinas se administran en el segundo o tercer día del ciclo.

Las pautas y dosis de estimulación cuando se utilizan antagonistas de la GnRH son individualizadas en función de la paciente.

Una vez iniciado el tratamiento se realizan controles ecográficos sistemáticos para monitorizar el desarrollo y número de folículos, y también se controlan los niveles de estradiol en sangre. En el caso de que los niveles fueran muy elevados se cancelaría el ciclo por riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).

3.3. Inducción de la ovulación

Mediante ecografía se observa si se han desarrollado un buen número de folículos y si éstos han alcanzado el tamaño adecuado, entre 16 y 20 mm de diámetro. Si esto es así se induce la ovulación con HCG que presenta acción LH. En caso de que la paciente tuviera riesgo de SHO y el protocolo de estímulo llevará antagonista, la ovulación se desencadenaría con agonistas de la GnRH.

3.4. Punción ovárica

La punción ovárica o folicular se realiza 36 horas después de la administración de HCG, momento en el cual se produce la ovulación. Este procedimiento es llevado a cabo por el ginecólogo en el quirófano mediante ecógrafo transvaginal acoplado a una aguja de punción.

En el laboratorio todos los medios y placas para la captación ovocitaria se encuentran atemperados a 37 °C y rotulados con la identificación de la paciente.

El líquido folicular se vierte en placas petri y se visualiza bajo la lupa para captar los ovocitos rodeados de células del cúmulo y granulosa. Posteriormente se llevan a se incuban en placas de cuatro pocillo con medio de fertilización durante dos o cuatro horas (dependiendo de la técnica de fertilización usada) a 37 °C, en atmósfera al 6 % de CO₂ y 5 % de O₂.

Si los ovocitos son destinados a FIV, se incuban solo durante dos horas y pasado ese tiempo se disponen en gotas de 100 µl de medio de fertilización. En cada gota (que posee un único ovocito) se vierte un volumen de muestra seminal equivalente a 200.000 espermatozoides. Posteriormente se introducen en el incubador a 37 °C, en atmósfera al 6 % de CO₂ y 5 % de O₂ y permanecen allí hasta el día siguiente donde se evalúa la fertilización tras el denudado, eliminación de la granulosa.

Los ovocitos destinados a ICSI son denudados, tras dos horas de incubación, mediante digestión enzimática con hialurodinasa, y seguidamente por aspiración mecánica mediante un stripper que lleva acoplado un *flexiplet* con un diámetro de 140

micras, para eliminar las células del cúmulo que pudieran quedar. Es entonces cuando se procede a la valoración de su estado madurativo, ya que únicamente los ovocitos que hayan extruido el primer corpúsculo polar (CPI) se encuentran en metafase II (MII) y son aptos para su inyección.

Los ovocitos maduros se trasvasan a una nueva placa de 4 pocillos con medio de fertilización y se incuban durante dos horas más a 37 °C, al 6 % CO₂ y 5 % de O₂.

3.5. Procesamiento del semen

Las muestras de semen proceden, en la mayoría de los casos, de la eyaculación del paciente.

Una vez que la muestra esté licuada (más o menos 30 minutos después de su recogida) se mide el volumen de eyaculado y se toman 20 µl para analizar la concentración y motilidad espermática inicial, utilizando la cámara Makler. Posteriormente se procede a la capacitación de la muestra seminal, es decir, a la obtención de los espermatozoides más móviles. Existen dos procedimientos:

- Swim-up

Para realizar este procedimiento se toma aproximadamente 1 ml de muestra seminal y se añade 1 ml de medio tamponado con HEPES, previamente atemperado a 37 °C e identificado con los datos de la paciente. Posteriormente se centrifuga a 1800 rpm durante 5 minutos.

Tras el lavado se descarta el sobrenadante, donde queda depositado el plasma seminal y se añaden 500 µl de medio tamponado con HEPES sobre las paredes del tubo para evitar alterar el *pellet* y se mantiene en inclinación durante 45 minutos. Los espermatozoides con motilidad progresiva se desplazarán, “nadarán”, hacia la superficie. Transcurrido ese tiempo, se recoge el sobrenadante que contendrá los espermatozoides con motilidad progresiva, clasificados como A y B.

- Gradiente de densidad

Este procedimiento requiere la preparación de dos medios con diferentes densidades, 80 % en la parte inferior y 40 % en la superior. Sobre el medio al 40 % se añade el semen y se centrifuga a 1200 rpm durante 15 minutos. A continuación se retiran las capas superiores, se añaden 500 µl de medio tamponado con HEPES sobre el

pellet y se centrifuga a 1800 rpm durante 5 minutos. Finalmente se resuspende el *pellet* que contiene los espermatozoides óptimos.

La utilización de una u otra técnica depende de las características de la muestra seminal. Siempre que sea posible se realiza *swim-up* ya que es la técnica más fisiológica aunque si la muestra contiene muchas células redondas se lleva a cabo un gradiente de densidad, puesto que permite la obtención de una suspensión más limpia.

- **Semen de donante**

Cuando es necesario recurrir a semen de donante, las muestras se encuentran congeladas en pajuelas identificadas con el código del donante. El procesamiento del semen antes de la congelación es diferente en función del banco que dispense la muestra.

Las muestras pueden venir ya procesadas, es decir, ya se han lavado y realizado, en este caso, *swim-up* antes de la congelación, por ello solo es necesario descongelar, al baño maría durante 5 minutos a 39 °C antes de su utilización. Cuando las muestras recibidas solo han sido sometidas a un primer lavado y congelado, tras la descongelación es necesaria su capacitación, realizando un *swim-up* o un gradiente de densidad en función de la calidad de la muestra.

- **Biopsia testicular**

En los casos donde no se observan espermatozoides en el eyaculado se puede realizar una biopsia testicular. Hay varios métodos para obtener espermatozoides directamente desde el testículo. En FIV4 se realiza la extracción testicular de espermatozoides (TESE). Se obtiene una muestra de tejido y se dislacera con el objetivo de que los espermatozoides que se encuentren en él queden expuestos, posteriormente se congela. La descongelación se realiza dos horas antes de la utilización pero a diferencia del procesamiento de las muestras de semen, en las muestras de biopsia testicular no se realiza la capacitación de espermatozoides.

3.6. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Cuatro horas después de la punción folicular se realiza la ICSI a los ovocitos maduros. La técnica ICSI requiere un micromanipulador, acoplado a un microscopio invertido, una platina calefactada a 37°C para garantizar el correcto mantenimiento de

ovocitos y espermatozoides y un equipo de microinyección que permite la inyección y succión con la máxima precisión.

Las placas se preparan situando una gota central de polivinilpirrolidona (PVP), un compuesto sintético y viscoso que retarda el movimiento de los espermatozoides, facilitando su manejo para la inyección. Los espermatozoides se disponen en una gota cercana a la gota central y se forma un puente entre ellas, de manera que los espermatozoides que posean mayor motilidad y morfología avanzarán y llegarán al extremo de la gota, siendo éstos los que se seleccionen para la microinyección (Figura 4). En el caso de utilizar una muestra procedente de biopsia testicular, se añaden 5 µl de suspensión con espermatozoides y 1 µl de pentoxifilina para activar su movimiento.

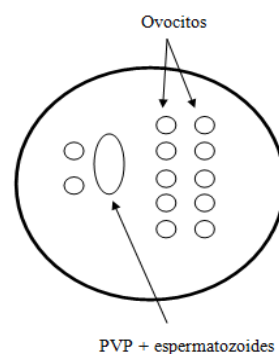


Figura 4: Disposición de las gotas en una placa de ICSI.

En primer lugar se lleva a cabo la captación del espermatozoide mediante la pipeta de inyección, después de haber sido inmovilizado mediante una muesca en la cola. Posteriormente, utilizando la pipeta de succión se coloca el ovocito con el CPI a las 12 o a las 6 horarias, para evitar la desorganización del huso, ya que la inyección del espermatozoide se realiza a las 3 horarias.

Los ovocitos microinyectados se depositan en placas con medio de cultivo secuencial, que requiere ser renovado en función del estadio de desarrollo embrionario, o medio no secuencial, el cual no requiere renovación porque contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del embrión. Se incuban a 37 °C, 6% de CO₂ y 5% de O₂. Pasadas entre 16 y 20 hora debe confirmarse si se ha producido la fertilización mediante la visualización de los dos pronúcleos y los dos corpúsculos polares de ambos progenitores.

Finalmente es fundamental el seguimiento del desarrollo embrionario aplicando los criterios establecidos por la Asociación Española sobre el Estudio de la Biología de

la Reproducción (ASEBIR), para la elección del embrión con mayor probabilidad de implantación.

3.7. Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria se realiza en día dos o tres de desarrollo embrionario o en día cinco en estado de blastocisto, en función de la calidad de los embriones.

En algunos casos no fue posible realizar la transferencia en fresco por no existir una buena sincronía con el endometrio, por lo tanto los embriones fueron vitrificados y posteriormente desvitrificados para su criotransferencia. Tanto las mujeres receptoras como aquellas que vayan a ser sometidas a una criotransferencia requieren una leve preparación endometrial, con la administración de estradiol, desde el primer día de ciclo hasta que el endometrio alcance un grosor de al menos 7 mm y con patrón trilaminar, y progesterona tantos días previos a la transferencia, como días de desarrollo tenga el embrión.

Cuando los embriones presentan una zona pelúcida engrosada y rígida se realiza la eclosión asistida, *hatching*. Para ello se utiliza un láser que crea un orificio en la zona pelúcida por termólisis facilitando su rotura y posterior implantación del embrión.

El catéter de transferencia consta de dos cánulas, la externa sirve de protección a la interna, donde se encuentra el embrión embebido en el medio de cultivo correspondiente a su estado de desarrollo, en su paso por el tracto genital femenino. En primer lugar el ginecólogo introduce la cánula externa guiado por ecografía y posteriormente el biólogo introduce en ella el/los embriones.

3.8. Diagnóstico de embarazo y aborto

A los quince días de la transferencia embrionaria, se determina el diagnóstico del embarazo bioquímico, mediante la evaluación de los niveles de la subunidad beta de HCG (β -HCG). Se analiza esta hormona porque es sintetizada por el embrión cuando comienza a desarrollarse. El nivel de β -HCG debe ser superior a 5 UI/l para confirmar embarazo bioquímico.

Posteriormente se corrobora el embarazo clínico siete semanas después mediante ecografía donde se debe observar un saco embrionario con latido fetal positivo. La ausencia de este latido fetal tras ecografía se traduciría en un aborto bioquímico.

3.9. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en este estudio se realiza mediante el programa estadístico SPSS (Chicago, Illinois). Para comparaciones de datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de chi cuadrado (χ^2) de Pearson. En el caso del análisis estadístico de la influencia del factor Rh sobre la baja reserva ovárica, medida en términos de AMH, se realizó una correlación de Pearson al tratarse esta última de una variable continua. Los valores de las variables categóricas son expresados mediante porcentajes, mientras que los de las variables continuas son expresados como medias. Solo se habrían considerado como indicativos de significación estadística aquellos valores de ρ (p-valor) menores de 0,05.

4. RESULTADOS

Para llevar a cabo este trabajo se ha realizado un estudio retrospectivo de 109 ciclos de estimulación ovárica ($n = 109$) y 54 ciclos de preparación endometrial ($n = 54$). Adicionalmente se analizaron las parejas de las pacientes sometidas a estimulación ovárica, un total de 92 varones ($n = 92$).

4.1. Distribución demográfica de la población

Sin atender a la clasificación por grupos de edad, la edad media de las pacientes sometidas a ciclos de estimulación es de 37,5 años \pm 3,5 años, siendo la de sus respectivas parejas 38,7 años \pm 4,8 años. En el caso del grupo de recepción de ovocitos la media de edad se eleva a los 41,1 años \pm 4,3 años, en este grupo los varones no fueron estudiados.

En líneas generales, el grupo sanguíneo más abundante, tanto en ciclos de estimulación como de preparación endometrial, es el grupo A (46,8 % y 48,1 %, respectivamente). Mientras que en los varones el grupo sanguíneo predominante es el 0 (43,5 %) (Tabla 2). Con respecto al factor Rh, el 91,3 % de los varones son Rh positivo, del mismo modo es el más abundante dentro de las pacientes sometidas a ciclos de estimulación (85,3 %) y recepción de ovocitos (77,8 %) (Tabla 3; Figura 5).

Tabla 2: Distribución de los pacientes en función del grupo sanguíneo.

	Edad media pacientes (años)	Grupo sanguíneo			
		0	A	B	AB
Estimulación ovárica ♀ ($n = 109$)	37,5 \pm 3,5	47 (43,1 %)	51 (46,8 %)	9 (7,2 %)	2 (1,8%)
Preparación endometrial ♀ ($n = 54$)	41,1 \pm 4,3	20 (37,0 %)	26 (48,1 %)	5 (9,3 %)	2 (3,7 %)
♂ ($n = 92$)	38,7 \pm 4,8	40 (43,5 %)	38 (41,3 %)	7 (7,5 %)	7 (7,5 %)

Tabla 3: Distribución de los pacientes en función del factor Rh.

	Edad media pacientes	Rh +	Rh -
Estimulación ovárica ♀ (n =109)	37,5 ± 3,5	93 (85,3 %)	16 (14,7 %)
Preparación endometrial ♀ (n = 54)	41,1 ± 4,3	42 (77,8 %)	12 (22,2 %)
♂ (n = 92)	38,7 ± 4,8	84 (91,3 %)	8 (8,7 %)

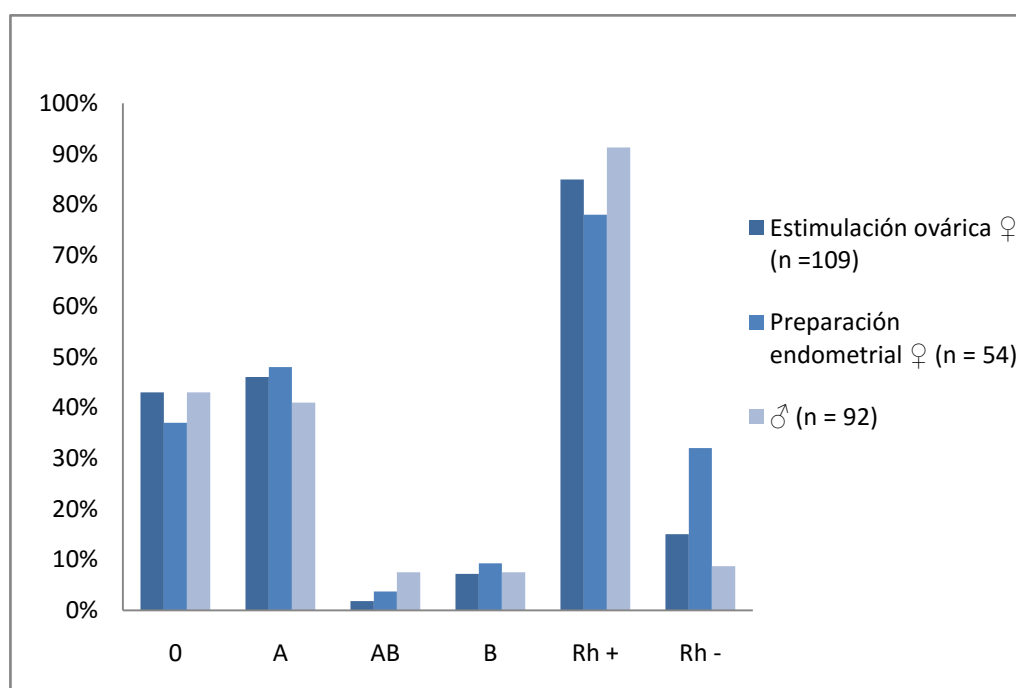


Figura 5: Representación gráfica de la distribución demográfica de la población según grupo sanguíneo y Rh.

Atendiendo más concretamente a la distribución por grupo sanguíneo junto con factor Rh el más abundante es el A positivo, tanto en ciclos de estimulación ovárica, (42,2 %) (Tabla 4) como en ciclos de preparación endometrial (37,0 %) (Tabla 5). El grupo sanguíneo y factor Rh predominantes entre los varones estudiados es el 0 positivo (38,7 %) (Tabla 6). La edad media de los pacientes en función del grupo sanguíneo y Rh que poseen varía con respecto a la edad media global de cada una de las tres poblaciones. Los tipos sanguíneos B negativo y AB negativo no se encuentran representados en este estudio, debido a que en ninguno de los tres grupos analizados existen pacientes con dichos grupos.

Tabla 4: Distribución de las pacientes sometidas a ciclos de estimulación ovárica ($n=109$) en función del grupo sanguíneo y Rh.

Grupo sanguíneo y Rh ♀	0-	0+	A-	A+	B+	B-	AB+	AB-
n	10 (9,2 %)	37 (33,9 %)	5 (4,6 %)	46 (42,2 %)	9 (8,3 %)	0	2 (1,8 %)	0
Edad ♀ (años)	37,5 ± 3,5	37,9 ± 3,4	38,0 ± 2,0	37,7 ± 3,8	38,4 ± 2,7	-	41,5 ± 3,5	-

Tabla 5: Distribución de las pacientes receptoras de ovocitos ($n=54$) en función del grupo sanguíneo y Rh.

Grupo sanguíneo y Rh ♀	0-	0+	A-	A+	B+	B-	AB+	AB-
n	5 (9,3 %)	15 (27,7 %)	6 (11,1 %)	20 (37,0 %)	5 (9,3 %)	0	3 (3,7 %)	0
Edad ♀ (años)	40,0 ± 3,3	40,6 ± 5,2	40,0 ± 3,3	41,7 ± 4,4	39,8 ± 2,4	-	40,5 ± 2,2	-

Tabla 6: Distribución de los varones cuyas parejas han sido sometidas a ciclos de estimulación ovárica ($n=92$) en función del grupo sanguíneo y Rh.

Grupo sanguíneo y Rh ♂	0-	0+	A-	A+	B+	B-	AB+	AB-
n	4 (4,3 %)	36 (38,7 %)	4 (4,3 %)	34 (36,6 %)	7 (7,5 %)	0	7 (7,5 %)	0
Edad ♂ (años)	39,8 ± 10,2	37,7 ± 4,9	43,3 ± 1,5	39,3 ± 5,2	38,3 ± 1,6	-	41 ± 1,5	-

4.2. Efecto del grupo sanguíneo y el factor Rh sobre la tasa de embarazo y aborto bioquímico

En el primer abordaje del estudio en el que se analizó la influencia del grupo sanguíneo sobre la tasa de embarazo en las pacientes sometidas a estimulación ovárica ($n = 109$), no se obtuvieron diferencias significativas (p -valor= 0,256). El número de embarazos por ciclo en función del grupo sanguíneo fue de 8 (17,0 %) en pacientes con grupo sanguíneo 0, 13 (25,5 %) con grupo sanguíneo A y 0 % tanto para el grupo sanguíneo B como AB (Tabla 7).

Tabla 7: Tasa global de embarazo y no embarazo por ciclo en pacientes sometidas a estimulación ovárica en función del grupo sanguíneo.

Grupo sanguíneo ♀	0	A	B	AB
n	47 (43,1 %)	51 (46,8 %)	9 (22,2 %)	2 (1,8 %)
Edad ♀ (años)	37,8 ± 3,4	36,8 ± 3,7	38,4 ± 2,7	41,5 ± 3,5
Embarazo	8 (17,0 %)	13 (25,5 %)	0 (0%)	0 (0 %)
No embarazo*	39 (83,0 %)	38 (74,5 %)	8 (100 %)	2 (100 %)

*Entendiendo por no embarazo tanto β -HCG negativa como aborto bioquímico

Del mismo modo no se obtuvieron diferencias significativas cuando se evaluó la influencia del factor Rh sobre la tasa de aborto bioquímico en el mismo grupo de pacientes (p -valor= 0,284), resultando el número de abortos bioquímicos por ciclo en 9 (9,6 %) en pacientes Rh positivo y 3 (18,8 %) en pacientes Rh negativo (Tabla 8).

Tabla 8: Tasa global de aborto bioquímico por ciclo en pacientes sometidas a ciclos de estimulación ovárica según factor Rh.

Rh ♀	Rh +	Rh -
n	93 (85,3 %)	16 (14,7 %)
Edad ♀ (años)	37,4 ± 3,6	37,7 ± 2,9
Aborto bioquímico	9 (9,6 %)	3 (18,8 %)

4.3. Influencia del factor Rh sobre la baja reserva ovárica medida en términos de la AMH

El análisis de la posible relación entre el factor Rh y la baja reserva ovárica se realizó en las pacientes receptoras de ovocitos ($n=54$). Todas estas pacientes poseían una AMH por debajo de 1 ng/ml lo que se traduce en baja respuesta ovárica que se relaciona, como se mencionó en apartados anteriores, con baja reserva ovárica.

No se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de AMH entre las pacientes Rh positivo y Rh negativo (p -valor= 0,861). La media de AMH en las pacientes Rh positivo era de $0,26 \text{ ng/ml} \pm 0,28 \text{ ng/ml}$ y en el caso de las pacientes Rh negativo de $0,29 \text{ ng/ml} \pm 0,35 \text{ ng/ml}$ (Tabla 9).

Tabla 9: Niveles de AMH por ciclo en pacientes receptoras de ovocitos en función del factor Rh.

Rh ♀	Rh +	Rh -
n	42 (77,8 %)	12 (22,2 %)
Edad ♀ (años)	$41,0 \pm 4,4$	$41,2 \pm 4,1$
AMH (ng/ml)	$0,26 \pm 0,28$	$0,29 \pm 0,35$

4.4. Efecto del grupo sanguíneo y del factor Rh sobre la calidad seminal

Por último se estudió el efecto del grupo sanguíneo sobre la calidad seminal en los varones cuyas parejas habían sido sometidas a ciclos de estimulación ovárica ($n=92$). Los varones se clasificaron en normozoospermicos o con alteración seminal.

El resultado reveló que no existían diferencias significativas entre la calidad seminal y el grupo sanguíneo (p -valor= 0,064). El número de varones normozoospermicos, tanto con grupo sanguíneo 0 como con grupo sanguíneo A era de 19 (47,5 % y 50 %, respectivamente), 5 con grupo sanguíneo AB (71,4 %) y 7 con grupo sanguíneo B (100 %). Con respecto al número de varones que presentaban alteración seminal, éste era de 21 (52,5 %) en pacientes con grupo sanguíneo 0, 19 (50 %) en pacientes A, 2 (28,6 %) en pacientes AB y 0 (0 %) en pacientes B (Tabla 10).

Tabla 10: Tasa de normozoospermia y alteración seminal en los varones según el grupo sanguíneo.

Grupo sanguíneo ♂	0	A	B	AB
n	40 (43 %)	38 (41 %)	7 (7,5 %)	7 (7,5 %)
Edad ♂ (años)	37,9 ± 5,5	39,8 ± 5,1	38,3 ± 1,6	41,0 ± 1,5
Normozoospermia	19 (47,5 %)	19 (50 %)	7 (100%)	5 (71,4 %)
Alteración seminal	21 (52,5%)	19 (50 %)	0 (0 %)	2 (28,6 %)

Del mismo modo se estudió la relación entre la calidad seminal y el factor Rh, sin encontrarse tampoco diferencias significativas (p -valor= 0,625). El número de varones normozoospermicos era de 45 (53,6 %) en pacientes Rh positivo y 5 (62,5 %) en los pacientes Rh negativo. Atendiendo al número de varones con alteración seminal, éste era de 39 (46,4 %) en el caso de los pacientes Rh positivo y 3 (37,5 %) con Rh negativo (Tabla 11).

Tabla 11: Tasa de normozoospermia y alteración seminal en varones cuyas parejas han sido sometidas a ciclos de estimulación en función del factor Rh.

Rh ♂	Rh +	Rh -
n	84 (91,3 %)	8 (8,7 %)
Edad ♂ (años)	38,7 ± 4,7	41,5 ± 6,9
Normozoospermia	45 (53,6 %)	5 (62,5 %)
Alteración seminal	39 (46,4%)	3 (37,5 %)

5. DISCUSIÓN

Los resultados pretenden analizar principalmente la posible influencia del grupo sanguíneo y factor Rh sobre la fertilidad humana, ya que se podría convertir en un factor más a evaluar en caso de infertilidad.

En un primer abordaje del estudio se determinó la distribución demográfica de los pacientes dentro de cada uno de los tres grupos analizados, estimulación ovárica, preparación endometrial y varones (parejas de las pacientes sometidas a estimulación ovárica). Comparando la edad media de cada grupo, son las pacientes receptoras de ovocitos las que poseen una edad superior, siendo 41,1 años \pm 4,3 años, frente a 37,5 años \pm 3,5 años en el caso de las pacientes sometidas a estimulación ovárica y 38,7 años \pm 4,8 años en el caso de los varones. Esto no es de extrañar, ya que la mayoría de las pacientes susceptibles a recepción de ovocitos presentan ROD lo que impide la consecución de gestación con sus propios ovocitos. Es sabido que una de las principales causas de este decrecimiento en número y calidad ovocitaria es la edad avanzada. Por ello, las mujeres de este grupo presentan, casi en su totalidad, una edad superior a los 35 años, edad a la que es más que evidente el descenso de la fertilidad (Timberlake et al. 2013; Şengül et al. 2014; Spitzer et al. 2014).

Atendiendo a los datos presentes en el estudio, únicamente dos pacientes receptoras de ovocitos poseían una edad inferior a los 35 años, concretamente 32 años. Por lo que es importante destacar que independientemente de la edad, la ROD también se encuentra asociada a otros factores, como el tabaquismo, la obesidad, la quimioterapia, la radiación abdominal, la endometriosis o la cirugía ovárica (Peluso et al. 2014; Li et al. 2015). Además, existen causas genéticas que pueden producir una ROD, bien porque las alteraciones en los genes se asocien con una depleción folicular, traducida como una carga folicular baja al nacimiento o un aceleramiento en la atresia folicular, o bien porque dichas alteraciones afecten a los folículos (por ejemplo; mutaciones en los receptores de FSH foliculares), produciendo una disfunción de los mismos (Pu et al. 2014). No obstante en el presente estudio, a excepción de las dos pacientes más jóvenes, la edad avanzada fue la principal causa de ROD y por tanto de acceder al programa de ovodonación.

Adicionalmente, cabe destacar que la edad media en el grupo de pacientes sometidas a estimulación ovárica (37,5 años \pm 3,5 años) no difiere mucho de la edad

media de la mujer española que se somete por primera vez a TRA, siendo esta última 38,5 años según el último registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en 2013 (SEF 2013).

Con respecto a la distribución por grupo sanguíneo y Rh, el más común dentro de las mujeres del estudio, tanto sometidas a estimulación ovárica como a preparación endometrial, es el A positivo, mientras que en los varones es más abundante el tipo sanguíneo 0 positivo. Evaluando de forma global la totalidad de los pacientes estudiados (independientemente del grupo al que pertenecen) el tipo sanguíneo predominante es el A positivo (39,2 % de los 255 datos analizados). Esto difiere del último registro realizado por la Federación Española de Donantes de Sangre en 2015, donde se recoge que el 36 % de los donantes son 0 positivo superando en un punto a los donantes A positivo (35 %). En cambio, los datos entre el presente estudio y el último registro si son concordantes cuando se evalúa el grupo sanguíneo menos abundante. La Federación de Donantes de Sangre refleja que tan solo el 1 % de los donantes son AB negativos por detrás de los donantes B negativos que constituyen un 2 %, similar a lo que ocurre en las tres poblaciones en estudio, donde los grupos sanguíneos AB negativo y el B negativo no están representados.

Por otra parte, el Rh positivo es el más abundante en las tres poblaciones analizadas (superando el 75 % en los tres casos), similar a lo que se puede observar en el registro de la Federación de Donantes, donde el 81 % de los mismos son Rh positivo. Si bien es cierto que la distribución de grupo sanguíneo y factor Rh varía levemente en función de la comunidad autónoma que se analice (Manceñido 2015).

A nivel mundial la distribución demográfica en función del grupo sanguíneo apenas varía según las áreas geográficas. Así en Irán el tipo de sangre predominante es el 0 positivo y el menos abundante el AB negativo, como ocurre en España (Torabizade et al. 2016).

En 2012 O'Neill publica un artículo sobre la frecuencia del antígeno A y B, así como de la ausencia de ambos (0) en las distintas poblaciones del planeta. El autor establece, en líneas generales, que el tipo de sangre más común es el 0 positivo (36,45 %) y el menos común el AB negativo (0,45 %), este último con un porcentaje aún más bajo que el registrado en España. Al mismo tiempo evalúa el factor Rh, siendo el

porcentaje de personas Rh positivo claramente superior al de personas Rh negativo, 90 % frente 10 %. Si bien es cierto que el artículo refleja cambios en el grupo sanguíneo predominante según el área de estudio, por ejemplo en Europa del Este la ausencia de antígeno (grupo 0) es mucho menos frecuente, mientras que en Asia está el mayor porcentaje de personas con grupo sanguíneo AB (O'Neill 2012).

Antes de comenzar con el análisis de los resultados obtenidos sobre fertilidad y grupo sanguíneo es importante apuntar que la tasa de gestaciones utilizando ovocitos propios mediante la técnica FIV/ICSI disminuye a partir de los 35-37 años, y de forma más acusada a partir de los 40 años. Mientras que la tasa de aborto aumenta con la edad. Como ejemplo, según el último registro de la SEF la tasa de gestaciones por ciclo en mujeres menores de 35 años fue de 35,8 % frente al 17,3 % en mujeres mayores de 40 años. Del mismo modo aumenta la tasa de aborto por gestación, siendo de un 14,2 % en mujeres menores de 35 años frente a un 41,4 % en mujeres mayores de 40 años (SEF 2013). Este es el principal motivo por el cual se han separado los datos de cada grupo en dos grupos de edad, ya que la edad avanzada es un indicador de una menor probabilidad de embarazo y mayor posibilidad de aborto tras un tratamiento de fertilidad y podría condicionar los resultados.

Los resultados sobre la tasa global de embarazo y el grupo sanguíneo en mujeres sometidas a ciclos de estimulación ovárica reflejan la ausencia de relación entre ambas variables. Esto concuerda con lo obtenido por Spitzer y colaboradores en 2014, donde evaluaron las implicaciones del tipo de sangre con la infertilidad. En el mismo se recogen 1202 datos de pacientes sometidas a ciclos de FIV/ICSI, divididas en dos grupos de edad. Los autores sostienen que no se encontraron diferencias significativas entre la tasa de gestación y el grupo sanguíneo. En el grupo de edad comprendido entre 21 y 36 años las tasas de gestación por ciclo se encontraban en torno a un 50 % en todos los tipos de sangre, mientras que el grupo comprendido entre 37 y 43 años presentaba una tasa de gestación del 30 % en todos los tipos sanguíneos. Este 20 % menos en la tasa de gestación en mujeres mayores de 36 años evidencia una vez más la influencia de la edad avanzada en la consecución de embarazo (Spitzer et al. 2014).

Sin embargo, Mengoli y colaboradores publicaron el pasado año un estudio sobre el sistema AB0 y la fertilidad, en el se pueden observar mayores tasas de embarazo en mujeres con grupo sanguíneo B. Los autores explican este hecho atendiendo a la suposición de que la fertilidad femenina está relacionada positivamente con los niveles de los factores de coagulación, los cuales facilitan la implantación del embrión. La sangre tipo B y en menor medida AB, posee altos niveles de VWF que, como se explicó anteriormente, es una glicoproteína sanguínea que interviene en la hemostasia, y por lo tanto también presenta altos niveles de FVIII en plasma. Es por esto que las pacientes con grupo sanguíneo B poseen mayores tasas de gestación, al tener mayores niveles de factores de coagulación que facilitan la implantación y posterior desarrollo embrionario. Además el grupo sanguíneo B también se asoció con un menor porcentaje de pérdida fetal. Con respecto al grupo sanguíneo A los autores no pudieron establecer ninguna conclusión (Mengoli et al. 2015).

A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en nuestro estudio, la tasa de gestaciones fue superior en mujeres con grupo sanguíneo A, un 25,5 % frente a un 0 % en mujeres con grupo sanguíneo B. Además en estas pacientes la tasa de aborto bioquímico fue de un 100 %, ya que ninguna de las mujeres con β -HCG positiva llegó a latido fetal. Evidentemente el número de datos era muy escaso, ya que solo 9 pacientes presentaban grupo sanguíneo B frente a las 51 que poseían grupo sanguíneo A. Además la edad media de las pacientes tipo B era 1,6 puntos superior a las de tipo A, (38,4 años frente a 36,8 años) lo que influye a la hora de conseguir gestación.

Al igual que con el grupo sanguíneo y la tasa de gestación, no se encontró ninguna relación entre el factor Rh y la tasa de aborto bioquímico. Este análisis se realizó debido a que a simple vista la tasa de aborto bioquímico en mujeres con Rh negativo era el doble que las que poseían Rh positivo. No se ha localizado en la literatura ningún artículo que relacione la fertilidad femenina con el factor Rh, pero si existen trabajos que relacionan la incompatibilidad AB0 con los abortos de repetición (Khan et al. 2010; Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012; Abdollahi et al. 2013).

Parece ser que existe una mayor incidencia de abortos de repetición cuando las parejas son incompatibles, y aún más cuando la mujer posee grupo sanguíneo 0 (no expresa en superficie ni antígeno A ni antígeno B) y el varón es homocigoto para el antígeno A, ya que el embrión resultante siempre presentará el antígeno A. Este

embrión podría ser incompatible con la madre lo que conllevaría a la pérdida fetal (Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012). Aunque en este proyecto no se evaluó la influencia del grupo sanguíneo del varón en este análisis estadístico debido a que no se hubiera podido determinar si el varón es homocigoto o heterocigoto para los antígenos A y B, si que se ha observado un porcentaje mayor de tasa de aborto bioquímico en un tipo de pareja concreto. En las pacientes sometidas a estimulación ovárica se produjeron 12 abortos bioquímicos, el 33,3 % de los mismos se atribuyen a las parejas formadas por una mujer con grupo sanguíneo 0 y un varón con grupo sanguíneo A. El porcentaje de aborto bioquímico en las parejas en las que ambos poseen grupo sanguíneo 0 o cuando la mujer posee grupo sanguíneo A y el varón grupo sanguíneo 0 es un 25 %, porcentaje más bajo que en el caso anterior. Por lo tanto lo obtenido en este trabajo concuerda con lo publicado por Hassanzadeh-nazarabadi y colaboradores, ya que la pareja formada por la mujer con grupo sanguíneo 0 y el varón con grupo sanguíneo A posee mayor tasa de aborto bioquímico que las restantes.

La literatura describe ampliamente la incompatibilidad materno-embriónica debida al Rh. Ésta ocurre cuando la madre presenta Rh negativo y el embrión es Rh positivo. Los anticuerpos maternos contra la proteína RhD del feto atraviesan la placenta, ocasionando la enfermedad hemolítica del recién nacido que conduce a la hiperbilirrubinemia en el feto y posterior daño cerebral recién nacido (Freedman et al. 2011).

Los mismos autores que concluyeron que las pacientes con grupo sanguíneo B eran las que presentaban mayores tasas de gestación, establecieron que las pacientes con tipo de sanguíneo 0 tenían más riesgo de aborto. Al igual que ocurre en nuestro trabajo, donde el 58,3 % de los abortos bioquímicos se producen en mujeres con grupo sanguíneo 0, frente a pacientes con grupo sanguíneo B y AB, las cuales presentan un 12, 7 % y un 0 %, respectivamente. Esto es debido a que presentan menores niveles en plasma de factores de coagulación, más concretamente de VWF y de FVIII, por lo que la implantación del embrión se vería comprometida (Mengoli et al. 2015). En este mismo estudio no evalúa la relación entre la tasa de aborto y el factor Rh por lo que no es posible comparar con los resultados obtenidos en nuestro proyecto.

Recientemente se ha publicado un artículo en el que se establece que las mujeres con ROD presentan una mayor tasa de aborto (Atasever et al. 2016). Aunque no se relaciona con el grupo sanguíneo ni con el factor Rh, podría ser una posible explicación

a esa mayor tasa de abortos en las mujeres Rh negativo de nuestro estudio. Puede ser que dentro del grupo Rh negativo haya una mayor proporción de mujeres con ROD y esto conduzca a un mayor porcentaje de abortos frente a las pacientes Rh positivo.

Es importante apuntar que en ninguno de los dos análisis estadísticos anteriormente discutidos se ha tenido en cuenta el grupo sanguíneo y factor Rh masculino, puesto que no era el objetivo de este proyecto. No obstante, sería importante incluirlos en futuros estudios para evaluar la tasa de gestación, ya que algunos artículos sostienen la influencia del tipo sanguíneo del varón en la consecución de embarazo y aborto (Khan et al. 2010; Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012; Abdollahi et al. 2013).

El factor Rh tampoco parece influir sobre la reserva ovárica de las mujeres receptoras de ovocitos. Todas las pacientes de este grupo poseían niveles de AMH inferiores a 0,5 ng/ml por lo que presentaban ROD. El trabajo refleja que no hay diferencias significativas en los niveles de AMH entre las pacientes Rh positivo y Rh negativo. La cantidad de AMH es algo superior en las pacientes Rh negativo que en las Rh positivo, 0,29 ng/ml frente a 0,26 ng/ml. Este resultado concuerda con el publicado por De Mouzon y colaboradores en 2012, en el que estudiaron la influencia del grupo sanguíneo y del factor Rh en la reserva ovárica. Realizaron la determinación de AMH en 1.016 pacientes sin encontrar diferencias entre las pacientes Rh positivo y las Rh negativo, ya que el porcentaje de mujeres con ROD era de un 26,9 % y 29,8 % respectivamente (De Mouzon et al. 2012). Este es el único artículo que se ha encontrado en la literatura que relaciona la reserva ovárica y el factor Rh.

En la población mundial, solo un 10 % de las personas presentan Rh negativo. En cambio, en nuestro proyecto este porcentaje era claramente superior en el grupo de pacientes receptoras de ovocitos con ROD. El porcentaje de mujeres Rh negativo en dicho grupo era de un 22,2 %, frente a un 77,8 % en el caso de las pacientes Rh positivo. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas, este fue el principal motivo por el que se analizó la influencia del factor Rh sobre la reserva ovárica, ya que el porcentaje de pacientes Rh negativo con ROD era un 12,2 % superior al de la población general. No obstante, no existen referencias bibliográficas que indiquen alguna relación entre el factor Rh negativo y la ROD.

Este estudio habría que ampliarlo ya que se manejaron pocos datos, debido a que no todas las pacientes tenían determinado el valor de AMH por su elevado precio.

Con respecto al grupo sanguíneo y la reserva ovárica existen varios artículos y la mayoría se contradicen entre sí. Así en 2011 Nejat y colaboradores realizaron un estudio a 544 pacientes menores de 45 años y evaluaron su reserva ovárica en función de los niveles de FSH. Los investigadores encontraron que las pacientes con grupo sanguíneo 0 tenían el doble de probabilidad de tener niveles de FSH mayores de 10 mUI/ml, es decir, ROD, que las pacientes con grupo sanguíneo A o AB. Este hecho puede ser explicado teniendo en cuenta el papel protector del antígeno A sobre la reserva ovárica. El enzima transferasa A, que origina el antígeno A mediante la adición de un residuo N-acetilgalactosamina al antígeno H, podría proteger la reserva ovárica actuando sobre las glicosilaciones de los receptores de FSH y LH que juegan un papel fundamental en el desarrollo y maduración folicular. En consecuencia, la falta de este enzima transferasa, como es el caso de las pacientes con grupo sanguíneo 0, podría ser la causa de la ROD. Además los genes que afectan a la reserva ovárica se han localizado próximos al locus AB0 en el cromosoma 9, por lo que pueden heredarse juntos, y sería otra posible explicación para esta relación (Nejat et al. 2011).

A diferencia de este artículo, en 2013 Timberlake y colaboradores estudiaron la relación entre el grupo sanguíneo y la reserva ovárica en 305 pacientes, también mediante la determinación de los niveles de FSH y estableciendo como ROD valores superiores a 10 mUI/ml. No encontraron diferencias ni en la reserva ovárica ni en el número de ovocitos recuperados por ciclo de estimulación en función del grupo sanguíneo. Por lo tanto los investigadores no consideraron el grupo sanguíneo como un factor de riesgo en la ROD (Timberlake et al. 2013). De forma similar otros grupos no encontraron relación alguna entre el grupo sanguíneo y la reserva ovárica, incluso aumentando el número muestral, 1.016 pacientes, y utilizando un marcador de reserva ovárica más sensible, la AMH (De Mouzon et al. 2012). Sengül y colaboradores concluyeron, tras analizar la reserva ovárica mediante la medida de FSH de 500 pacientes turcas, que el grupo sanguíneo no constituía ni un factor de riesgo ni un factor de protección sobre la reserva ovárica. Por lo tanto, el tipo de sangre no tiene valor predictivo para la evaluación de la reserva ovárica (Şengül et al. 2014). Spitzer y colaboradores tampoco encontraron ninguna influencia del grupo sanguíneo sobre la reserva ovárica tras analizar 309 ciclos en pacientes caucásicas (Spitzer et al. 2014).

Recientemente se ha publicado un estudio con un número de pacientes superior a los anteriores, 1.960, y mediante la medida de la FSH se analizó la reserva ovárica. En este caso tampoco se estableció ninguna relación. Sin embargo en las mujeres con una edad inferior a 38 años, el grupo sanguíneo 0 se asoció con una menor incidencia de ROD que el grupo sanguíneo A (Souter et al. 2016).

En el artículo publicado en 2014 por Lin y colaboradores se estudió de nuevo la posible relación entre el grupo sanguíneo y la reserva ovárica. En este caso se analiza una etnia específica, la población china, y una muestra muy elevada de pacientes 35.479. Los autores informan de una menor incidencia de ROD en mujeres con grupo sanguíneo 0 y un mayor riesgo en aquellas que poseen el antígeno B (grupo sanguíneo B o AB). No encontraron asociación entre el grupo sanguíneo A y la reserva ovárica. El antígeno B ha sido asociado a una mayor incidencia de cáncer de ovario. Por lo tanto, los investigadores sugieren que es posible que las glicotransferasas codificadas por el alelo B alteren las funciones normales biológicas de FSH y LH y como resultado conduzca a una ROD (Lin et al. 2014).

Las discrepancias encontradas podrían ser consecuencia de las diferencias entre las etnias, ya que las frecuencias de los grupos sanguíneos son distintas, del tamaño muestral, del diseño del estudio, de los marcadores de reserva ovárica analizados o incluso que se deba meramente a un sesgo estadístico. Además en la mayoría de los estudios faltan los marcadores más fiables de reserva ovárica, la AMH, ya que ésta solo es determinada por De Mouzon y colaboradores, y el RFA, ausente en todos los artículos discutidos. También sería necesario conocer el número de ovocitos obtenidos en cada uno de los grupos sanguíneos estudiados para poder establecer una verdadera relación. Adicionalmente sería de gran interés evaluar distintos factores que influyen claramente en la función ovárica, como el tabaquismo, la causa de la infertilidad, el tratamiento previo con quimioterapia o radioterapia, tipo de cirugía ovárica, la gravedad de las enfermedades ováricas (endometriosis, infecciones), o antecedentes genéticos, ya que podrían ser comparados entre los diferentes grupos sanguíneos o incluso excluidos antes de realizar el análisis de la posible asociación del grupo sanguíneo y la ROD.

El tipo de sangre y el factor Rh pueden estar o no relacionados con algunos aspectos de la fertilidad femenina. Sin embargo se requiere muchos más estudios para confirmar esta posible asociación y explicar los mecanismos que conducen a la misma.

Por lo tanto la evidencia disponible hasta la fecha no es suficiente para considerar el grupo sanguíneo como un factor de riesgo de ROD, tasa de gestación o tasa de aborto en la práctica clínica.

Por último, se intentó aportar un nuevo dato para el conocimiento de la infertilidad masculina, ya que actualmente constituye un 40 % de los casos (López 2010). Estadísticamente no se encontró ningún tipo de relación entre la calidad seminal y el grupo sanguíneo y factor Rh. En el caso de la influencia del grupo sanguíneo sobre la calidad seminal se obtuvo un p-valor de 0,06, justo en el límite para considerarse estadísticamente significativo (p-valor= 0,05). Debido a esto puede considerarse que existe una tendencia hacia que el grupo sanguíneo del varón influye de forma positiva sobre la normozoospermia, en concreto en los pacientes con grupo sanguíneo B y AB, en los cuales se observa una mejora en la calidad seminal. No obstante para confirmar esta posible relación se requiere aumentar el tamaño muestral para descartar que la tendencia sea debida al azar.

Al igual que ocurría con la fertilidad femenina y el tipo sanguíneo, existe poca literatura que relacione la esterilidad por factor masculino y el tipo sanguíneo. Concretamente sobre la relación del grupo sanguíneo y la calidad seminal no se ha encontrado nada publicado, pero si sobre la fertilidad masculina.

En 2010 Khan y colaboradores establecieron una relación directa entre el grupo sanguíneo 0 y la infertilidad masculina tras analizar 1.521 pacientes. Dentro de los varones que presentaban esterilidad, entendida como imposibilidad de conseguir gestación, el 35,5 % presentaban grupo sanguíneo 0 (Khan et al. 2010). Lo mismo obtuvieron Abdollahi y colaboradores en 2013, donde encontraron que la infertilidad masculina estaba influenciada por el grupo sanguíneo 0. Los investigadores asociaron este hecho a la posible presencia de antígenos (no pertenecientes al sistema AB0) en el plasma seminal que podrían conducir a la producción de anticuerpos antiespermáticos contra esos antígenos y por tanto infertilidad (Abdollahi et al. 2013).

Además, el grupo sanguíneo paterno puede ser un factor determinante para que se produzca un embarazo o por el contrario un aborto clínico debido a la incompatibilidad AB0. Existen artículos que demuestran que el espermatozoide posee antígenos de grupos sanguíneos y la presencia de sustancias grupo específicas en las

secreciones cervicales femeninas podrían impedir la fecundación al reaccionar contra ellas. Por lo tanto una carga elevada de anticuerpos maternos podría permitir la fecundación pero desembocaría en una pérdida fetal. El mecanismo mediante el cual se produce este hecho es desconocido, puede haber un número ilimitado de antígenos desconocidos en el plasma seminal que podrían interferir en la fecundación. Los anticuerpos maternos podrían neutralizar estos antígenos pero si la carga de éstos es elevada el embarazo no podría llevarse a término. Se ha asociado nuevamente el grupo sanguíneo 0 paterno con una mayor incidencia de aborto (Hassanzadeh-nazarabadi et al. 2012; Abdollahi et al. 2013).

Obviamente se requieren muchos más estudios para evaluar cual es la relación verdadera entre el tipo sanguíneo y la fertilidad masculina. No cabe duda que la calidad seminal se ve afectada por muchos factores, como el tabaquismo, enfermedades autoinmunes, tratamiento con quimioterápicos o radioterapia, la edad, entre otros (Ramalingam 2014; Arikawa et al. 2016). Las tasas de éxito en ciclos de FIV/ICSI también son muy dependientes de la calidad del semen (Arikawa et al. 2016). Por lo tanto sería interesante llegar a determinar si el grupo sanguíneo junto con el factor Rh influye en la normozospermia, ya que podría mejorar los resultados en clínica.

A la vista de los resultados y tras el examen realizado a la literatura actual, se debe apuntar que se requieren más estudios para poder determinar el efecto del grupo sanguíneo sobre la fertilidad. Además los futuros trabajos que se realicen deben tener en cuenta la influencia de la etnia, ya que las frecuencias de grupos sanguíneos varían ligeramente de un área geográfica a otra.

Finalmente el descubrimiento de la posible influencia del tipo sanguíneo sobre la infertilidad podría mejorar significativamente las tasas de éxito en la reproducción humana asistida.

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. No se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el grupo sanguíneo y factor Rh con la tasa de embarazo y aborto bioquímico en las pacientes sometidas a estimulación ovárica con sus propios ovocitos.
2. El factor Rh no está relacionado con la baja reserva ovárica en las pacientes receptoras de ovocitos.
3. El grupo sanguíneo junto con el factor Rh de los varones estudiados no está relacionado con la calidad seminal. Sin embargo existe una tendencia hacia que los grupos sanguíneos B y AB influyen positivamente sobre la calidad seminal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, E. et al., 2013. The effect of parental ABO blood group on fetal surveillance. *Iranian Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 3(4), pp.154–158.
- Abellán, F., 2010. Situación Jurídica de la Especialidad: Regulación y Normativa Nacional y Autonómica. In *Libro Blanco Sociosanitario. “La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas.”* pp. 85–96.
- Alamá, P. & Remohí, J., 2010. Los estudios y tratamientos de la infertilidad. In *Libro Blanco Sociosanitario. “La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas.”* pp. 43–52.
- Arbeláez, C., 2009. Sistema de grupo sanguíneo ABO. *Medicina & Laboratorio*, 15(46), pp.329–348.
- Arikawa, M. et al., 2016. Effect of semen quality on human sex ratio in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection : an analysis of 27 , 158 singleton infants born after fresh single-embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 105(4), pp.897–904.
- Atasever, M. et al., 2016. Diminished ovarian reserve : is it a neglected cause in the assessment of recurrent miscarriage? A cohort study. *Fertility and Sterility*, 105(5), pp.1236–1240.
- Broekmans, F.J., Soules, M.R. & Fauser, B.C., 2009. Ovarian Aging : Mechanisms and Clinical. *Endocrine Society Journals*, 30(5), pp.465–493.
- Delaney, M., 2013. Bombay blood group. *Brenner’s Encycplopedia of Genetics*, 2(3), pp.357–358.
- Engmann, L., Benadiva, C. & Humaidan, P., 2016. GnRH agonist trigger for the induction of oocyte maturation in GnRH antagonist IVF cycles : a SWOT analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 32(3), pp.274–285.
- Fleming, R. et al., 2013. Can anti- Müllerian hormone concentrations be used to determine gonadotrophin dose and treatment protocol for ovarian stimulation? *Reproductive BioMedicine Online*, 26(5), pp.431–439.
- Freedman, D. et al., 2011. Maternal – fetal blood incompatibility and neuromorphologic anomalies in schizophrenia: Preliminary findings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(6), pp.1525–1529.
- Galliano, D., 2016. Ovarian stimulation, insemination, and contraception. *Fertility and Sterility*, 105(3), p.607.
- Hassanzadeh-nazarabadi, M. et al., 2012. The Incidence of Spontaneous Abortion in Mothers with Blood Group O Compared with other Blood Types. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 1(2), pp.99–104.
- Hoorn, M.L.P. Van Der et al., 2010. Clinical and immunologic aspects of egg donation pregnancies : a systematic review. *Human Reproduction*, 16(6), pp.704–712.

- Khan, M. et al., 2010. Relationship between blood groups and male infertility. *Journal of Ayub Mediacal College Abbottabad*, 22(1), pp.154–156.
- Li, J. et al., 2015. A meta-analysis of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 131(3), pp.240–245.
- Lin, S. et al., 2014. Effect of ABO blood type on ovarian reserve in Chinese women. *Fertility and Sterility*, 102(6), pp.1729–1732.
- López, A., 2012. Conocimientos generales: Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora. Fisiología de la pubertad y del climaterio. *Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de Albacete*.
- López, V., 2010. La fertilidad en España. Análisis de la evolución de los indicadores demográficos recogidos en España. In *Libro Blanco Sociosanitario. “La infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas.”* pp. 53–56.
- Lukaszuk, K. et al., 2014. Anti-Müllerian hormone (AMH) is a strong predictor of live birth in women undergoing assisted reproductive technology. *Phytochemistry Letters*, 14(3), pp.176–181.
- Manceñido, M., 2015. *Registro de la Federación Española de Donantes: Estadísticas por grupo sanguíneo*,
- Marca, A. La et al., 2010. Anti- Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction*, 16(2), pp.113–130.
- Mengoli, C. et al., 2015. ABO blood group and fertility: a single-centre study. *Blood Transfus*, 13(3), pp.521–523.
- De Mouzon, J. et al., 2012. Blood type and ovarian reserve. *Human Reproduction*, 27(3), pp.1544–1545.
- Nejat, E.J. et al., 2011. Implications of blood type for ovarian reserve. *Human Reproduction*, 26(9), pp.2513–2517.
- Nejat, E.J. et al., 2012. Timing the window of implantation by nucleolar channel system prevalence matches the accuracy of the endometrial receptivity array. *Fertility and Sterility*, 102(5), pp.1477–1481.
- Neri, Q. et al., 2014. Cell Calcium Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection. *Cell Calcium*, 55(1), pp.24–37.
- Noiphung, J. et al., 2015. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. *Biosensors and Bioelectronic*, 67(3), pp.485–489.
- O’Neill, D., 2012. Distribution of Blood Types. *Journal of Hepatology*, 3(123), pp.45–48.
- OMS, 2010. *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de*

la interacción entre el semen y el moco cervical,

- Peluso, C. et al., 2014. AMH : An ovarian reserve biomarker in assisted reproduction. *Clinica Chimica Acta*, 437(3), pp.175–182.
- Pereira, N. et al., 2015. Is ABO blood type associated with ovarian stimulation response in patients with diminished ovarian reserve ? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(6), pp.985–990.
- Pu, D. et al., 2014. Gene variation and premature ovarian failure : a meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 182(3), pp.226–237.
- Ramalingam, M., 2014. Male fertility and infertility. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 24(11), pp.326–332.
- Revel, A., 2012. Defective endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 97(5), pp.1028–1032.
- Scott, E., Alper, M.M. & Walsh, A.P.H., 2009. Ovarian reserve screening in infertility : Practical applications and theoretical directions for research. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 146(3), pp.30–36.
- SEF, 2013. *Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV/ICSI).*
- Şengül, Ö. et al., 2014. Only Female Age , and Not Blood Type , Is Associated with Ovarian Reserve. *International Journal of Fertility and Sterility*, 8(2), pp.143–146.
- Simon, A. & Laufer, N., 2012. Repeated implantation failure : clinical approach. *Fertility and Sterility*, 97(5), pp.1039–1043.
- Souter, I., Lee, A. & Murtadi, G., 2016. Is there an association between ABO blood type and ovarian reserve in women undergoing intrauterine insemination (IUI)±ovulation induction (OI)? *Fertility and Sterility*, 2(4), pp.38–39.
- Spitzer, D. et al., 2014. Implications of Blood Type for Ovarian Reserve and Infertility – Impact on Oocyte Yield in IVF Patients. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 74(10), pp.928–932.
- Tal, R. et al., 2014. Characterization of women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 211(1), pp.59 –67.
- Tan, S. et al., 2015. Decreased endometrial vascularity and receptivity in unexplained recurrent miscarriage patients during midluteal and early pregnancy phases. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 54(5), pp.522–526.
- Timberlake, K.S. et al., 2013. Association of blood type and patient characteristics with ovarian reserve. *Fertility and Sterility*, 100(6), pp.1735–1739.
- Torabizade, J. et al., 2016. Distribution of ABO blood groups and rhesus factor in a Large Scale Study of different cities and ethnicities in Khuzestan province , Iran.

Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 17(1), pp.105–109.

Weissman, A. et al., 2014. Characterizing the practice of oocyte donation: a web-based international survey. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(4), pp.443–450.

Yilmaz, N. et al., 2013. Dehydroepiandrosterone supplementation improves predictive markers for diminished ovarian reserve : serum AMH , inhibin B and antral follicle count. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169(2), pp.257–260.

Zegers-Hochschild, F. et al., 2009. International Committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, 92(5), pp.1520–1524.