

Oleadas foliculares y estatus de maduración ovocitaria. Detección de caspasas como indicador de apoptosis en ovocitos inmaduros

Carmen Machado,¹ Agustina Casco,¹ Glenda Ríos,² Pía Casanova,¹ Jorgelina Buschiazzi,² Alicia Pené¹

¹Centro de Reproducción y Genética Humana (Creger), Mar del Plata.

²Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Departamento de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Balcarce. (Convenio I+D - INTA de Balcarce y Conicet). Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2018;33:09-16

Resumen

Objetivos. Establecer la relación entre el número de folículos $\leq 14\text{mm}$, los ovocitos VG (estadio de vesícula germinal) y la duración de la estimulación ovárica controlada (EOC). Determinar el estatus apoptótico de los ovocitos VG mediante la identificación de caspasas activas. Establecer la relación entre las oleadas foliculares, los ovocitos VG y su viabilidad según la prueba de caspasas. **Diseño.** Estudio transversal de cohortes, prospectivo. **Materiales y métodos.** Se incluyeron 27 pacientes en tratamiento de fertilidad de alta complejidad, de las cuales se obtuvieron 61 ovocitos VG. Análisis estadístico: ANOVA, regresión lineal y test Chi^2 .

Resultados. Un aumento del número de folículos $\leq 14\text{mm}$ se relacionó con un aumento de ovocitos VG recuperados. Cuando la duración de la estimulación ovárica fue ≤ 9 o ≥ 11 días, la recuperación de ovocitos VG fue mayor con respecto a 10 días. El incremento en el número de folículos de la 2ª oleada fue directamente proporcional al número de ovocitos VG. Se recuperó un número mayor de ovocitos VG de los folículos de la 2ª oleada folicular. El número de ovocitos negativos y positivos para caspasa no presentó diferencia significativa, sin embargo, se observó una tendencia mayor de ovocitos VG negativos para caspasas en los folículos de la 2ª oleada. **Conclusión.** La duración de la EOC influye significativamente en la recuperación de ovocitos VG, mostrando que EOC cortas o prolongadas incrementan la cantidad de ovocitos inmaduros recuperados, provenientes de diferentes oleadas. Teniendo en cuenta la necesidad de obtener una mayor cantidad de ovocitos viables, tanto de la 1ª como de la 2ª oleada, deberíamos planificar estrategias. Identificar las oleadas foliculares durante la EOC podría modificar la conducta y los resultados reproductivos.

Correspondencia: Graciano Tessari
Correo electrónico: gaptessari@gmail.com

Palabras claves. Ovocitos VG, oleadas foliculares, estatus apoptótico, caspasas.

Follicular waves and status of oocyte maturation. Detection of caspases as indicator of apoptosis in immature oocytes

Summary

Objectives. To establish the relation between the number of follicles $\leq 14\text{mm}$, the number of GV oocytes (stage of germinal vesicle) and the duration of COS. To determine the apoptotic status of GV oocytes, by identifying active caspases. To establish the relation between follicular waves, GV oocytes and their viability according to the caspase test. **Design.** Cross sectional study of cohorts, prospective. **Materials and methods.** 61 GV oocytes obtained from 27 patients included in high complexity fertility treatment. Statistical analysis: ANOVA, linear regression with Poisson or Binomial distribution. Chi^2 test. **Results.** An increase in the number of follicles $\leq 14\text{mm}$ was related to an increase in the recovery of GV oocytes. When the duration of the ovarian stimulation was ≤ 9 or ≥ 11 days, the recovery of GV oocytes was higher with respect to 10 days. A greater number of GV oocytes were recovered from the follicles of the 2nd follicular wave. A greater number of VG oocytes were recovered from the follicles of the 2nd follicular wave. The number of negative and positive caspase oocytes did not present a significant difference, however, a greater tendency of negative VG oocytes was observed for caspases in the follicles of the 2nd wave. **Conclusion.** The duration of the COS significantly influenced the recovery of GV oocytes, showing that short COS or prolongation increases the number of immature oocytes recovered coming from different wave. Taking into account the need to obtain a greater number of viable oocytes, both from the 1st and the 2nd wave, we should plan strategies. Identifying the follicular waves during the EOC could modify the behavior and the reproductive results.

Key words. GV oocytes, follicular waves, apoptotic status, caspases.

Introducción

Los protocolos de estimulación ovárica con-

trolada (EOC) han sido modificados en los últimos años.¹

En un inicio, los protocolos de EOC no empleaban antagonistas de la GnRH (antagonistas), por lo que se producían alteraciones del ciclo, como luteinización prematura y fallas frecuentes en los tratamientos de reproducción asistida (TRA). Existía un 20% de cancelaciones de ciclo y una tasa de embarazo promedio que no superaba el 15%.²

En la actualidad, estos productos se emplean en la mayoría de los ciclos de EOC en TRA; sin embargo, a pesar de su uso rutinario, la luteinización prematura es un evento aún presente que afecta el éxito de los tratamientos. Según diversos estudios, se ha visto que se producen en el 5 a 35% de los ciclos con agonistas y en el 5 a 20% de los ciclos con antagonistas. Otro evento descrito es la luteinización prematura parcial (elevación de progesterona sin LH), que puede producirse hasta en el 38% de los casos.¹

Desde el advenimiento de los protocolos con antagonistas se han diseñado protocolos más eficientes y de menor duración, que han mejorado la respuesta a la EOC y los resultados reproductivos.²

Una de las ventajas de la implementación de los protocolos con antagonistas es destinar la utilización de los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (aGnRH) a la maduración ovocitaria final (descarga) en pacientes altas respondedoras (≥ 20 folículos en crecimiento) y, así, disminuir significativamente la incidencia del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO).¹

La EOC con los protocolos con antagonistas suelen generar una respuesta asincrónica en la cohorte de folículos en crecimiento. Con este tipo de respuesta existe el riesgo de un escape ovulatorio por luteinización prematura, situación que en ocasiones nos lleva a cortar los ciclos de EOC de forma precoz, obteniendo así un número mayor de ovocitos inmaduros.²

La respuesta asincrónica es frecuente en pacientes bajas respondedoras (≤ 7 folículos en crecimiento), por lo cual decidir el momento más adecuado para finalizar la EOC puede ser un desafío.³

Hace más de diez años que el paradigma del

modelo de desarrollo folicular en el ciclo menstrual ha comenzado a cambiar. Ya no se hace referencia al desarrollo de una única cohorte de folículos, sino que hay evidencias de la existencia de varias “oleadas” o cohortes de desarrollo folicular a lo largo de un ciclo. En este sentido, aquellos folículos de menor tamaño en asincronía con el resto de la cohorte folicular detectados al finalizar el monitoreo de la EOC, previo a la descarga, podrían pertenecer a diferentes oleadas foliculares.⁴

Poder diferenciar de cual de las oleadas derivan los ovocitos podría modificar la conducta, como por ejemplo decidir realizar dos estimulaciones en el mismo ciclo (*DuoStim*) para obtener un mayor número de ovocitos maduros (metafase II).⁵

La muerte celular dentro del folículo, en particular en las células de la granulosa, es una parte integral del desarrollo normal ya que constituye un proceso fundamental que mantiene la homeostasis del tejido, elimina las células no deseadas o dañadas y asegura el reciclado de componentes celulares.⁶ Basándose en la morfología de las células que mueren, dos modos distintos de muerte celular comúnmente estudiados incluyen la apoptosis y la necrosis, si bien se han descrito recientemente otros tipos de tipos de muerte celular.⁷ La tasa de embarazo y la calidad de los ovocitos se han relacionado con la incidencia de apoptosis en mujeres que reciben TRA.⁸ La apoptosis o muerte celular programada es causada por varias vías de señalización distintivas, que culminan en la contracción de la célula y la compartimentación de las organelas. Las células apoptóticas típicamente tienen cuerpos picnóticos oscuros de ADN denso, fragmentados en secciones más pequeñas. Las caspasas son enzimas proteolíticas con un rol bien definido en la apoptosis.⁹ Una vez que las caspasas iniciadoras se activan a través de las vías de apoptosis intrínseca o extrínseca, median la activación de las caspasas efectoras que actúan sobre distintos sustratos celulares.⁹

Las hipótesis planteadas en el presente estudio fueron:

- El aumento en el número de folículos al final del monitoreo de la ovulación se debe a la aparición de una nueva cohorte de folículos (considerada 2ª oleada folicular), por lo cual el número

de ovocitos en estadio de vesícula germinal (VG) será mayor.

- Duraciones cortas o prolongadas de la EOC generan un incremento en la recuperación de ovocitos VG viables y, por lo tanto, con mayor competencia para la maduración *in vitro*.

A partir de lo expuesto, los objetivos del presente estudio fueron:

1. Establecer la relación entre:
 - El número de folículos ≤ 14 mm y el número de ovocitos VG.
 - El número de ovocitos VG recuperados y la duración de la EOC (días).
2. Determinar el estatus apoptótico de los ovocitos VG mediante la prueba de caspasas.
3. Establecer la relación entre las oleadas foliculares, los ovocitos VG y la prueba de caspasas.

Materiales y métodos

El estudio fue realizado en el Centro de Medicina Reproductiva y Genética Humana (Crece) de la ciudad de Mar del Plata en el marco de un Convenio de I+D con el INTA de Balcarce y el Conicet, desde noviembre de 2017 hasta mayo de 2018.

Se incluyeron 27 pacientes a las que se les realizó EOC para tratamiento de fertilidad de alta complejidad; se obtuvieron 61 ovocitos inmaduros en estadio de VG. La edad de las pacientes fue de 26 a 43 años.

Se realizó un estudio de cohortes transversal y prospectivo.

La EOC se realizó con gonadotrofinas altamente purificadas (HMG: gonadotropina menopáusica humana) solas o combinadas con folitropina alfa (r-hFSH); protocolos con antagonistas. La misma se inició entre el día 2 y 3 del ciclo y la duración fue de 7 a 11 días. Se realizaron de 2 a 3 controles con ecografía transvaginal para valorar el crecimiento folicular en los días 5, 7 y 9 de la estimulación. El antagonista se indicó con al menos 1 folículo ≥ 14 mm. Las pacientes incluidas presentaron una respuesta a la estimulación de normal a baja.

Se consideraron como folículos de la 1ª oleada (mediante la cuantificación) a todos los folículos presentes desde el primer control del monitoreo

ovulatorio (detectados en el día 5 de la EOC) y de la 2ª oleada a la aparición de una nueva cohorte de folículos (diferencia en el conteo entre el número inicial y final de folículos) detectada al final de la EOC: días 9 a 11.

Se cuantificó el número total de folículos en el primer y último control ecográfico; la diferencia en la cantidad de folículos se consideró como perteneciente a la 2ª oleada. Se realizó la medición de cada uno de los folículos en los 3 controles.

La inducción de la maduración ovocitaria final, “descarga”, se realizó con hCG (gonadotropina coriónica humana) cuando ≥ 2 folículos fueron ≥ 18 mm; y la punción ovárica para la recuperación ovocitaria se realizó entre las 34 a 35 h. de la descarga, bajo anestesia y guía ecográfica.

Se recuperó el fluido de los folículos ≤ 14 mm (tamaño folicular ≤ 14 mm fue tomado como punto de corte para considerarse potenciales ovocitos VG a recuperar) en tubos separados, tanto de la 1ª como de la 2ª oleada. El material fue remitido al laboratorio de embriología donde se realizó la recuperación ovocitaria.

Los ovocitos recuperados se desnudaron mediante tratamiento enzimático (hialuronidasa 1mg/ml) y se observaron bajo lupa binocular para determinar el estadio de maduración nuclear. Se analizaron 60 ovocitos VG mediante incubación con un inhibidor específico (VAD-FMK) conjugado con FITC (Calbiochem®). VADFMK-FITC se une de manera irreversible a las caspasas activas en células que han iniciado la muerte celular programada o apoptosis. Es un marcador permanente, no tóxico, y por lo tanto se puede utilizar en células vivas. Los ovocitos se incubaron en Global® total con VAD-FMK-FITC en una concentración de 1:300 a 37° C con 5% CO₂ y humedad a saturación durante 45 min. Finalmente, los ovocitos se lavaron y montaron para su observación en un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX73). Los ovocitos que presentaron una señal de fluorescencia verde brillante se consideraron positivos para caspasas.

- Ovocitos caspasa positivos: ovocitos que iniciaron la muerte celular programada (no viables).
- Ovocitos caspasa negativos: ovocitos viables.

Por otro lado, se realizó una valoración adicional de la viabilidad sobre los ovocitos inmaduros negativos para caspasas. Estos se incubaron en Global® total a 37° C con 5% CO₂ y humedad a saturación durante 24 h. Luego, se observaron bajo lupa binocular para determinar el estadio de maduración nuclear, y evaluar así su capacidad para madurar espontáneamente. Aquellos ovocitos que presentaron corpúsculo polar se consideraron metafase II (MII).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con ANOVA, regresiones lineales con distribución Poisson o Binomial de acuerdo con la distribución de los datos en cada caso y test Chi².

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico R.¹⁰ Las diferencias se consideraron significativas para un $p < 0,05$.

Resultados

La población de datos a partir de la que se realizó este estudio se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la EOC del total de pacientes.

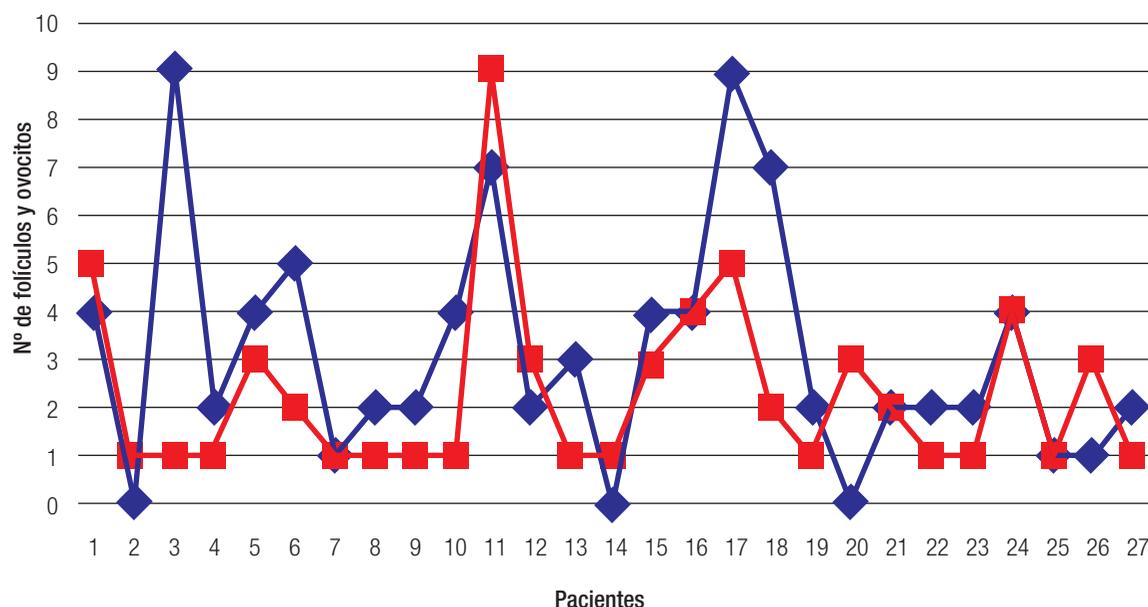
	Total	Promedio \pm SD*
Nº folículos 1º control	350	12,96 \pm 6,10
Nº folículos final EOC	440	16,29 \pm 9,44
Nº folículos ≤ 14 mm	134	4,96 \pm 2,53
Nº folículos 2ª oleada folicular	90	3,19 \pm 5,02
Nº ovocitos VG recuperados	61	2,26 \pm 1,89

* Promedio por paciente; SD: desvío estándar.

1. Relaciones establecidas entre el número de folículos ≤ 14 mm y el número de ovocitos VG recuperados

Folículos ≤ 14 mm y recuperación de ovocitos VG: se encontró que el número de ovocitos VG recuperados depende del número de folículos, independientemente de la oleada folicular. A mayor

Figura 1. Relación entre el número de folículos $\leq 14\text{mm}$ y la recuperación de ovocitos VG. Los datos se expresan en folículos $\leq 14\text{mm}$ y números de ovocitos VG para cada paciente.



número de folículos $\leq 14\text{mm}$, mayor es el número de ovocitos VG obtenidos ($p=0,002$).

En la Figura 1 se detalla el número de folículos y ovocitos VG recuperados para cada paciente.

Relación entre el número de folículos correspondientes a una nueva cohorte de folículos (2ª oleada folicular) y el número de los ovocitos VG recuperados: se determinó que el número de ovocitos VG es dependiente del número de folículos que aparecen en la 2ª oleada del ciclo de estimulación ovárica ($p<0,001$). A mayor número de folículos de la 2ª oleada, mayor es el número de ovocitos VG recuperados.

Relación entre el número de ovocitos VG recuperados y la duración de la estimulación (días): del análisis de la relación entre el número de ovocitos VG y la duración de la EOC se determinó que el número de ovocitos VG es mayor cuando la duración de la EOC fue ≤ 9 días o ≥ 11 días comparados con 10 días (Tabla 2).

2. Status apoptótico del total de ovocitos VG obtenidos, independientemente de la oleada folicular.

En la Figura 2 se muestra un ovocito inma-

Tabla 2. Número de ovocitos VG y duración de la EOC.

Duración EOC (días)	≤ 9	10	≥ 11	p
Ovocitos VG	20 ^a	13 ^b	28 ^a	$<0,05$

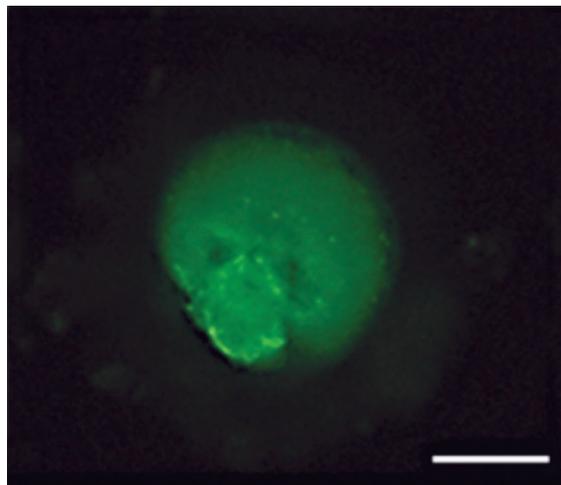
Letras distintas (a-b) indican diferencias significativas $p<0,05$.

duro con fluorescencia verde brillante, que ha iniciado la muerte celular programada (A) y un ovocito con una fluorescencia basal, negativo para caspasas (B). Se observaron porcentajes similares de ovocitos viables y no viables en los ovocitos VG recuperados ($p>0,05$) (Tabla 3). Por otro lado, de los ovocitos negativos para caspasa el 58,6% ($n=19$) maduró espontáneamente.

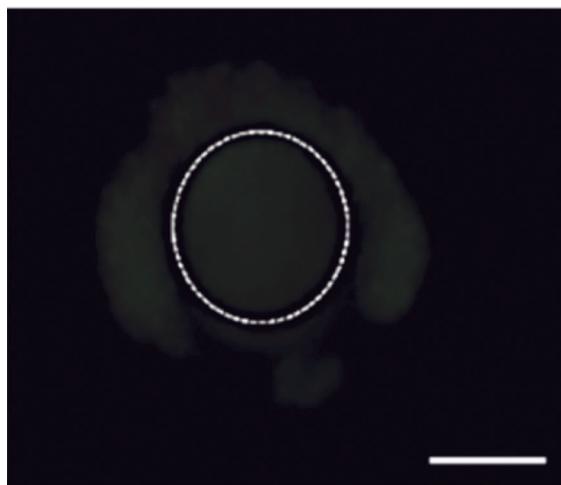
3. Relación entre las oleadas foliculares, el número de ovocitos VG y su estatus apoptótico

Los resultados obtenidos mostraron un mayor número folículos $<14\text{mm}$ en la 2ª oleada folicular y un mayor número de ovocitos VG respecto de la 1ª oleada ($p<0,05$). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las oleadas foliculares con respecto a la viabilidad medida por la identificación de caspasas activas (Tabla 4). Asimismo, no se encontraron diferencias sig-

Figura 2. Evaluación de la viabilidad ovocitaria mediante la detección de caspasas in situ. Los ovocitos desnudados se incubaron en VAD-FMK-FITC para detectar caspasas activadas in situ. Aquellos que mostraron fluorescencia verde brillante se consideraron positivos para caspasas. (A) Ovocito VG positivo para caspasas (no viable). (B) Ovocito VG negativo para caspasas (viable). Línea punteada: delimita el ovocito; por fuera se encuentran las células del cumulus que lo rodean. Barra de escala: 50 μ m.



Caspasa +



Caspasa -

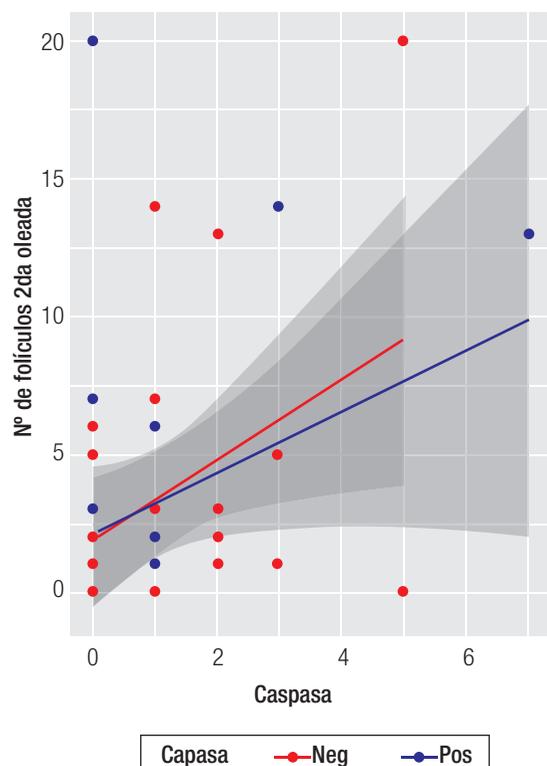
Tabla 3. Ovocitos VG y prueba de Caspasas.

Resultado	Ovocitos VG	%
Caspasa negativa	32	52,45
Caspasa positiva	29	47,55

nificativas entre el número de ovocitos negativos y positivos para caspasas a medida que aumenta el número de folículos de la 2ª oleada folicular. Sin embargo, se observó una tendencia a registrar un mayor número de ovocitos VG negativos para caspasas (Figura 3).

Oleadas foliculares	1º oleada folicular	2º oleada folicular	
Nº folículos ≤ 14 mm	44	90	$p=0,04$
Ovocitos VG	18	43	$p=0,002$
Caspasa positiva Nº (%)	10 (55,55)	19 (44,18)	$p>0,05$
Caspasa negativa Nº (%)	8 (44,44)	24 (55,81)	$p>0,05$

Figura 3. Relación entre el número de folículos de la segunda oleada y el número de ovocitos VG negativos y positivos para caspasas. Los resultados obtenidos se expresan en número de folículos de la segunda oleada ≤ 14 mm y número de ovocitos VG negativos (rosa) y positivos (celeste) para caspasas.



Discusión

Identificar las oleadas foliculares de las que derivan los ovocitos obtenidos podría ser sumamente importante. El número de ovocitos VG obtenidos de la 1ª oleada podría relacionarse con una detención del crecimiento, ya sea por contener un ovocito no viable, o por encontrarse vacío (ausencia de ovocito); y en el caso de los ovocitos derivados de la 2ª oleada, podría relacionarse con la menor duración de la EOC para esta cohorte folicular.

Ante la necesidad de obtener una mayor cantidad de ovocitos viables, tanto de la 1ª como de la 2ª oleada, una opción para los ovocitos derivados de esta última sería la maduración *in vitro*, sin exponer a los folículos de la 1ª oleada a una EOC prolongada. O evaluar si es conveniente realizar una doble estimulación (*DuoStim*)⁵ para obtener una mayor cantidad de ovocitos maduros.

En humanos, la maduración *in vitro* está poco adoptada en general y constituye una limitante debido a la baja eficiencia de esta biotécnica (~50-60%).^{11, 12} Durante una estimulación hormonal regular, ~20% de los ovocitos colectados permanecen en estado inmaduro (llegando a superar el 50% en casos individuales) sin poder utilizarse en los tratamientos de reproducción asistida. Por otro lado, en la actualidad la maduración *in vitro* es un procedimiento muy costoso. La aplicación clínica de la maduración *in vitro* ha encontrado un amplio apoyo en países donde los costos de las hormonas (gonadotrofinas) usadas para la estimulación ovárica exceden los recursos financieros de las pacientes (China, Taiwán, Corea).¹¹ En Argentina, un kit de estas características tiene un valor aproximado de mil dólares, por lo cual no resulta costo efectivo.

Múltiples factores moleculares controlan la maduración nuclear y la citoplasmática, ambas necesarias para la competencia de desarrollo del ovocito. La maduración citoplasmática aún resulta un parámetro difícil de determinar. La maduración citoplasmática subóptima se manifestará en un clivaje alterado y en fallas de implantación. Por lo tanto, una maduración apropiada requiere maduración nuclear y exposición a las señales apropiadas para una maduración citoplasmática sincrónica.¹³

La maduración *in vitro* de ovocitos recuperados de folículos ováricos antrales es un procedimiento

emergente que está siendo incorporado dentro del dominio tecnológico de la reproducción asistida. Esta nueva tecnología tiene varias ventajas potenciales sobre la tradicional EOC, tales como la reducción de los costos mediante la disminución del uso de gonadotrofinas y análogos de GnRh, y la reducción de los efectos secundarios, como el riesgo de desarrollar el SHEO. A su vez podría representar la única alternativa para la preservación de la fertilidad de pacientes oncológicas. En particular para mujeres con tumores hormono-sensibles que no pueden someterse a un TRA convencional porque la estimulación ovárica está contraindicada, o bien porque no se puede posponer el inicio de la quimioterapia o radioterapia.¹³

En la aplicación clínica de la maduración *in vitro* son considerados como marcadores para realizar la aspiración de ovocitos inmaduros un folículo dominante entre 8 y 12 mm y/o el endometrio >5 mm.¹⁴

El principio general se basa en realizar la aspiración de los ovocitos inmaduros inmediatamente después de la inducción a la atresia, pero antes de la exposición prolongada a los posibles efectos adversos del folículo dominante (endócrinos y parácrinos). Algunos autores mostraron beneficios al realizar la aspiración después que el folículo dominante alcanza los 10 mm, mientras que otros sostienen que es demasiado tarde y perjudicial, y proponen cancelar el ciclo. Es por eso que las distintas publicaciones varían significativamente respecto del criterio ecográfico a seguir.¹³

La maduración *in vitro* no solo genera costos elevados, sino que aún requiere mayores investigaciones para incrementar su eficiencia.¹⁵

El sistema de maduración *in vitro* en humanos se basa en la maduración en medios para cultivo celular que, al momento de usarse, deben suplementarse con una fuente proteica y hormonas (FSH, LH, hCG). La fuente proteica del medio de maduración *in vitro* consiste en adicionar suero de la propia paciente o algún sustituto de proteínas del suero. Se ha demostrado que el suero tiene varias desventajas, tales como su carácter indefinido por el aporte de citoquinas, factores de crecimiento, albúmina y una gran variedad de lípidos, además de ser una fuente de transmisión de agentes infecciosos. Las condiciones de cultivo *in vitro*, la composición del medio y la naturaleza de distintos inductores de la maduración influyen marcadamente en la competencia de los ovocitos para

madurar y en su posterior capacidad de desarrollo, un área de estudio aún en plena expansión.¹⁶

Existiría, entonces, un abanico de posibilidades en los cuales podríamos emplear la técnica de maduración *in vitro*, si lográramos optimizar los recursos y la eficiencia de esta biotécnica. Dada su relación con una potencial viabilidad, poder identificar las pacientes en las cuales es posible llevar a cabo con éxito la maduración *in vitro* ampliaría su aplicación y reduciría costos, además de acortar tiempos de estimulación ovárica.

Conclusiones

Del análisis de los resultados fue posible confirmar que, independientemente de la oleada folicular, a medida que aumenta el número de folículos <14mm, aumenta el número de ovocitos VG recuperados.

La duración de la EOC influye significativamente en la recuperación de ovocitos VG, mostrando que el acortamiento o prolongación de la EOC (< 9 días o >11 días) incrementa la cantidad de ovocitos VG recuperados, pero provenientes de diferentes oleadas.

La recuperación de ovocitos VG de los folículos ≤14mm fue menor en los folículos de la 1ª oleada en comparación con los de la 2ª oleada. No se encontraron diferencias significativas entre el número de ovocitos negativos y positivos para caspasas. Sin embargo, se observó una tendencia a registrar un mayor número de ovocitos VG negativos para caspasas a medida que aumentó el número de folículos de la 2ª oleada.

Con respecto a los ovocitos VG negativos para caspasas (viables) y la maduración en medio de cultivo, un dato relevante fue que no todos los ovocitos son capaces de madurar espontáneamente; esto podría indicar que existen mecanismos que no estarían operando en el ovocito. Esta cohorte ovocitaria podría ser plausible de maduración *in vitro*, permitiendo, de esta manera, obtener un mayor número de ovocitos maduros y viables.

Teniendo en cuenta la necesidad de obtener una mayor cantidad de ovocitos viables, tanto de la 1ª como de la 2ª oleada, deberíamos planificar estrategias. Identificar las oleadas foliculares durante la EOC podría modificar la conducta y los resultados reproductivos.

Referencias

1. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human reproduction* 1986; 1(2): 81-87.
2. Skidmore JA, Adams GP, Billah M. Synchronization of ovarian follicular waves in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Animal reproduction science* 2009; 114(1-3): 249-255.
3. Ferraretti A, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human reproduction* 2011; 26(7): 1616-1624.
4. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertility and sterility* 2003; 80(1): 116-122.
5. Ubaldi FM, Capalbo A, Vaiarelli A, Cimadomo D, Colamaria S, Alviggi C, Rienzi L. Follicular versus luteal phase ovarian stimulation during the same menstrual cycle (DuoStim) in a reduced ovarian reserve population results in a similar euploid blastocyst formation rate: new insight in ovarian reserve exploitation. *Fertility and sterility* 2016; 105(6): 1488-1495.
6. Regan SL, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A. Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle - A Changing View. *Frontiers in endocrinology* 2018; 9: 61.
7. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Hengartner M. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 2009; 16(1): 3.
8. Oosterhuis GJE, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertility and sterility* 1998; 70(4): 747-749.
9. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation* 2015; 22(4): 526.
10. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
11. Thompson JG, Gilchrist RB. Pioneering contributions by Robert Edwards to oocyte in vitro maturation (IVM). *Molecular human reproduction* 2013; 19(12): 794-798.
12. Smits JE, Thompson JG, Gilchrist RB. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. *Seminars in Reproductive Medicine* 2011; 29(1): 24-37.
13. Jurema MW, Nogueira D. Maduración in vitro de ovocitos humanos para reproducción asistida. *Fertil Steril* 2006; 86(4): 1277-1291.
14. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update* 2012; 18(1): 73-91.
15. De Vos M, Smits J, Thompson JG, Gilchrist RB. The definition of IVM is clear—variations need defining. *Human Reproduction* 2016; 31(11): 2411-2415.