



Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

ESTACIONALIDAD Y FECUNDACIÓN IN VITRO

Trabajo Fin de Máster: Laura García Alonso.

Tutor: Dr. Plácido Llana Coto.

Julio 2016

AGRADECIMIENTOS

Expresar mi agradecimiento al Dr. Plácido Llaneza por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo, su paciencia, enseñanza y orientación en la realización de este proyecto.

Agradecer a todo el personal de la Unidad FIV-HUCA por su acogida en el servicio. Médicos, enfermeras, auxiliar de enfermería y biólogas que nos abrieron las puertas de la unidad como a unos compañeros más, dedicándonos su tiempo y enseñándonos el funcionamiento de la unidad. Una mención especial a la Dra. Lourdes Sánchez, por su interés y disposición en todo momento, así como su colaboración en la recogida de datos para el presente estudio. De manera más cercana, agradecer el trato recibido por el servicio de enfermería y felicitarlas por la labor que desarrollan en este campo, tanto en el ámbito clínico como en educación para la salud y apoyo psicológico a las parejas.

A mis compañeros de curso con los que compartí muy buenos momentos en un año de mucha exigencia. Al Dr. José Manuel López por sacar tiempo de donde no tenía para ayudarme en estadística y cualquier duda que me surgiera.

Con muchísimo cariño, a mis padres, responsables de mi educación y formación, siempre presentes y a Javi por apoyarme en todas mis decisiones.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. DEFINICIÓN.....	5
1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	5
1.3. CAUSAS DE INFERTILIDAD.....	6
1.4. HISTORIA DE LA REPRODUCCIÓN.....	8
1.5. INFERTILIDAD Y FACTORES AMBIENTALES.....	10
2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS.....	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1. TIPO DE ESTUDIO.....	12
3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.....	12
3.3. METODOLOGÍA DE ESTUDIO.....	12
3.3.1. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO.....	12
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	15
3.4.1. VARIABLES A ESTUDIO.....	15
3.4.2. ANÁLISIS DE DATOS	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIÓN.....	28
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
8. ANEXOS.....	32

LISTADO DE ACRÓNIMOS.

- **ASEBIR:** Asociación Española para el estudio de la biología reproductiva.
- **B-hCG:** Fracción beta de Hormona Gonadotropina Coriónica Humana.
- **BEN:** Benceno.
- **CO₂:** Dióxido de Carbono.
- **DGP:** Diagnóstico Genético preimplantacional.
- **EIP:** Enfermedad Inflamatoria Pélvica.
- **ESCA:** Esterilidad sin causa aparente.
- **FISH:** Hibridación in situ fluorescente.
- **FIV:** Fecundación in Vitro.
- **HCG:** Hormona Gonadotropina Coriónica Humana.
- **HUCA:** Hospital Universitario Central de Asturias.
- **ICMART:** Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology
- **ICSI:** Inyección Intracitoplásmica del espermatozoide.
- **NO:** Óxido de Nitrógeno.
- **NO₂:** Dióxido de Nitrógeno.
- **O₃:** Ozono.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **OR:** Odd Ratio.
- **PCR:** Reacción de cadena de polimerasa.
- **PM:** Partículas en suspensión.
- **REM:** Recuento de Espermatozoides móviles.
- **SO₂:** Dióxido de azufre.
- **SOPQ:** Síndrome de ovario Poliquísticos.
- **TOL:** Tolueno.
- **TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICION DE INFERTILIDAD/ESTERILIDAD

Se entiende por esterilidad la incapacidad, tanto por parte del varón como de la mujer, para concebir (*Fathalla MF. et al, 1994*). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) define **infertilidad** o **esterilidad** como una enfermedad del sistema reproductivo, caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas.

Actualmente, la infertilidad es reconocida como una enfermedad del sistema reproductor afectando entre un 10-15% de las parejas en edad fértil, cuya tendencia va en aumento (*Zegers-Hochschild et al., 2009*). Se estima que afecta a una de cada seis parejas en edad fértil (*Marqueta et al., 2010*).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DE INFERTILIDAD

El estudio de los problemas de infertilidad desde el punto de vista epidemiológico es complejo, por la heterogeneidad de los conceptos usados para definirla y por la falta de idoneidad en las muestras poblacionales usadas (*López Villaverde V., 2014*).

En España, se estima que el 15% de las parejas en edad reproductiva tienen algún problema de esterilidad (*Coloreu B., 2011*). El acceso tardío de las mujeres a su primera maternidad, junto con la baja calidad de los espermatozoides masculinos, son algunos de los factores que han llevado a que la reproducción asistida tenga cada vez más peso en la salud de los españoles. Al año se registran en España, más de 80.5000 ciclos de reproducción asistida, con cerca del 48% dedicados a la fecundación in vitro. (*Matorras et al., 2011*).

El 30% de los casos registrados de infertilidad se atribuye a factor masculino, un 30 % a factor femenino, el 25% es mixto. A pesar de los últimos avances obtenidos en el diagnóstico y seguimiento de la infertilidad, entre 10 y 20 % de las parejas infértiles resulta imposible identificarse la causa, y se denominan estos casos como infertilidad de causa idiopática o inexplicable (ESCA) (*Boivin J. et al., 2007*).

1.3. CAUSAS DE INFERTILIDAD

La infertilidad puede ser causada por muchos factores físicos y emocionales. Puede deberse a problemas en el hombre, la mujer o en ambos (Lobo RA., et al., 2012).

Uno de los principales problemas en salud reproductiva se debe al papel que juega la infertilidad masculina, ya que representa el 30% de las causas de infertilidad en España, tanto como causa única de la disfunción reproductiva, como asociado a otros factores de infertilidad femenina. Otro de los problemas frecuentes es la falta de información por gran parte de las mujeres, ya que son muchas las que no consideran la edad como un factor determinante (Tinneberg HR., 2013).

El retraso de la edad de la maternidad en la mujer ocurrido en los últimos años ha conllevado una demanda creciente de consejo y tratamiento reproductivo. En las pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida (TRA), el éxito de las mismas se relaciona entre otros factores con la edad de la paciente. Se sabe que las esterilidades sin causa aparente aumentan conforme lo hace la edad de la mujer, > 35 años (Maheshwari A., 2008). No obstante, la relación entre la edad y la disminución en la capacidad reproductiva es altamente variable, aunque a partir de los 40 años el descenso folicular es un hecho (Figura 1).

Una causa atribuible a esta asociación es la disminución de la reserva ovárica. El término “reserva folicular” se usa para definir la cantidad y calidad de los folículos presentes en los ovarios en un determinado momento (Domingues T., 2010).

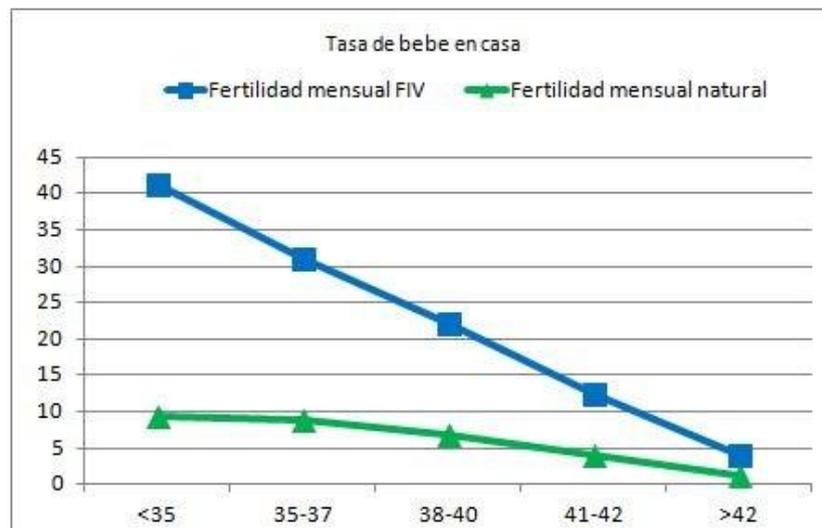


Figura.1. Fertilidad de la mujer/edad de la mujer (www.dhfertilidad.com ,acceso mayo 2016)

1.3.1. INFERTILIDAD FEMENINA

La infertilidad femenina puede ocurrir cuando:

- Un óvulo fecundado o el embrión no sobrevive una vez que se fija al revestimiento de la matriz (útero).
- El óvulo fecundado no se fija al revestimiento del útero.
- Los óvulos no pueden moverse desde el ovario hasta la matriz.
- Los ovarios tienen problemas para producir óvulos.

La infertilidad femenina puede ser causada por:

- Trastornos autoinmunes, como el síndrome antifosfolípido.
- Defectos congénitos que afectan el tracto reproductor.
- Cáncer o tumor.
- Trastornos de la coagulación.
- Diabetes.
- Consumo excesivo de alcohol y sustancias tóxicas.
- Ejercicio excesivo.
- Trastornos alimentarios o desnutrición.
- Neoplasias (como miomas o pólipos) en el útero y el cuello uterino.
- Uso de ciertos medicamentos, como por ejemplo fármacos quimioterapéuticos.
- Desequilibrios hormonales.
- Obesidad.
- Edad avanzada.
- Quistes ováricos y síndrome de ovario poliquístico (SOPQ).
- Infección pélvica o enfermedad inflamatoria pélvica (EIP).
- Cicatrización a raíz de infección de transmisión sexual, cirugía abdominal previa o endometriosis.
- Tabaquismo.
- Cirugía para prevenir el embarazo (ligadura de trompas)
- Enfermedad tiroidea.

1.3.2. INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad masculina puede deberse a:

- Una disminución de la cantidad de espermatozoides.
- Un bloqueo que impide que los espermatozoides sean liberados.
- Defectos en los espermatozoides.

La infertilidad masculina puede ser causada por:

- Defectos congénitos.
- Tratamientos para el cáncer, incluso quimioterapia y radiación.
- Exposición a mucho calor durante períodos prolongados.
- Consumo compulsivo de alcohol y otras sustancias tóxicas.
- Desequilibrio hormona.
- Impotencia.
- Infección.
- Consumo de ciertos fármacos (cimetidina, espironolactona y nitrofurantoina).
- Obesidad.
- Edad avanzada.
- Eyaculación retrógrada.
- Cicatrización a raíz de enfermedades de transmisión sexual, lesión o cirugía.
- Tabaquismo.
- Toxinas en el medioambiente.
- Vasectomía.

1.4. HISTORIA DE LA TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

La infertilidad ha sido siempre una preocupación constante. Los problemas planteados a nivel médico, social, ético, político y religioso son testigos de este énfasis (*Morice P., et al, 1995*). La aparición de las técnicas de reproducción asistida en la década de los 70 supuso la apertura de nuevas posibilidades de solución del problema de la esterilidad para un amplio número de parejas aquejadas por esta patología.

En 1978 nace la primera niña en el mundo tras fecundación in vitro e implantación embrionaria. El profesor Robert Edwards, recibiría en 2010 el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por estos hallazgos. A principios de los 80, las tasas de embarazo aumentaron con el inicio de la estimulación ovárica controlada (*Hartshorne, G.et al, 2008*).

El primer nacimiento a nivel mundial tras criopreservación y descongelación de embriones se lo debemos al equipo australiano dirigido por Trounson y Mohr en el año 1983. Ese mismo año, este grupo publicó el primer nacimiento a partir de donación de ovocitos (*Trounson.A., 1983*).

En 1992 tiene lugar en Bélgica una verdadera revolución en el campo de la medicina reproductiva con la introducción de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (*Palermo et.al., 1992*).

A partir de 1990 se aunaron dos ramas científicas por un lado las técnicas de reproducción asistida y por otro la biología molecular, para dar lugar a una excitante y pionera área biomédica, el diagnóstico genético Preimplantacional (DGP). El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico que, apoyándose en las nuevas técnicas de reproducción asistida, hace posible el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero y, por tanto, antes de que se haya producido la implantación.

El DGP se ha desarrollado gracias a los avances en las técnicas de reproducción asistida y la aplicación de las técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el estudio de anomalías génicas y cromosómicas en una única célula (blastómero). De este modo, en un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) se obtienen varios embriones, en los cuales se analizan 1 o 2 blastómeros obtenidos mediante biopsia, lo que permite la transferencia de los embriones caracterizados como sanos o cromosómicamente normales (*Rubio C. et al., 2004*). La idea de un análisis genético preimplantacional no es reciente. Ya en 1968, Edwards y Gardner pudieron determinar el sexo en células del trofoectodermo de blastocistos de conejo, basándose en la observación de la cromatina sexual (*Edwards R. et al., 1968*). Sin embargo, los primeros intentos de DGP en embriones humanos tuvieron que esperar al desarrollo de la técnica de PCR a principios de los años ochenta. Los primeros casos de embarazos fueron publicados en 1990 en un trabajo de Allan Handyside, cuando su equipo realizó la determinación del sexo del embrión en familias conocidas por ser portadoras de enfermedades ligadas al sexo (*Handyside A., 1990*). La práctica del DGP ha evolucionado significativamente en los 15 años transcurridos desde los informes iniciales. Durante este tiempo se han desarrollado muchos procedimientos clínicos y de laboratorio para mejorar la exactitud y la fiabilidad del DGP y para ampliar el número de alteraciones estudiadas.

1.5. INFERTILIDAD Y FACTORES MEDIOAMBIENTALES.

El crecimiento económico y la globalización han originado evidentes beneficios pero al mismo tiempo han provocado la aparición de nuevos riesgos. Se ha estimado que en los países industrializados un 20 % de la incidencia total de enfermedades puede atribuirse a factores medioambientales (*Smith KR. Et al., 1999*). La importancia del estilo de vida y cómo puede afectar negativamente a la fertilidad es cada vez más discutido.

Los **agentes tóxicos** pueden presentarse como productos químicos, radiación o materiales físicos, y pueden afectar al cuerpo y sus sistemas. Pueden provocar desde una irritación hasta la muerte de las células, los tejidos o incluso del organismo. Algunos tóxicos del aire pueden causar disfunciones en el aparato reproductivo, disminuyendo la fertilidad, reduciendo las posibilidades de supervivencia del feto o embrión o llevando a la presentación de malformaciones. También pueden generar variaciones en el funcionamiento del sistema inmunológico que pueden afectar la implantación y el desarrollo del embrión. Los contaminantes más estudiados son los incluidos en las redes de vigilancia y control de la calidad del aire. Entre ellos se encuentran las partículas en suspensión, el **dióxido de azufre (SO₂)** y el **monóxido de carbono (CO)**. Éstos provienen principalmente de fuentes de emisión, como los vehículos, las calefacciones de edificios y algunos procesos industriales. Entre las partículas en suspensión destacan las que tienen diámetro aerodinámico < 10 µ (partículas torácicas o **PM₁₀**) y las finas < 2,5 µ (partículas respirables **PM_{2,5}**). También se ha estudiado los posibles efectos del **ozono (O₃)**, un contaminante secundario que se forma por reacciones fotoquímicas a partir de la acción de las radiaciones solares sobre el **NO₂**. Los solventes orgánicos, que se utilizan como plastificantes, productos de limpieza o en combinación con otros agentes para disolver materias primas (**benceno, tolueno, xileno, estireno**), son también perjudiciales para la salud reproductiva. Su exposición en los hombres de mujeres sometidas a TRA, produce una disminución de la implantación embrionaria en éstas (*Tielemans E. et al., 2000*). Exposición a **metales pesados**, tales como plomo, mercurio, boro, aluminio, cadmio, arsénico, antimonio, cobalto, y litio, han sido considerados tóxicos para la reproducción (*Chalupka S. et al 2010*). Los **ftalatos** (plastificantes que dan flexibilidad y durabilidad a productos de PVC), han sido relacionados con reducción en la calidad seminal y fragmentación de ADN espermático (*Duty SM. et al., 2003*), así como con la endometriosis en la mujer (*Cobellis L. et al., 2010*).

Los efectos adversos de **la radiación**, tanto para el hombre como para la mujer, han sido suficientemente demostrados (*Kumar S., 2004*). Tanto la radiación en forma de rayos X o gamma puede ser devastadora para las células sensibles del cuerpo humano, incluidas las células germinales y de Leydig, en función de la edad y la dosis recibida.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Se pretende probar la hipótesis de que el éxito de la gestación está asociado al mes y/o la estación del año que tiene lugar la técnica de FIV/ICSI.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de este estudio es presentar los resultados de FIV/ICSI realizados en HUCA durante el año 2015, para evaluar el número de gestaciones evolutivas en las cuatro estaciones del año en parejas asturianas que acuden a técnicas de reproducción asistida en la sanidad pública, con objeto de determinar si el éxito de la gestación está asociado al mes-estación en que se realiza FIV.

2.2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Como objetivos secundarios se analizarán diferentes parámetros del programa FIV/ICSI según la época del año 2015.

- Estudiar si existe una correlación estadística entre gestación evolutiva y radiación solar/temperatura.
- Estudiar si existe una correlación estadística entre gestación evolutiva y contaminación atmosférica.
- Estudiar si existe una correlación estadística entre calidad embrionaria y radiación solar/temperatura.
- Estudiar si existe una correlación estadística entre calidad embrionaria y contaminación atmosférica.

3. METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE ESTUDIO.

El proyecto consiste en un estudio retrospectivo observacional.

3.2. LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), área sanitaria IV del Principado de Asturias y zona de referencia de tratamiento de la Comunidad.

3.3. POBLACIÓN A ESTUDIO

La población a estudio constó de las parejas a tratamiento de fertilidad de la unidad FIV-HUCA que consiguieron gestación mediante técnicas FIV/ICSI. Todas ellas cumplían el protocolo de inclusión para tratamiento en la unidad FIV-HUCA. Todas las parejas firmaron el consentimiento informado estándar del HUCA para la realización FIV/ICSI que coincide con el de la Sociedad Española de Fertilidad.

3.4. METODOLOGÍA DE ESTUDIO

El periodo de recogida de datos comprende de enero a diciembre del 2015. Los resultados se agruparon trimestralmente en las cuatro estaciones del año: primavera, verano, otoño, invierno. La comparación de datos se realizó mediante test de Pearson y t-test para comparación de medias de valores entre estaciones.

PROTOCOLO DE TRATAMIENTO:

Todas las parejas sometidas al tratamiento contaban con un estudio de esterilidad básico previo: perfil hormonal, histerosalpingografía, cariotipo y serología. Anamnesis e historia clínica para detección de enfermedades concomitantes (diabetes, hipertensión arterial, alteraciones tiroideas, etc.), historial médico familiar sobre patologías y enfermedades hereditarias.

El protocolo de tratamiento de estimulación ovárica ha sido individual para cada paciente, según criterio médico, en función de la edad de la mujer, diagnóstico de

infertilidad, historial reproductivo, respuesta a medicación en ciclos anteriores de estimulación ovárica si los hubo y otras condiciones médicas que podrían interferir a la hora de recibir el tratamiento.

El **ciclo de estimulación** se inicia los ovarios en reposo, es común el uso de anticonceptivos orales para el control de la menstruación el mes antes de iniciar el tratamiento. El seguimiento del ciclo de estimulación ovárica se realizó mediante control ecográfico trasvaginal y control analítico. Considerando respuesta normal un valor de estradiol de 100-200 pg. por folículo maduro, un mínimo de 4 folículos con diámetro entre 18-20mm y un grosor endometrial de 9-12 mm de grosor con patrón de triple línea.

La **punción folicular** se realiza alrededor del día 13-14 del ciclo de estimulación ovárica. 36 horas antes de la punción, la mujer debe administrarse hCG (hormona gonadotropina coriónica) mediante inyección subcutánea en zona adiposa abdominal con pluma precargada. La administración de hCG es fundamental para desencadenar la ovulación. La punción se realiza en quirófano, bajo sedación de la paciente, mediante punción-aspiración trasvaginal ecodirigida, con aguja estéril. Inmediatamente, el líquido folicular aspirado se lleva al laboratorio en tubos de Falcon precalentados previamente para no interferir en la curva natural de temperatura.

En el laboratorio, se realiza la **recuperación de ovocitos** del líquido folicular bajo campana de flujo laminar con superficie calefactada. El líquido folicular se examina bajo lupa binocular para recuperar los ovocitos y pasarlos a placa con medio de cultivo para gametos, se mantienen en incubadora a 37°C y atmósfera 6% CO₂, 5% O₂ hasta su posterior fecundación.

La valoración seminal se realiza siguiendo criterios de referencia de la OMS 2010. El varón aportará la muestra de semen la misma mañana de la punción, en el mismo laboratorio de embriología de la unidad, siguiendo el protocolo de recogida de muestra de la unidad. La **capacitación espermática**, proceso mediante el cual se obtienen los espermatozoides más móviles, puede ser mediante gradiente de densidad o swim-up. En caso de FIV/ICSI la técnica de elección de FIV-HUCA es swim-up.

La **fecundación de ovocitos** se lleva a cabo 4- 6 horas después de la punción. Puede realizarse mediante FIV clásica o ICSI, dependiendo fundamentalmente del número de ovocitos recuperados y la calidad de la muestra seminal obtenida. En este estudio, la mayoría de los casos de fecundación se realizaron por ICSI, puesto que es la técnica

elegida mayoritariamente en el laboratorio FIV- HUCA, debido a que tiene menor fallo de fertilización que FIV clásica.

Los ovocitos fecundados se conservan en placas de fecundación en el incubador 17-20h. Cada placa se identifica con nombre de la paciente y número de ovocitos fertilizados. Transcurridas 17-20h desde la fecundación, se valora el **proceso de fertilización**, manteniendo en medio de cultivo aquellos cigotos fertilizados adecuadamente: 2pronucleos y 2corpúsculos polares.

El control de las condiciones de temperatura, luz y PH son fundamentales para un buen desarrollo embrionario.

La valoración del **desarrollo y calidad embrionaria** se realiza en día 2 y 3 de desarrollo, según criterios de clasificación embrionaria ASEBIR (Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva) en cuatro categorías (A, B, C, D) considerando los embriones tipo A los que más probabilidad tienen de implantarse con éxito y los D los que ofrecen peores garantías (*Figuras 2,3*).

Categoría	Evolución D+2 a D+3	% fragmentación	Simetría	Vacuolización	Multinucleación
A	4 células a 7-8 células	Menos del 10%	Todas iguales o semejantes	Ausencia	Ausencia
B	Incremento de 3-4 células (cualquier combinación)	Hasta el 25%	Todas iguales o semejantes	Ausencia	Ausencia
C	Incremento de 1-3 células (cualquier combinación)	Hasta el 35%	Desiguales	Ausencia o pocas	Ausencia
D	Incremento de una sola célula	Más del 35%	Desiguales	Abundantes	Presencia

Figura 2. Clasificación Embrionaria D+2, D+3 Cuadernos de ASEBIR, 2008.

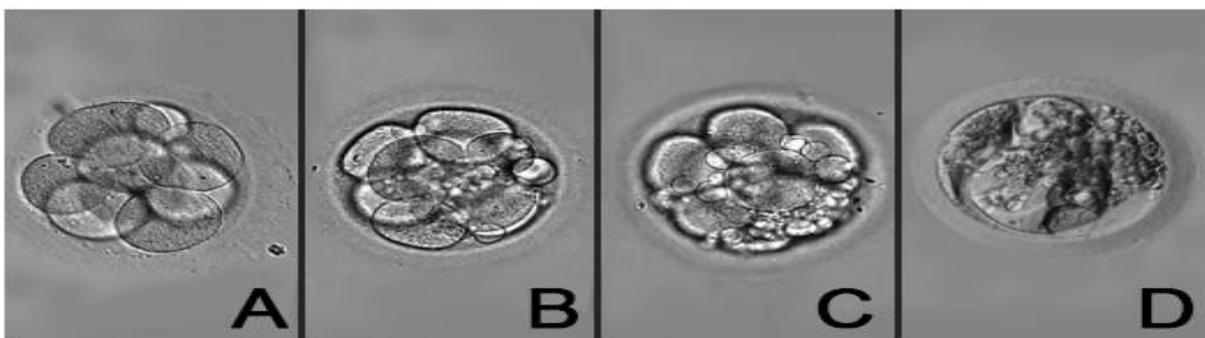


Figura 3. Clasificación Embrionaria D+2, D+3 Cuadernos de ASEBIR, 2008

Los medios de cultivo utilizados en todos los casos son medios comerciales de la casa VITROLIFE®, siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial para cultivo de gametos y embriones.

La **trasferencia embrionaria** tiene lugar en día +2, día +3 de desarrollo embrionario. Se realiza en quirófano, mediante transferencia intrauterina guiada por ultrasonografía abdominal en el quirófano de la unidad. La paciente acude con la vejiga llena para corregir la posición anatómica del útero, no requiere anestesia al tratarse de una técnica indolora.

La transferencia máxima de embriones, de acuerdo con la Ley 14/2006, de 26 mayo, sobre técnicas de Reproducción Humana Asistida es de tres embriones. En la mayoría de los casos se transfirieron dos embriones, previo acuerdo con la pareja.

Tras la transferencia, se mantiene aporte de progesterona para **soporte de fase lútea**.

La **valoración de la gestación** se realiza 15 días pos-trasferencia, si no ha venido la menstruación. Mediante test-embarazo se determina en orina β -hCG (subunidad β de hormona gonadotropina coriónica), considerando embarazo bioquímico si el resultado es positivo. El embarazo evolutivo se confirmara mediante control ecográfico, observando la presencia de saco embrionario y latido fetal.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

VARIABLES A ESTUDIO:

- a) Estaciones del año: primavera, verano, otoño, invierno.
- b) Calidad ovocitaria
- c) Gestación Evolutiva
- d) Nivel de radiación solar.
- e) Temperatura ambiental.
- f) Nivel NO₂ (Dióxido de Nitrógeno) atmosférico.
- g) Nivel O₃ (Ozono) atmosférico.
- h) Nivel SO₂ (Dióxido de azufre) atmosférico.
- i) Nivel PM₁₀ (Partículas en suspensión) atmosférico.
- j) Nivel BEN (Benzeno) atmosférico.
- k) Nivel TOL (Tolueno) atmosférico.
- l) Nivel MXIL (Xileno) atmosférico.

Las fuentes de los datos han sido las siguientes:

- Registro de datos de Trasferencias en fresco cedidos por Unidad de Reproducción Asistida Hospital Universitario Asturias (Dra. Lourdes Sánchez: Número de transferencias totales, número de gestación evolutiva).
- Registro de datos clínicos de pacientes a estudio cedidos por Unidad de Reproducción Asistida Hospital Universitario de Asturias (Servicio de Enfermería, Unidad FIV-HUCA: edad de las pacientes del estudio, causa de esterilidad, calidad embrionaria).
- Red de emisión de contaminantes del Principado de Asturias durante el año 2015 (contaminantes atmosféricos: NO₂, Co, PM₁₀, O₃, BEN, TOL, MXIL).
- Instituto meteorológico del Principado de Asturias (Temperatura/Radiación).

ANÁLISIS DE DATOS:

El análisis estadístico para la evaluación de resultados se realizó con el programa IBM SPSS Statics v23.0.0. y la Statistical Toolbox de MATLAB. Se utilizó el test de correlación de Pearson para la obtención de correlaciones significativas y el t-test para comparación de medias de valores entre estaciones.

4. RESULTADOS

Para desarrollar este trabajo se han analizado los resultados de 223 transferencias en fresco realizadas entre enero –diciembre del 2015. De las 223 transferencias realizadas en fresco se seleccionaron 73 de ellas, las cuales obtuvieron gestación por FIV/ICSI (Figura 1, 2).

Entre los distintos tipos de infertilidad que presentaban las parejas predominaba el factor masculino, seguido de baja reserva ovárica, factor tubárico, endometriosis y esterilidad de origen desconocido. El rango de edad de las mujeres oscilaba entre 24 y 39 años, siendo la media de edad 34 años. En la mayoría de los casos, la transferencia fue de dos embriones.

Como se muestra en la figura 1 y 2, aunque el número de transferencias varía según el mes estudiado, el porcentaje de gestaciones evolutivas no mostraba diferencias significativas a lo largo de las 4 estaciones del año.



Figura 1. Representación del número de transferencias totales realizadas y número de gestación evolutiva mensual en el 2015.

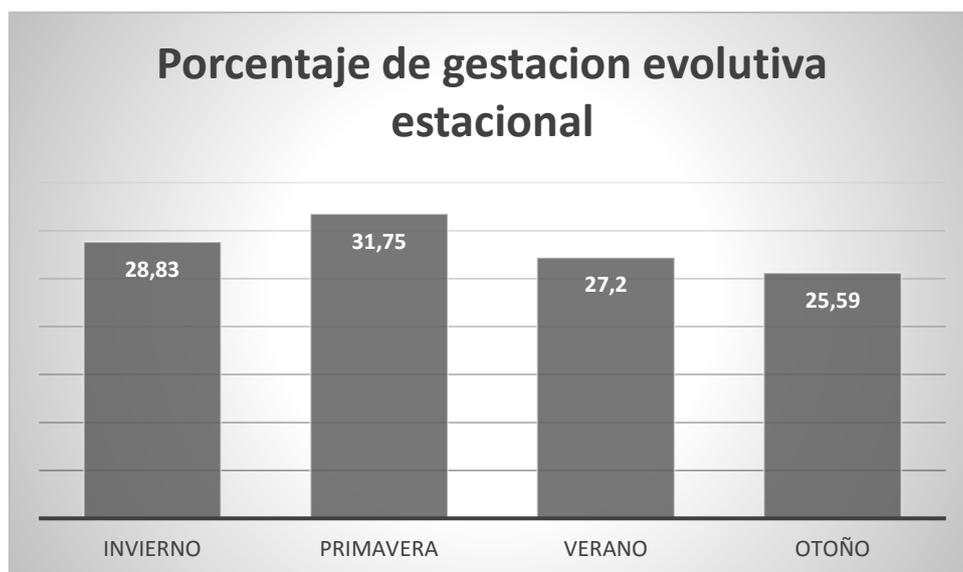


Figura 2. Porcentaje (%) de gestación evolutiva estacional 2015

Los valores de los distintos contaminantes atmosféricos estudiados en el área de Oviedo EN LAS 4 ESTACIONES se muestran en la figura 3. Observándose una mayor concentración de NO, NO2 en invierno y otoño, mientras el O3 presenta mayor concentración en las estaciones inversas: primavera y verano.

Los valores numéricos se encuentran en el anexo del trabajo.

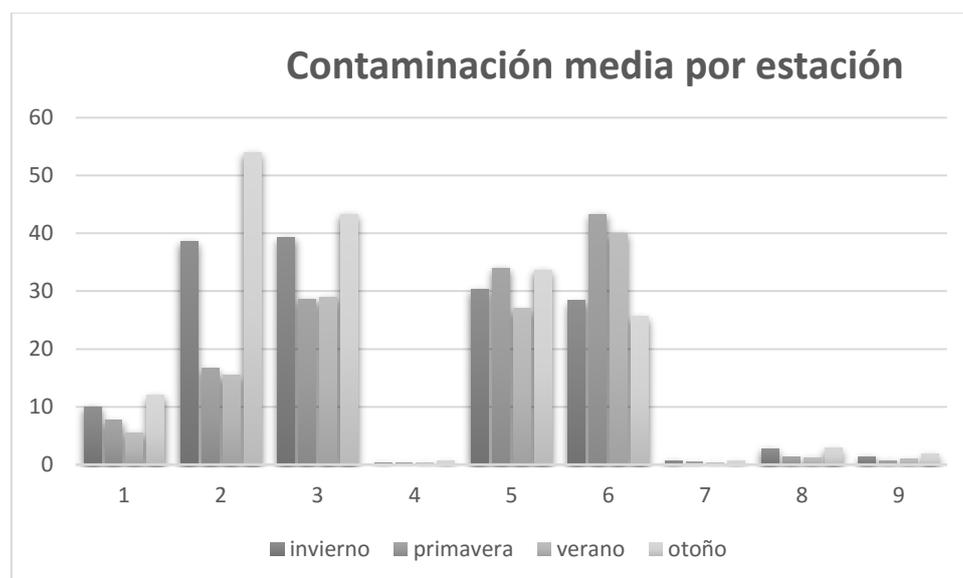


Figura 3. Se representa el valor medio de cada contaminante a lo largo de los tres meses de la estación (1: SO2 ug/m3, 2: NO ug/m3, 3: NO2 ug/m3, 4: CO mg/m3, 5: PM10 ug/m3, 6: O3 ug/m3, 7: BEN ug/m3, 8: TOL ug/, 9: MXIL ug/m3)

La media de los valores de radiación solar y temperatura durante las cuatro estaciones del año 2015 se representan en la figura 4.

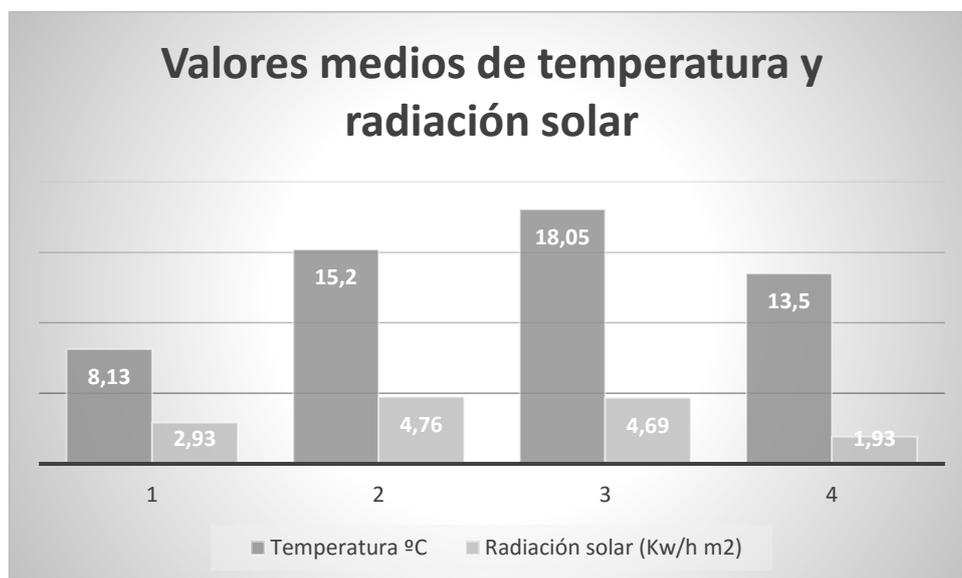


Figura 4. Valores de la radiación solar y temperatura media a lo largo de las estaciones (1: invierno, 2: primavera, 3: verano, 4: otoño)

Se ha hecho un estudio del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables ambientales, valores de contaminación, radiación solar y gestación evolutiva y calidad embrionaria. De las correlaciones obtenidas se han considerado estadísticamente significativas aquellas con un p-valor menor de 0,05.

Los resultados numéricos pueden consultarse en las tablas A3 y A4 de los anexos.

Pearson p-value	NO2	PM10	MXIL	Rad. Sol.	Tª	% Exit.	Gr. Emb.
NO2		0.32 p(0.32)	0.84 P(0.00)	-0.86 P(0.00)	-0.60 P(0.04)	-0.58 P(0.05)	0.13 P(0.70)
PM10	0.32 p(0.32)		0.41 P(0.20)	-0.30 P(0.33)	-0.06 P(0.84)	-0.30 P(0.35)	0.57 P(0.06)
MXIL	0.84 P(0.00)	0.41 P(0.20)		-0.90 P(0.00)	-0.41 P(0.20)	-0.56 P(0.06)	0.08 P(0.81)
Rad. Sol.	-0.86 P(0.00)	-0.30 P(0.33)	-0.90 P(0.00)		0.58 P(0.05)	0.37 P(0.25)	-0.16 P(0.62)
Tª	-0.60 P(0.04)	-0.06 P(0.84)	-0.41 P(0.20)	0.58 P(0.05)		0.21 P(0.52)	-0.05 P(0.87)
% Exit.	-0.58 P(0.05)	-0.30 P(0.35)	-0.56 P(0.06)	0.37 P(0.25)	0.21 P(0.52)		-0.27 P(0.41)
Gr. Emb.	0.13 P(0.70)	0.57 P(0.06)	0.08 P(0.81)	-0.16 P(0.62)	-0.05 P(0.87)	-0.27 P(0.41)	

Tabla 1. Valores del coeficiente de relación de Pearson

De los resultados del coeficiente de correlación de Pearson podemos extraer varios resultados:

1. Las partículas en suspensión PM10 no muestran una correlación significativa con el resto de contaminantes mostrando un origen de la contaminación posiblemente diferente.
2. Las variables con correlación significativa (p -valor $<0,05$) con la tasa de gestación es la contaminación atmosférica por NO₂.
3. Sobre la calidad embrionaria la correlación no es significativa para ninguno de los contaminantes estudiados.

Para el estudio de regresión lineal entre variables se realiza un ajuste lineal para obtener el OR (odd ratio) como la pendiente de la recta que mejor ajusta los datos. Los resultados aparecen en las siguientes figuras (Figura 5, 6 ,7).

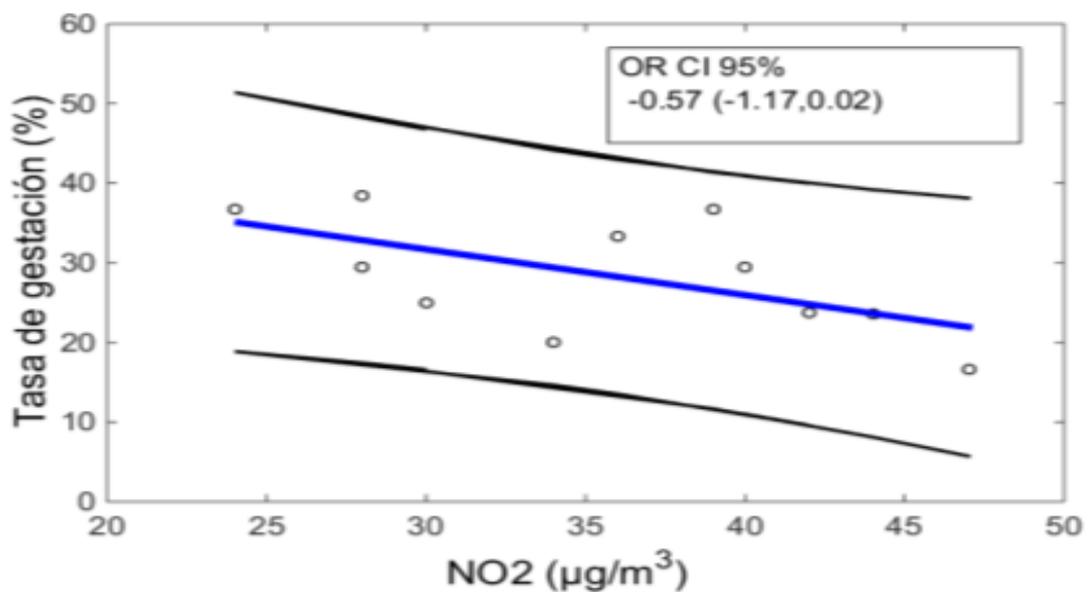


Figura 5: Relación lineal entre NO₂ y porcentaje de fecundación para un nivel de confianza del 95% (azul) e intervalos de confianza para un 95% (negro). Correlación Pearson -0.57.

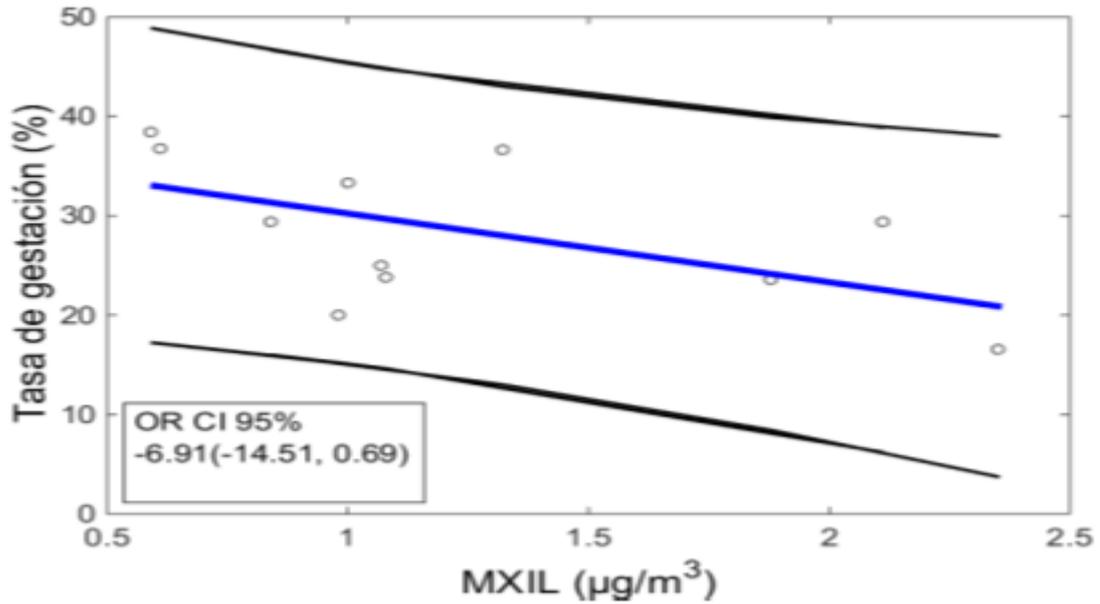


Figura 6: Relación lineal entre MXIL y porcentaje de fecundación para un nivel de confianza del 95% (azul) e intervalos de confianza para un 96% (negro). Correlación Pearson -0.56

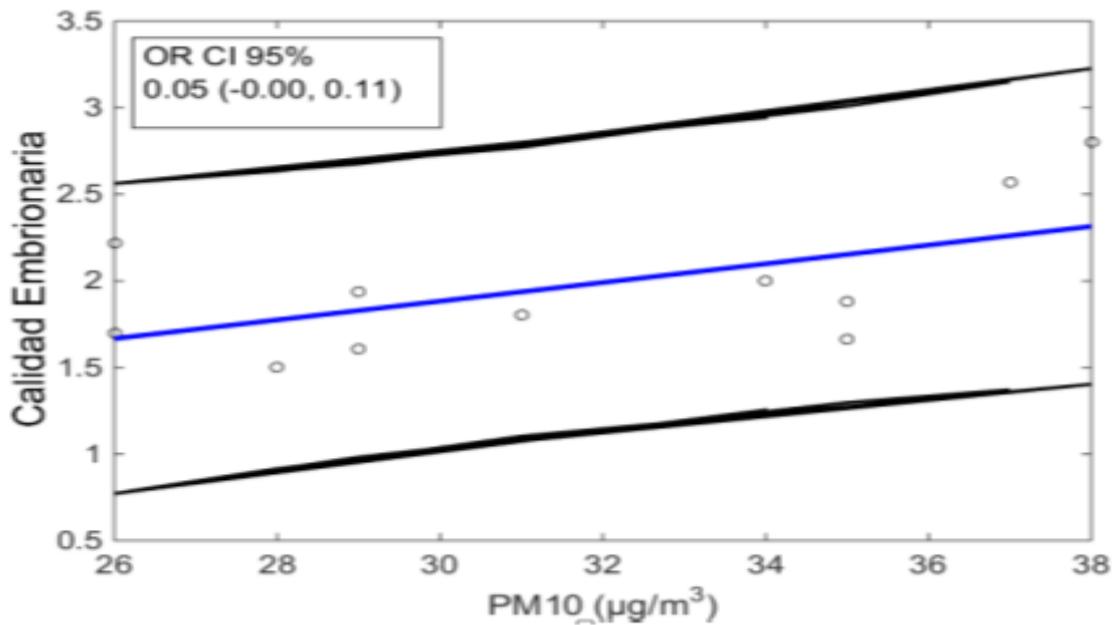


Figura 7: Relación lineal entre partículas PM10 y calidad embrionaria (A (1), B (2), C (3), D (4)) para un nivel de confianza del 95% (azul) e intervalos de confianza para un 95% (negro). Correlación de Pearson +0,57.

Se ha comprobado que la temperatura /radiación no muestra una correlación (coeficiente de Pearson) significativa ($p > 0.05$) con la tasa de gestaciones, ni el grado de calidad embrionaria. Sin embargo, NO₂ y MXIL tienen correlación significativa con factores estacionales (radiación solar y temperatura) mientras que PM₁₀ no muestra ninguna relación estadísticamente significativa con estos factores ambientales.

A fin de realizar el estudio estacional, se compararon los datos mediante un t-test para ver entre qué estaciones se producen **valores distintos** estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Los resultados aparecen en las siguientes tablas (Tabla 2, 3, 4).

NO₂	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Invierno		0.045	0.019	0.2489
Primavera	0.045		0.92	0.018
Verano	0.019	0.92		0.020
Otoño	0.2489	0.0186	0.0204	

Tabla 2: p-valor para el caso de la variación entre estaciones del NO₂ medio (t-test).

MXIL	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Invierno		0.1937	0.3415	0.38
Primavera	0.1937		0.0208	0.047
Verano	0.341	0.0208		0.018
Otoño	0.386	0.047	0.08	

Tabla 3: p-valor para el caso de la variación entre estaciones del MXIL medio (t-test).

PM₁₀	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Invierno		0.3582	0.287	0.376
Primavera	0.358		0.112	0.930
Verano	0.2872	0.11		0.101
Otoño	0.376	0.9302	0.1019	

Tabla 4: p-valor para el caso de la variación entre estaciones de PM₁₀ medio (t-test)

De las anteriores tablas puede observarse:

- El nivel NO₂ muestra variaciones estacionales significativas en el paso del invierno a la primavera (baja) y del verano al otoño (sube).
- El nivel de MXIL sólo se altera en el paso de la primavera al verano (sube) y del verano al otoño (sube)
- PM₁₀ no presenta variaciones estadísticamente significativas entre estaciones.

En cuanto a la variación estacional (invierno, primavera, verano y otoño) de la tasa de éxito de gestación, los resultados aparecen en la siguiente tabla (Tabla 5).

% Exit. Fecund	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Invierno		0.6858	0.613	0.6541
Primavera	0.6858		0.5236	0.5006
Verano	0.6313	0.5236		0.8121
Otoño	0.6541	0.5006	0.8121	

Tabla 5: *p*-valor para el caso de la variación entre estaciones de la tasa media (3meses) de éxito en la fecundación (*t*-test)

Como puede observarse, las variaciones en la media de éxitos de fecundación (28.8 en invierno, 31.7 en primavera, 27.2 en verano y 25.6 en otoño) no son significativas.

5. DISCUSIÓN.

El impacto del estilo de vida y de la exposición a factores ambientales, tales como agentes físicos (irradiación, campos magnéticos, calor), sustancias químicas y tóxicas medioambientales (polucionantes del aire, pesticidas, metales, componentes del humo del tabaco) es un problema que preocupa y que gana importancia en nuestra sociedad actual (*Sharma R., 2013*).

En nuestro estudio se ha observado cierta relación entre la tasa de gestación y contaminantes ambientales atmosféricos, así como la calidad embrionaria en relación con las partículas en suspensión (PM10). Si bien, el grado de correlación no es muy alto (alrededor de 0.6 en todos los casos).

A pesar de que el estudio de la contaminación del aire ha recibido una especial atención en las últimas décadas por razones de salud, son menos las publicaciones sobre sus efectos sobre la fertilidad (*Sram RJ., et al., 2005*). Contaminantes como el dióxido de azufre, monóxido de carbono, dióxido de nitrógeno, partículas de ozono, o gases procedentes de los vehículos de motor, emisiones industriales, etc., han sido relacionados tanto con la disminución de la fertilidad masculina, al afectar a la morfología, motilidad y fragmentación del DNA espermático (*Sokol RZ. et al., 2003*), así como con la aparición de sucesos adversos obstétricos: abortos, prematuridad, muerte fetal (*Ritz et al., 2007*). El bajo peso al nacer, también se asocia con la exposición a contaminantes ambientales durante el embarazo (*Lee et al., 2003*).

La concentración de los contaminantes en la atmósfera se afecta por variables meteorológicas como, la temperatura, la humedad relativa y la radiación solar, que controlan a su vez la velocidad con la que se realizan las reacciones químicas atmosféricas. Por otro lado, la dispersión de estos contaminantes es influenciada por la velocidad y dirección de los vientos, así como la estabilidad que predomina en la atmósfera (*Bravo et al., 2000*).

La contaminación fotoquímica (o tipo “verano”) se refiere principalmente a la contaminación procedente de las reacciones de los hidrocarburos y los óxidos de nitrógeno, estimuladas por la luz solar intensa y el incremento de la temperatura. Los contaminantes primarios procedentes de la combustión de combustibles fósiles presentan un patrón con valores más altos en invierno y valores más bajos en los meses de verano. En cambio el ozono presenta el patrón inverso, sus valores son más altos en los meses de temperaturas más altas debido a la interacción de los rayos ultravioleta con los gases precursores procedentes del escape de los vehículos y otras fuentes (NO₂ y CO). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, donde el NO₂ muestra una correlación de Pearson con la radiación solar de -0.86.

El aumento de la concentración de **dióxido de nitrógeno (NO₂)** tanto en el ambiente exterior como en el interior del laboratorio estaría significativamente asociado con una menor posibilidad de embarazo y nacimiento durante los tratamientos de fertilización in Vitro; según sostiene uno de los últimos estudio llevado a cabo entre el año 2000 y el 2007 por el Penn State College of Medicine en Pennsylvania sobre más de 7000 mujeres en áreas rurales, urbanas y suburbanas. Los resultados son más complejos cuando se trata de otro contaminante, **el ozono (O₃)**. La exposición a altos niveles de ozono se asocia con mejores tasas de gestación. Sin embargo, los niveles de NO₂ tienden a bajar a medida que aumentan los niveles de O₃ y el NO₂ es el contaminante que mantiene mayor asociación negativa con la tasa de éxito en FIV. Las posibilidades de éxito del tratamiento in Vitro no se relacionaban con la alta concentración de ozono sino con la baja concentración de NO₂ (*Legro R., et al., 2010*). Este dato también concuerda con los resultados del presente trabajo.

El **tolueno y el xileno** se usan en: esmaltes para uñas, pegamentos y adhesivos, lacas, elevadores de octano en la gasolina, pinturas, disolventes de pintura, procesos de impresión y curtido del cuero, pegamentos de caucho y plástico, pintura para madera. Se debe destacar el carácter liposoluble, su especial afinidad por tejido graso del sistema nervioso y su poder tóxico, mutagénico y carcinogénico. Sobre el sistema reproductor, las mujeres pueden sufrir alteraciones en los ciclos menstruales (menorragia, metrorragia). Se ha visto que también provoca problemas durante el embarazo (amenaza de aborto, hemorragias durante el embarazo) y esterilidad. En un estudio realizado por Susan R. Reutman y colaboradores (*Reutman S., et al., 2002*), se concluyó que la exposición a estos contaminantes altera crónicamente los niveles de la hormona luteinizante (LH), pudiendo esto impactar en los procesos biológicos LH-dependientes. Nuestro estudio muestra una correlación de Pearson entre Xileno y la tasa de gestación (-0,56), si bien no muy elevada.

En cuanto a la embriotoxicidad, en nuestro estudio hemos encontrado una influencia de las partículas PM₁₀. En la literatura aparecen numerosos estudios relacionan las partículas en suspensión con problemas en el embarazo, no hay muchas referencias sobre su influencia en la calidad embrionaria. Un estudio realizado por Mesquita S. y colaboradores (*Mesquita S., et al., 2014*) asocia estas partículas a baja calidad del embrión en un modelo animal (Pez Cebra). Anteriormente, un estudio realizado en Brasil, mostraba un mayor riesgo aborto después tanto en FIV como por concepción espontánea en las personas expuestas a elevadas concentraciones de PM₁₀ durante la fase folicular (*Perin PM., et al., 2010*).

En primavera suben temperaturas, el día se alarga y hay más luminosidad. El estado de ánimo suele ser más positivo. La luz y el calor aumentan las sensaciones placenteras,

influyendo también en la producción de hormonas como la melatonina y síntesis de vitamina D. La **Vitamina D** es una vitamina liposoluble que se almacena en el tejido graso del cuerpo. La piel sintetiza vitamina D a partir de 7- dehidrocolesterol por acción de los rayos ultravioletas (UVB). La síntesis de vitamina D a través de la piel representa la mayor fuente de vitamina D. El cuerpo produce vitamina D cuando se expone directamente al sol, 10- 15 minutos de exposición al sol tres veces por semana son suficientes para producir los requerimientos corporales de esta vitamina. Se ha demostrado que los niveles de vitamina D varían durante las estaciones, siendo más bajos durante el invierno que en verano y primavera (*Moller et.al., 2012*) La deficiencia de vitamina D es muy frecuente, pero difícil de evaluar. El déficit de vitamina D es responsable de la desmineralización ósea, osteoporosis y aumento de riesgo de fracturas. Presenta efectos beneficiosos en enfermedades autoinmunes, diabetes, enfermedades cardiovasculares, así como en la investigación del cáncer (*Holick MF. et al., 2007*). La vitamina D también influye en el sistema reproductivo, en especial sobre el tejido ovárico, aumenta la producción de progesterona y estradiol y favorece la foliculogénesis (*Elisabeth L., et al., 2012*). Un grupo de investigadores realizaron un pequeño estudio en el que compararon en Italia el éxito de la FIV en 154 mujeres con deficiencias en la vitamina D con el de 181 mujeres con niveles suficientes de vitamina D (*Trably C., et al., 2015*). Las que tenían unos niveles de vitamina D suficientes tenían el doble de probabilidades de quedar embarazadas que las que tenían una deficiencia de vitamina D, informó el equipo. Las mujeres con niveles suficientes de vitamina D también tenían más probabilidades de tener embriones de mejor calidad y una mayor probabilidad de implantación del embrión en el útero, halló el estudio. El estudio no demuestra que haya una relación de causalidad, y, el coautor del estudio, enfatizó que "se necesitan ensayos clínicos aleatorizados para confirmar los hallazgos"; "ciertamente sugieren que los niveles bajos de vitamina D contribuyen a la infertilidad" (*Paffoni A., et al., 2014*).

En nuestro estudio la temperatura ni la radiación solar no muestran correlación significativa, aunque es difícil determinar la exposición solar de cada individuo y los niveles de vitamina D no estaban disponibles (no es un valor analítico recogido en el protocolo FIV-HUCA).

De estos factores ambientales el NO₂ y el MXIL muestran variaciones significativas entre estaciones. Sin embargo, la tasa de gestación evolutiva no tiene variaciones significativas estacionales. Esto puede ser debido a que la correlación con estos contaminantes no es muy alta. Por otro lado, este resultado final puede verse afectado por algunas **limitaciones de nuestro estudio**, entre las que se cuentan:

- La edad de la paciente, uno de los factores asociados a la tasa de éxito en la gestación, es variable.

- El tamaño de la muestra, no es suficientemente grande.
- Poca información sobre la pareja masculina, nuestro estudio carece de datos sobre los parámetros seminales en el día de FIV.
- Desconocemos el tiempo de exposición a la radiación solar del individuo a estudio.

6. CONCLUSIÓN.

- En el presente trabajo hemos podido llegar a las siguientes conclusiones:
 1. Los **cambios entre estaciones** no influyen significativamente en la tasa de éxito de gestación por FIV/ICSI.
 2. La **temperatura/radiación** no muestra una correlación (coeficiente de Pearson) significativa ($p > 0.05$) con la tasa de gestaciones ni el grado de calidad embrionario.
 3. La tasa de éxito de fecundación muestra correlación significativa con los valores de algún contaminante ambiental estudiado: **NO₂**.
 4. La calidad embrionaria no muestra correlación significativa con ninguno de los contaminantes ambientales estudiados.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012; 98:302-7.
2. American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015; 103:18-25. ASEBIR.
3. Bravo JL., Nava MM., Muhlia A. Relaciones entre la magnitud del valor máximo de ozono, la radiación solar y la temperatura ambiente en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. *Contaminación Ambiental*. 2000; 16(2):45-44.
4. Chalupka S., Chalupka AN. The impact of environmental and occupational exposures on reproductive health. *JOGNN* 2010; 39:84-102.
5. Boivin J., Bunting L., Collins JA. Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*. 2007; 22:1506-12.
6. Cobellis L., Latini G., de Felice C., Razzi S., Paris I., Ruggieri F., Mazzeo P., Petraglia F. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)- phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18:1512-1515.
7. Coloreu B. La infertilidad en España: Situación actual y perspectivas. Libro blanco sociosanitario, 2011.
8. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocitos humanos. Cuadernos de Embriología clínica II, 2008.
9. Domingues T., Rocha A. M., Serafini P. Test for ovarian reserve: reliability and utility. *Current Opinion in O. and G.* 2010; 22:271-276.
10. Duty SM., Silva M.J, Barr DB., Brock JW., Ryan L., Chen Z., Herrick RF., Christiani DC and Hauser . Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 2003; 14: 269-277
11. Edwards R., Gardner R. Sexing of five rabbit blastocyst. *Nature* 1968; 214:576-7.
12. Elisabeth L., Barbara O., Vitamin D and fertility: A systematic review. *European Journal of Endocrinology* 2012; 166: 765-778.
13. Fathalla MF., Rosenfield A., Indriso C., Sen DK, Ratman SS. Salud reproductiva: Problemas mundiales. Rosenfield A., Fathalla MF., editores. Manual de Reproducción Humana (FIGO). Carteston Hall: The Partenon Publishing Group, 1994.
14. Handyside A., Kontogianni H., Hardy K., et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344:768-70.
15. Harthshorne G. Thrity years of IVF. *Human Fertility* 2008; 11: 77-83.
16. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357 (3): 266-81.

17. Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup Health* 2004; 46: 1–19.
18. Lee BE., Ha EH., Park HS., Kim YJ., Hong YC., Kim H., Lee JT., Exposure to air pollution during different gestacional phases contributes to risk of low birthweight. *Human Reproduccion* 2003; 18:638-643.
19. Legro R., Sauer M., Mottla G., Richter K., Li X., Dodson W., Liao D. Effect of air quality on assisted human reproduction. *Human Reproduction* 2010, 25; (5): 1317-1324.
20. Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL, eds. *Comprehensive Gynecology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby; 2012: chap 41.
21. López Villaverde V. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción humana*; 2014, 31(2): 31-37.
22. Maheshwari A., Hamilton M., Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Human Reproduction* 2008, 23:538-542
23. Marqueta J., Hernández J., Luceño F., Cabell Y., Fernández S., Vidal E. Reflexiones entorno a la salud reproductiva y de los tratamientos de reproducción asistida en España a la luz del registro de actividades de la S.E.F. Comité de Registro de la Sociedad Española de Fertilidad. Jornada organizada por Fundación Salud 2000 el 1 marzo 2001. H.U. Gregorio Marañón. Madrid. Otte A, Regulación Natural de la fertilidad. Ed. Palabra Cap 4, Pag. 15.
24. Matorras Weing R. La infertilidad en España: Situación actual y perspectivas. Sociedad Española de Fertilidad, 2011.
25. Mesquita S., Van Droogbeest B., Guimaraes L., Grimal J., Barata C., Piña B. Toxic assesment of urban atmospheric particle bound PAHS: Relevance of composition and particle size in Barcelona. *Environmental Pollution* 2014; 184: 555-562.
26. Moller UK, Streyrn S, Heickendorff L, Rejnmark L; Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66 (7): 862-8.
27. Morice P., Joset P., Chapron C., Dubuisson JB.: History of infertility. *Hum Reproduccion Update* 1995; 1: 497-504.
28. Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 1992; 340 (8810): 17-18.
29. Paffoni A., Ferrari S., Vigano P., Pagliardini L., Papaleo E., Candiani M., Fedele L., Somigliana E. Vitamin D deficiency and infertility: Insights from in vitro fertilization. *J. Clin Endocrinol Metabo.* 2014; 99 (11):2372-6.
30. Perin PM., Maluf M., Czeresnia CE., Nicolosi Foltrn Janurio DA., Nascimento Saldiva PH. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during

- the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2010; 93:301-303.
31. Reutman S., Kawas G., Knetch Edwin A., LockKey E., Berroughs G., Edwards S. Evidence of Reproductive Endocrine Effects in Women with Occupational Fuel and Solvent Exposures. *Environmental Health Perspectives* 2002; (8) : 110
 32. Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JK: Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the university of california, losangeles. *Epidemiol.* 2007;166:1045–1052.
 33. Rubio C., Rodrigo L., Mercader A., Mateu E., Simón C., Remohí J., Pellicer A. Pre-implantation genetic diagnosis and the new indications for its use in assisted reproduction. *Clínica en Investigación en Ginecología y Obstetricia* 2004; 31; 9.
 34. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013; 16; 11:66.
 35. Smith KR., Corvalan CF., Kjellstrom T. How much global ill health is attributable to environmental factors? *Epidemiology* 1999 Sep;10(5):573-84
 36. Sram RJ., Binkova B., Dejmek J., Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 375-382.
 37. Sokol RZ., Kraft P., Fowler IM., Mamet R., Kim E., Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect* 2006; 114:360–365.
 38. Thornhill A., deDie-Smulders C., Geraedts J., et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod* 2005; 20(1):35-48.
 39. Tielemans E., van Kooij R., Looman C., Burdorf A., te Velde E., Heederik D. Paternal occupational exposures and embryo implantation rates after IVF. *Fertil Steril* 2000; 74:690–695.
 40. Tinneberg, H.R., Gasbarrini, A. Infertility today: the management of female medical causes. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013; 123 Suppl: S25-30
 41. Trably C., Brosse A., Plotton I., Berthiller J., Du Mesnildot P., Hadj S., Lornage J., Salle B. Predictive value of vitamin D plasma levels on pregnancy rates in a cohort of IVF patients. *Gynecologie Obstetrique & Fertilité.* 2015; 43: 722-727.
 42. Trounson A., Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305 (5936): 707-9.
 43. Zegers-Hochschild F., GD Adamson J., Ishiara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Van der Poel S. En nombre de ICMART y OMS. El Comité Nacional de

Evaluación de Tecnología de Reproducción Asistida (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) revisado glosario de terminología de ART. Hum Reprod, 2009; 24 (11): 1-5.

8. ANEXOS.

Tabla A1. REGISTRO DE PRINCIPALES CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS MEDIO EN LA CAPITAL DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (OVIEDO).

RED DE ESTACIONES DE INMISIÓN GESTIONADAS POR EL PRINCIPADO DE ASTURIAS

Estación P. Deportes	
Ayuntamiento Oviedo	Latitud 43°22'06"N
Dirección Palacio Deportes	Longitud 5°49'55"W
Código nacional 33044030	Altura 186m

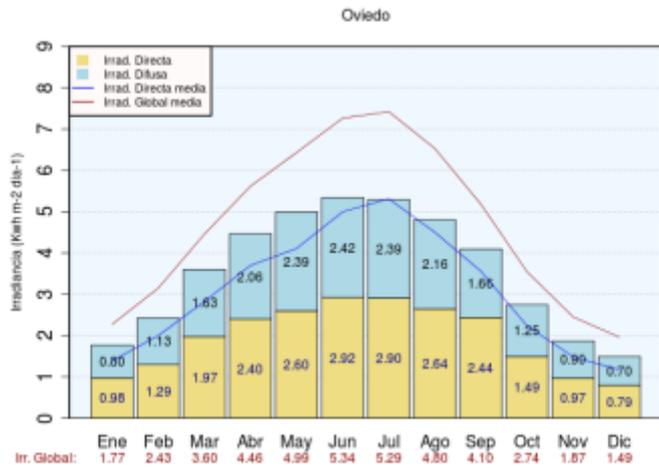
INFORME DE DATOS VALIDADOS Mensual

Intervalo de fechas 01/01/2015-31/12/2015

Los informes mostrarán datos validados por un gestor. Si para las fechas seleccionadas no hay datos validados se mostrarán datos temporales pendientes de validar.

	Hora HH:MM	SO2 (µg/m3)	NO (µg/m3)	NO2 (µg/m3)	CO (mg/m3)	PM2,5 (µg/m3)	PM10 (µg/m3)	O3 (µg/m3)	BEN (µg/m3)	TOL (µg/m3)	MXIL (µg/m3)
Enero	01/01/2015	15.0(V)	65.0(V)	40.0(V)	0.45(V)		34.0(V)	18.0(V)	0.91(V)	4.14(V)	2.11(V)
Feb.	01/02/2015	9.0(V)	34.0(V)	42.0(V)	0.35(V)		26.0(V)	31.0(V)	0.66(V)	2.31(V)	1.08(V)
Marzo	01/03/2015	6.0(V)	17.0(V)	36.0(V)	0.29(V)		31.0(V)	36.0(V)	0.64(V)	1.91(V)	1.0(V)
Abril	01/04/2015	9.0(V)	14.0(V)	34.0(V)	0.31(V)		38.0(V)	40.0(V)	0.5(V)	1.74(V)	0.98(V)
Mayo	01/05/2015	6.0(V)	10.0(V)	24.0(V)	0.18(V)		29.0(V)	45.0(V)	0.36(V)	1.08(V)	0.61(V)
Junio	01/06/2015	8.0(V)	26.0(V)	28.0(V)	0.21(V)		35.0(V)	45.0(V)	0.33(V)	1.05(V)	0.59(V)
Julio	01/07/2015	5.0(V)	18.0(V)	30.0(V)	0.25(V)		28.0(V)	41.0(V)	0.34(V)	1.04(V)	1.07(V)
Agosto	01/08/2015	7.0(V)	6.0(V)	22.0(V)	0.3(V)		30.0(V)	39.0(V)	0.39(V)	1.25(V)	0.95(V)
Sept.	01/09/2015	6.0(V)	13.0(V)	28.0(V)	0.43(V)		26.0(V)	39.0(V)	0.32(V)	1.33(V)	0.84(V)
Oct.	01/10/2015	10.0(V)	30.0(V)	39.0(V)	0.5(V)		29.0(V)	19.0(V)	0.48(V)	2.06(V)	1.32(V)
Nov.	01/11/2015	14.0(V)	53.0(V)	44.0(V)	0.58(V)		37.0(V)	32.0(V)	0.65(V)	2.73(V)	1.88(V)
Dic.	01/12/2015	12.0(V)	79.0(V)	47.0(V)	0.62(V)		35.0(V)	26.0(V)	0.76(V)	3.66(V)	2.35(V)

Tabla A2. REGISTRO DE RADIACIÓN SOLAR MEDIA EN LA CAPITAL DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS (OVIEDO).



MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

Agencia Estatal de Meteorología

Estacionalidad y Fecundación in Vitro

Corr	SO2	NO	NO2	CO	PM10	O3	BEN	TOL	MXIL	% Exit	R.Sol	Edad	G.Emb
SO2		0.855	0.761	0.732	0.587	-0.734	0.787	0.877	0.838	-0.344	-0.848	-0.034	0.363
NO	0.855		0.815	0.770	0.431	-0.704	0.799	0.911	0.938	-0.467	-0.846	-0.008	-0.038
NO2	0.761	0.815		0.813	0.329	-0.765	0.826	0.833	0.846	-0.587	-0.861	-0.059	0.131
CO	0.732	0.770	0.813		0.258	-0.741	0.582	0.743	0.847	-0.496	-0.888	-0.112	0.282
PM10	0.587	0.431	0.329	0.258		-0.067	0.361	0.384	0.415	-0.308	-0.309	-0.514	0.574
O3	-0.734	-0.704	-0.765	-0.741	-0.067		-0.750	-0.826	-0.773	0.175	0.823	-0.133	-0.007
BEN	0.787	0.799	0.826	0.582	0.361	-0.750		0.949	0.822	-0.426	-0.832	0.092	0.063
TOL	0.877	0.911	0.833	0.743	0.384	-0.826	0.949		0.928	-0.455	-0.905	0.023	0.093
MXIL	0.838	0.938	0.846	0.847	0.415	-0.773	0.822	0.928		-0.565	-0.903	0.021	0.081
%Exit	-0.344	-0.467	-0.587	-0.496	-0.308	0.175	-0.426	-0.455	-0.565		0.378	0.284	-0.273
R.Sol	-0.848	-0.846	-0.861	-0.888	-0.309	0.823	-0.832	-0.905	-0.903	0.378		-0.044	-0.168
Edad	-0.034	-0.008	-0.059	-0.112	-0.514	-0.133	0.092	0.023	0.021	0.284	-0.044		-0.419
G.Emb	0.363	-0.038	0.131	0.282	0.574	-0.007	0.063	0.093	0.081	-0.273	-0.168	-0.419	

Tabla A3. Valores del coeficiente de relación de Pearson de las variables estudiadas.

P valor	SO2	NO	NO2	CO	PM10	O3	BEN	TOL	MXIL	% Exit	R.Sol	Edad	G.Emb
SO2		0.001	0.007	0.010	0.058	0.010	0.004	0.000	0.001	0.301	0.001	0.921	0.272
NO	0.001		0.002	0.006	0.186	0.016	0.003	0.000	0.000	0.148	0.001	0.980	0.912
NO2	0.007	0.002		0.002	0.323	0.006	0.002	0.001	0.001	0.058	0.001	0.864	0.700
CO	0.010	0.006	0.002		0.444	0.009	0.061	0.009	0.001	0.121	0.000	0.743	0.402
PM10	0.058	0.186	0.323	0.444		0.845	0.275	0.243	0.204	0.357	0.355	0.105	0.065
O3	0.010	0.016	0.006	0.009	0.845		0.008	0.002	0.005	0.607	0.002	0.696	0.983
BEN	0.004	0.003	0.002	0.061	0.275	0.008		0.000	0.002	0.192	0.001	0.788	0.854
TOL	0.000	0.000	0.001	0.009	0.243	0.002	0.000		0.000	0.159	0.000	0.946	0.785
MXIL	0.001	0.000	0.001	0.001	0.204	0.005	0.002	0.000		0.070	0.000	0.950	0.813
%Exit	0.301	0.148	0.058	0.121	0.357	0.607	0.192	0.159	0.070		0.251	0.397	0.417
R.Sol	0.001	0.001	0.001	0.000	0.355	0.002	0.001	0.000	0.000	0.251		0.898	0.620
Edad	0.921	0.980	0.864	0.743	0.105	0.696	0.788	0.946	0.950	0.397	0.898		0.200
G.Emb	0.272	0.912	0.700	0.402	0.065	0.983	0.854	0.785	0.813	0.417	0.620	0.200	

Tabla A4. Valores del P-valor para los coeficientes de correlación de Pearson tabla1.