

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICA Y
GINECOLOGIA

ANALISIS CRITICO DE LAS ESTRATEGIA PARA LA
PREVENCION Y TRATAMIENTO DE LA BAJA RESPUESTA
EN FECUNDACION IN VITRO

JOSE MARIA RUBIO RUBIO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 de Octubre de 2002 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Pedro de la Fuente Pérez
- Dr. D. Javier Monleón Alegre
- Dr. D. Juan José Parrilla Paricio
- Dr. D. Pedro Ación Alvarez
- Dr. D. Jose Manuel bajo Arenas

Va ser dirigida per:

Prof. Dr. D. Alberto Romeu Sarrió, Dr. D. Miguel Tortajada
Martines i Dra. Dña. Ana Monzó Miralles

©Copyright: Servei de Publicacions
Jose Maria Rubio Rubio

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5718-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Valencia

**ANÁLISIS CRÍTICO DE LAS ESTRATEGIAS
PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO
DE LA BAJA RESPUESTA EN FECUNDACIÓN IN
VITRO**

Memoria que presenta D. José María Rubio Rubio
para optar al grado de Doctor en Medicina

Valencia, junio de 2002

Alberto Romeu Sarrió, Profesor Asociado Asistencial del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia y Jefe de Servicio de Ginecología (Reproducción Humana) del Hospital Universitario La Fe de Valencia

CERTIFICO:

Que D. José María Rubio Rubio, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada "Análisis crítico de las estrategias para la prevención y tratamiento de la baja respuesta en FIV". Dicha memoria está concluida y se considera apta para su exposición y defensa públicas

Valencia, 20 de mayo de 2002


Fdo. D. Alberto Romeu Sarrió

Miguel Tortajada Martínez, Catedrático de Obstetricia y Ginecología del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia y Jefe de Servicio del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICO:

Que D. José María Rubio Rubio, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada "Análisis crítico de las estrategias para la prevención y tratamiento de la baja respuesta en FIV". Dicha memoria está concluida y se considera apta para su exposición y defensa públicas



Valencia, 20 de mayo de 2002

Fdo. D. Miguel Tortajada Martínez

Ana Monzó Miralles, Doctora en Medicina, Médico Adjunto del Servicio de Ginecología-Reproducción del Hospital Maternal La Fe de Valencia

CERTIFICO:

Que D. José María Rubio Rubio, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada "Análisis crítico de las estrategias para la prevención y tratamiento de la baja respuesta en FIV". Dicha memoria está concluida y se considera apta para su exposición y defensa públicas

Valencia, 20 de mayo de 2002

Fdo. D^a Ana Monzó Miralles

A mi mujer Mayte, y a mis hijos, María y Pablo que han sabido darme el mejor apoyo, su amor.

A mi madre y a mi padre porque me han transmitido, desde su humildad, la fuerza de voluntad y constancia necesaria para realizar esta memoria.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a mi formación médica y ginecológica, pero sobre todo a las que han hecho posible que esta memoria que ahora presento se llevara a cabo. En especial,

Al Dr. Alberto Romeú Sarrió, director de esta tesis, que con su idea respecto al presente trabajo supo despertar en mí el interés por la investigación y siempre ha sabido estimularme para seguir adelante. Su capacidad de trabajo y su dirección profesional han sido fundamentales para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Ana Monzó Miralles, directora de esta tesis y compañera de trabajo, que se ha ofrecido en todo momento, con su conocimiento científico y su trabajo asistencial, a prestarme el aliento necesario para el desarrollo de esta memoria.

Al Dr. Miguel Tortajada Martínez, director de esta tesis, cuyo apoyo ha sido fundamental en cada uno de los pasos desarrollados durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Jose Manuel Soler Torró, compañero y buen amigo, que me ha llevado de la mano en el análisis estadístico realizado en el presente trabajo

A la Dra. Trinidad García Gimeno, compañera de trabajo que me ha demostrado su compañerismo y calidad profesional.

Al Dr. Eduardo Cazorla Amorós que ha sabido estimular mi capacidad de trabajo en los momentos más difíciles.

Al Dr. Antonio Abad Carrascosa que ha estado animándome continuamente a desarrollar el presente trabajo.

Al resto de compañeros, ginecólogos y biólogos, del Servicio de Ginecología-Reproducción del Hospital Maternal La Fe, que han estado interesándose en todo momento por el desarrollo de este trabajo.

A todo el equipo de Enfermeras y Auxiliares de clínica del Servicio de Ginecología-Reproducción del Hospital Maternal La Fe que, con su trabajo diario, han sabido darme ejemplo de profesionalidad, base sobre la que se asienta el desarrollo de la actividad clínica valorada en el presente estudio.

ABREVIATURAS

aGnRH – Análogos agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas

BR – Baja Respuesta

CC – Citrato de clomifeno

E2 – Estradiol

FIV – Fecundación In Vitro

FSH3 – Hormona Folículo Estimulante el día 3° del ciclo

FSHp – Hormona Folículo Estimulante pura

FSHr – Hormona Folículo Estimulante recombinante

FSHup – Hormona Folículo Estimulante ultrapura

GH – Hormona de crecimiento

Gn – Gonadotrofinas hipofisarias

GnRH – Hormona liberadora de Gonadotrofinas

hCG – Hormona Gonadotrofina Coriónica

hMG – Hormona Gonadotropina Menopáusica Humana

HOC – Hiperestimulación Ovárica Controlada

ICSI – Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide

IC – Intervalo de confianza

IMC – Índice de Masa Corporal (peso/talla²)

LH3 – Hormona Luteinizante el día 3° del ciclo

P4 – Progesterona

RR – Riesgo relativo

INDICE

JUSTIFICACIÓN -----	1
INTRODUCCIÓN -----	5
1. CONCEPTO DE BAJA RESPUESTA OVÁRICA Y FALLO OVÁRICO OCULTO -----	7
1.1. Prevalencia de Baja Respuesta -----	8
1.2. Concepto de Baja Respuesta -----	9
1.3. Síndrome Fallo Ovárico Oculto -----	12
1.4. Factores de Riesgo de baja respuesta -----	14
2. PRONÓSTICO DE BAJA RÈSPUESTA. EVALUACIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA -----	16
2.1. Fisiología del desarrollo folicular -----	17
2.2. Evolución reserva ovárica a lo largo de la vida reproductiva -----	19
2.3. Evaluación de la reserva ovárica -----	21
2.3.1. Edad-----	22
2.3.2. Determinaciones hormonales basales -----	23
2.3.3. Determinaciones hormonales dinámicas -----	33
2.3.4. Ecografía vaginal-----	39
3. ANÁLISIS DE LOS PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO UTILIZADOS EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA -----	41
3.1. Evolución del uso de gonadotrofinas hipofisarias -----	44
3.2 Aumento de la dosis de gonadotrofinas -----	48
3.3. Combinación de citrato de clomifeno y hMG -----	50
3.4. Regulación con análogos agonistas de la Gn-RH -----	51
3.5. Tratamientos adyuvantes -----	68
MATERIAL Y MÉTODOS -----	77
1. PACIENTES -----	79
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA -----	80
3. CARACTERÍSTICAS DE CADA UNO DE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO-----	81
3.1. Edad de la mujer, IMC, Edad del hombre, Años de esterilidad, Menarquia ----	81
3.2. FSH día 3º ciclo, LH día 3º ciclo, Antecedente de baja respuesta -----	83
3.3. Antecedentes obstétricos -----	85
3.4. Diagnósticos de esterilidad-----	87

4. DIAGNÓSTICO DE ESTERILIDAD-----	88
5. ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA -----	89
6. LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA -----	92
7. CONTROL DE LA FASE LÚTEA Y TRATAMIENTO DE APOYO DE LA MISMA -----	95
8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN -----	96
9. LABORATORIO DE HORMONAS: Determinaciones hormonales-----	96
10. VARIABLES ANALIZADAS EN EL ESTUDIO -----	102
11. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA -----	104
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	104
RESULTADOS -----	107
1. CARACTERÍSTICAS DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA-----	109
1.1. Criterios ecográficos -----	109
1.2. Duración de la estimulación y de la fase lútea -----	110
1.3. Dosis de gonadotrofinas -----	112
1.4. Determinaciones hormonales -----	116
2. DATOS DE LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA-----	123
2.1. Número y estadio de maduración nuclear de los ovocitos -----	123
2.2. Calidad embrionaria-----	127
2.3. Tasas de fecundación en FIV y en ICSI -----	129
3. RESULTADOS DEL CICLO DE ESTIMULACIÓN -----	130
3.1. Tasa de cancelación -----	130
3.2. Tasa de implantación en ciclos con transferencia-----	134
3.3. Tasa de implantación en ciclos con gestación -----	134
3.4. Tasa de gestación-----	136
4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE -----	141
4.1. Análisis multivariante de la tasa de implantación -----	141
4.2. Análisis multivariante de la tasa de gestación -----	142
5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS-----	148

DISCUSIÓN	151
1. CRITERIOS PRONÓSTICO DE BAJA RESPUESTA	157
2. DISCUSIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE LA MUESTRA ESTUDIADA	161
3. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO	163
4. RESULTADOS DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA	170
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183

JUSTIFICACION

El objetivo fundamental del tratamiento de la esterilidad mediante la aplicación de técnicas de reproducción asistida es conseguir el nacimiento de un niño sano, con la máxima eficiencia y con los mínimos riesgos y efectos secundarios. De hecho, la Ley de Reproducción asistida especifica que el ginecólogo velará por la salud de la madre y del nasciturus.

Este objetivo lleva implícito conseguir un adecuado desarrollo folicular –para ello lo más frecuente, en la actualidad, es estimular aquél con gonadotrofinas bajo supresión hipofisaria con análogos de la GnRH– sin que se produzca un síndrome de hiperestimulación ovárica.

No es inusual que la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) para fecundación in vitro (FIV) no proporcione los resultados deseables, observándose:

- Durante la estimulación
 - Escaso crecimiento y desarrollo folicular, que puede llevar a la cancelación del tratamiento
 - Escaso nivel de estradiol sérico, en relación con lo anterior o no; si hay un número suficiente de folículos, el tratamiento no suele cancelarse pero el pronóstico es malo, en términos de posibilidades de embarazo.
 - Mala preparación endometrial, en relación con los bajos niveles de estradiol que tampoco suele conducir a la cancelación del tratamiento.
- Durante la punción
 - obtención de escaso número de ovocitos, lo que supone un mal pronóstico
- Tras la punción
 - escaso número de embriones para transferir, lo que conlleva un mal pronóstico

Sin que exista una definición inequívoca, esta situación se conoce con el apelativo de “baja respuesta”, que conlleva un aumento del porcentaje de ciclos cancelados y una disminución de la tasa de gestación evolutiva. La baja respuesta a la estimulación ovárica ha sido considerada como uno de los desafíos más importantes

para el ginecólogo que dirige las estimulaciones en un programa de reproducción asistida.

La cancelación del tratamiento (interrupción de la administración de gonadotrofinas y suspensión de la punción folicular) se produce cada vez que el escaso desarrollo folicular no justifica la punción porque las probabilidades de que se produzca una gestación son excesivamente bajas. En esta situación, seguir adelante con el tratamiento supondría un incremento del estrés de los pacientes y excesivos costes laborales y, en definitiva, económicos, personales o sociales.

Es obvio que, entre los objetivos del clínico, está el de reducir todo lo posible la tasa de cancelación. Para ello, en el aspecto que nos ocupa, se hace necesario identificar a las parejas susceptibles de desarrollar una baja respuesta, es decir pronosticar este riesgo. Ello permitiría orientar cada uno de estos casos de forma individualizada, indicando un tratamiento específico para la estimulación ovárica e, informando sobre las posibilidades de embarazo y recomendando quizá la donación de ovocitos o la adopción.

El tratamiento específico a que se alude (y que será comentado más tarde) deberá estar basado en los conocimientos de la fisiopatología ovárica y en la experiencia adquirida en el manejo de la estimulación.

No existe acuerdo unánime entre los distintos autores acerca de la definición de baja respuesta, como tampoco lo existe acerca de los elementos que pueden ser útiles para establecer el pronóstico. Estos aspectos serán tratados a lo largo de este trabajo.

Tampoco se ha demostrado, hasta la fecha, que un determinado protocolo de estimulación sea el más indicado para las pacientes con riesgo de mala respuesta. Ello se debe, fundamentalmente, a que la baja respuesta se diagnostica retrospectivamente, al término de la estimulación y siendo numerosos los factores que pueden causarla, son escasos los estudios prospectivos y randomizados que permitan extraer conclusiones válidas.

Si, en general, la baja respuesta puede ser asociada a la escasa reserva folicular ovárica, no siempre es así y pacientes con reserva ovárica normal pueden, circunstancialmente, desarrollar una baja respuesta. En otras palabras, probablemente todas las mujeres con escasa reserva ovárica hacen una baja respuesta a las

gonadotrofinas pero no todas aquéllas que la hacen presentan escasa reserva ovárica. Estos aspectos serán discutidos más tarde.

Una particular situación de riesgo de baja respuesta es la que fue definida como “fallo ovárico oculto”, a la que nuestro grupo dedicó ya un estudio. Este concepto agrupa a las mujeres que presentan ciclos ovulatorios normales aunque ligeramente acortados, esterilidad y ligera elevación de los niveles circulantes de FSH. Por esta razón, se ha relacionado el fallo ovárico oculto con una disminución de la reserva ovárica.

No obstante, la tasa de cancelación por baja respuesta en mujeres que no presentan niveles elevados de FSH puede no ser despreciable, en función del número de folículos con que un equipo de trabajo indica la cancelación.

Por otra parte, si al establecer el pronóstico de baja respuesta se comete un error y se indica una estimulación con elevada dosis de gonadotrofinas a una mujer normal, se corre el riesgo de provocar una hiperestimulación ovárica, cosa que tampoco es deseable.

Todos los autores que han tratado el tema han insistido en la necesidad de que se desarrollen estudios prospectivos y randomizados destinados a determinar el o los más idóneos métodos de diagnóstico y protocolos de tratamiento para el tipo de pacientes que nos ocupa.

El presente estudio ha sido desarrollado teniendo como punto de partida un estudio previo dedicado al fallo ovárico oculto y con el objetivo de evaluar la eficacia de distintos protocolos de estimulación ovárica con gonadotrofinas para la práctica de fecundación in vitro en mujeres en las que, por distintas razones que serán justificadas, se ha establecido el pronóstico de baja respuesta.

Al margen de ello, los objetivos secundarios fueron:

- determinar la fiabilidad del pronóstico de baja respuesta establecido en función de:
 - edad igual o superior a 40 años
 - baja respuesta previa
 - diagnóstico de fallo ovárico oculto

- determinar la tasa de cancelación por baja respuesta en las mujeres estimuladas con protocolo convencional durante el mismo periodo. Esta determina el error pronóstico por la existencia de una causa de baja respuesta diferente a las arriba señaladas.
- determinar la tasa de hiperestimulaciones ováricas en el grupo de mujeres en las que se estableció el pronóstico de baja respuesta. Esta determina el error pronóstico, puesto que serviría para detectar mujeres con reactividad ovárica normal, que hiperestimulan al ser tratadas con protocolos diseñados para mujeres en las que se espera una baja reactividad ovárica al tratamiento gonadotropo.

INTRODUCCION

1. CONCEPTO DE BAJA RESPUESTA Y FALLO OVÁRICO OCULTO

1.1. PREVALENCIA DE BAJA RESPUESTA

El concepto de **baja respuesta** se deriva de la práctica de hiperestimulaciones ováricas controladas para fecundación in vitro y nace de la observación de que determinadas mujeres desarrollan un número significativamente bajo de folículos ováricos como consecuencia de la estimulación y, en general, presentan niveles circulantes de estradiol bajos y su tasa de gestación como consecuencia de la FIV es significativamente baja.

El concepto de fallo ovárico oculto, definido por Cameron y cols [1], también se deriva de la práctica de la FIV, aunque se trata de la descripción original de un grupo de pacientes identificable en función de determinados aspectos de la fisiopatología del ovario que luego serán comentados. Estas mujeres también se caracterizan por desarrollar respuestas inadecuadamente bajas a las gonadotrofinas.

Por lo tanto, esta particular situación, absolutamente indeseable, tan sólo puede afectar a las mujeres que, padeciendo esterilidad, requieren una fecundación in vitro como tratamiento de la misma.

No resulta fácil establecer la **prevalencia** de la esterilidad en la especie humana; esta dificultad ha sido señalada por cuantos autores han tratado el tema. No obstante, puede cifrarse entre el 10% señalado por Botella y cols [2], quienes la definieron como la ausencia de gestación después de 28 meses de vida conyugal regular y el 15% aceptado por Tietze [3], autor citado por Balin [4]. Más recientemente, Mosher y col [5], definiendo la infertilidad como la incapacidad para gestar después de 12 meses de coitos no protegidos, le asignaron una prevalencia del 10%.

La esterilidad es la falta de fecundidad pero ésta tampoco es fácilmente evaluable y ni siquiera es la misma a lo largo de la vida, sin hacer mención a la esterilidad fisiológica, aceptada para hombres y mujeres.

En concreto, algunos estudios han puesto de manifiesto que la fecundidad de la mujer experimenta una disminución en relación con el aumento de la edad.

En un estudio epidemiológico llevado a cabo en Francia por la Federación de CECOS (centros de conservación de semen) se observó [6] que la tasa acumulativa de gestación después de 12 ciclos de inseminación con semen de donante fue:

- 74% en mujeres de edad inferior a 30 años

- 61% en mujeres de 30 a 34 años
- 54% en mujeres de 35 o más años

Otros autores han confirmado la disminución con la edad de la fecundidad de la mujer: así, el de Virro y cols [7], en el que se analiza el resultado de 404 ciclos de inseminación artificial heteróloga en los que se produjeron 242 gestaciones.

Un interesante estudio de la fecundidad natural fue llevado a cabo por Tietze [8] entre los Hutteritas norteamericanos, observándose que se produce una clara disminución de la fecundidad hacia la mitad de la cuarta década de la vida, aunque el 50% de las mujeres conciben después de los 40 años.

Observaciones semejantes fueron comunicadas por otros autores [9, 10]. Los primeros señalaron que la probabilidad de gestar se deriva de a) la probabilidad de que se produzca la ovulación, b) la probabilidad de que el espermatozoide fecunde al óvulo y c) la probabilidad de que el cigoto sea viable.

1.2. CONCEPTO DE BAJA RESPUESTA

La esterilidad, a partir de los datos expuestos, afecta a una parte importante de la población y al menos el 50% de las parejas estériles, en la experiencia del Hospital U. La Fe, requieren la FIV como forma de tratamiento.

Esto quiere decir que la baja respuesta puede ser considerada un problema numéricamente relevante y que, consecuentemente, deben ser dedicados esfuerzos a su resolución.

De cualquier forma, la baja respuesta es un motivo de preocupación para los equipos de trabajo que practican la fecundación in vitro porque, de forma imprevista, causan una frustración tanto al clínico como a la paciente y obligan a la cancelación del tratamiento o a asumir la posibilidad más que razonable de obtener un mal resultado.

Por lo que respecta a la paciente, ésta debe asumir que la capacidad funcional de sus ovarios está limitada y que su "edad reproductiva" no se corresponde con su edad cronológica o con su salud percibida, lo cual es difícil de aceptar. De cualquier forma, esta situación se vive como una frustración y, por otra parte, hace que se considere que el tiempo, el esfuerzo y, quizá, el dinero invertido en el diagnóstico y el tratamiento de la esterilidad no han servido para nada.

Ya ha sido señalado que no existe una definición unánime de baja respuesta a la estimulación gonadotropa. En general, distintos autores dan sus propias definiciones que, en el fondo, vienen a individualizar un tipo de paciente: aquella que desarrolla escasos folículos y presenta un mal pronóstico en términos de tasa de embarazo.

Hofmann y cols [11] definieron en el año 1989 la baja respuesta como la desarrollada por aquellas pacientes que, estimuladas con gonadotrofinas, desarrollan menos de 4 folículos maduros o presentan niveles de estradiol inferiores a 400 pg/mL en el día en que la administración de hCG debería producirse.

Una definición más estricta fue la señalada por Ben-Rafael y cols [12], para quienes la baja respuesta se definiría como el desarrollo de menos de 3 folículos, niveles de estradiol inferiores a 300 pg/mL y la presencia de picos prematuros de LH. Obviamente, esta definición corresponde a pacientes estimuladas sin la administración previa o concomitante de análogos agonistas de GnRH.

Tras analizar 880 ciclos en función del protocolo de estimulación utilizado, de la respuesta ovárica (niveles de estradiol y número de folículos desarrollados) y del número de ovocitos obtenidos tras la punción Dor y cols [13] observaron que las pacientes en que se obtiene menos de 3 ovocitos muestran menor tasa de gestación que mujeres con mayor número de ovocitos en la punción (10,8% vs 23,8%. El desarrollo posterior de sus observaciones llevó a este mismo autor [14] a la definición de baja respuesta como aquella en que los niveles de estradiol no superan los 500 pg/mL, se desarrollan menos de 4 folículos o se obtienen menos de 3 ovocitos.

Mettler y cols [15] insistieron en el XV Congreso Mundial sobre Fertilidad y Esterilidad (Montpellier, 1995) en que el éxito del tratamiento en la mujer que hace una mala respuesta a las gonadotrofinas es un problema perenne. Considerando como baja respuesta aquella en la que el nivel circulante de estradiol no alcanza los 1000 pg/mL o en la que se observa el desarrollo de menos de 3 folículos, estos autores la observaron en el 19% de los ciclos.

Scott y cols [16] coincidieron con Ben-Rafael [12] en señalar como baja respuesta aquella en la que se desarrollan menos de tres folículos; sin embargo, el nivel que determina la baja respuesta fue superior (500 pg/mL) que el señalado por aquel autor (300 pg/mL). Estos autores afirmaron que la prevalencia de la baja respuesta, así

definida es del 18% y que refleja un declive en la capacidad reproductiva de la mujer, que puede considerarse fisiológico cuando la mujer alcanza cierta edad.

Faber y cols [17], del grupo de Norfolk, definieron la baja respuesta como aquella en la que el nivel circulante de estradiol no alcanza 600 pg/mL el día en que, por el tamaño folicular, se debe administrar hCG. Para estos autores, las mujeres cuyo nivel basal de FSH es igual o mayor a 9 UI/L presentan un mayor riesgo de desarrollar una baja respuesta.

En nuestro país, Barri y cols [18] definieron la baja respuesta como la observada en aquellos casos en los que el nivel circulante de estradiol en el día en que se administra la hCG es menor de 1000 pg/mL y en los que no se obtienen más de 3 ovocitos en la punción folicular. Como consecuencia de la variabilidad observada entre distintos ciclos, estos autores especificaron que, para considerar baja respondedora a una mujer, debe haber mostrado una baja respuesta en dos ocasiones. Describieron, además, tres tipos de mujeres con baja respuesta:

- mujeres jóvenes, con nivel de FSH normal y baja respuesta en ciclos previos
- mujeres jóvenes, con nivel de FSH normal y alteraciones endocrinas
- mujeres de edad más avanzada con signos endocrinos que sugieren una disminución de la reserva ovárica.

En 1999, Dirnfeld y cols [19] llevaron a cabo un estudio en el que consideraron como mujeres con riesgo de desarrollar una baja respuesta aquellas que habían mostrado una baja respuesta en un ciclo de estimulación previo o que presentaban un nivel circulante basal de FSH mayor de 9 UI/L.

Debe insistirse en que la definición de baja respuesta es retrospectiva en la mayor parte de estudios en los que se plantea. Es decir, a partir de una serie de mujeres a las que se practica una fecundación in vitro, se identifican aquellas en las que el resultado de la estimulación fue poco satisfactorio y en las que la gestación fue poco menos que casual o no se produjo. Retrospectivamente se analiza el número de ovocitos obtenidos o de folículos desarrollados o el nivel de FSH basal y, en función de estos resultados, se define el grupo de mujeres con mala respuesta.

Si no existe acuerdo unánime en cuanto a la definición de baja respuesta, si existe acuerdo en cuanto a las consecuencias de la misma: elevada tasa de cancelación y baja tasa de gestación.

1.3. SÍNDROME DE FALLO OVÁRICO OCULTO

Un aspecto particular de la baja respuesta ovárica a las gonadotrofinas es el “síndrome de fallo ovárico oculto”.

La primera publicación aparecida en relación con este síndrome fue la de Cameron y cols [1], en 1988.

Citando una referencia de Georgeanna S. Jones, estos autores señalaron que hasta un 20% de ciclos estimulados con gonadotrofinas para fecundación in vitro tienen que ser cancelados debido a una inadecuada respuesta, en términos de niveles de estradiol o de número de folículos desarrollados; como consecuencia, decidieron llevar a cabo un estudio prospectivo para caracterizar las bases endocrinas de la foliculogénesis anormal en ciclos estimulados para fecundación in vitro.

Para ello, en una muestra de mujeres afectas de esterilidad que presentaban ciclos menstruales espontáneos normales fue valorado el perfil hormonal (FSH, LH, E₂, P₄, Inhibina) y se determinó el nivel de diversos anticuerpo (tiroides, ovario y suprarrenal). De estas mujeres, 131 desarrollaron una foliculogénesis alterada al ser estimuladas.

A partir de esta población definió el rango normal de FSH basal como el situado por debajo del percentil 90 e identificaron a 14 mujeres en las que el nivel de FSH basal circulante fue superior al rango normal.

Como conclusión a su estudio ellos situaron el límite alto normal para FSH en 11,3 UI/L y definieron el síndrome del fallo ovárico oculto como la situación caracterizada por infertilidad, ciclo regular y elevación del nivel circulante de FSH.

Relacionaron este síndrome con la menopausia precoz –sugiriendo que podría tratarse de un primer estadio evolutivo de aquélla– y con la presencia de anticuerpos anti-ovario porque éstos estuvieron presentes en el 50% de los casos.

En el Hospital Universitario La Fe fue llevado a cabo en el año 2000 un estudio a propósito del fallo ovárico oculto [20]. Para determinar el nivel alto normal de FSH en el día 3 del ciclo (nivel basal) se valoró éste en 36 mujeres de función ovárica normal

que gestaron tras inseminación intrauterina con semen de donante en su primer ciclo de tratamiento. De esta forma, se estimó que un nivel basal circulante de FSH superior a 8,5 UI/L debía ser considerado elevado, como consecuencia de una disminución de la reserva ovárica.

Con este dintel de FSH fueron analizados 667 ciclos estimulados con gonadotrofinas para FIV, entre los que fueron identificados 117 ciclos estimulados a mujeres de $33,63 \pm 3,33$ años cuyo nivel basal de FSH fue mayor de 8,5 UI/L.

Las mujeres que presentaron un nivel basal elevado de FSH se caracterizaron por haber desarrollado la menarquia a una edad significativamente menor y por presentar ciclos menstruales de duración significativamente menor que las mujeres de FSH basal normal.

La **tasa de cancelación** del tratamiento fue significativamente mayor (39,3%, de las que el 33,3% por falta de respuesta ovárica) en las mujeres con nivel basal elevado de FSH.

Las **tasas de gestación** por ciclo iniciado, por punción y por transferencia en los ciclos estimulados a mujeres con nivel basal de FSH elevado fueron, respectivamente, 11,1%, 18,3% y 23,6%.

La prevalencia de fallo ovárico oculto en los ciclos considerados fue de 17,5%; ésta se elevó a 20% en los ciclos estimulados a mujeres con 40 años cumplidos. Estas cifras son acordes con las presentadas por otros autores [1, 21].

Particularmente interesante fue el estudio llevado a cabo por Scott y cols [21]. Estos autores valoraron la reserva ovárica en 236 pacientes no seleccionadas, mediante un test de estímulo con citrato de clomifeno. Identificaron así un grupo de mujeres con escasa reserva ovárica, cuya prevalencia fue de 3% en las menores de 30 años, de 7% en las mujeres de 30 a 34 años, de 10% en las mujeres de 35 a 39 años y de 26% en las mujeres de 40 o más años.

Por otra parte, en este estudio se puso de manifiesto que la prevalencia del fallo ovárico oculto así detectado se asocia especialmente a la esterilidad idiopática (52,2% versus 1% en las mujeres de reserva ovárica normal).

Además, en concordancia con lo observado por Romeu [20], la tasa de embarazo en las mujeres con escasa reserva ovárica fue llamativamente baja (9% versus 43% en las mujeres con test de clomifeno normal).

Los criterios de cancelación del tratamiento varían de unos equipos de trabajo a otros y se ven, verosímilmente condicionados por el medio. En principio, cuanto mayor calidad tiene un equipo clínico de trabajo menor es la necesidad de cancelar tratamientos y cuanto mayor es la calidad del laboratorio de FIV menos estrictos son los criterios de cancelación; por otra parte, la tasa de cancelación suele ser claramente menor en los centros privados que en los centros públicos, más sujetos estos últimos a la frialdad de un protocolo de trabajo que puede ser más conservador y más influenciados aquellos por la opinión de la paciente.

Por otra parte, los criterios de cancelación se modifican con el tiempo en los distintos grupos de trabajo. La experiencia del Hospital U. La Fe en este campo es la siguiente:

- Tasa de cancelación en 1999: 11,89%
- Tasa de cancelación en 2000: 13,87%
- Tasa de cancelación en 2001: 13,30%
- Tasa de cancelación en 2002: 8,81%

Por ejemplo, el grupo de Norfolk, señaló que el tratamiento era cancelado, en relación con una mala respuesta a la estimulación, que, a la sazón, se hacía con FSH purificada o con una asociación de ésta y hMG sin asociar agonistas de GnRH, cuando el nivel circulante de estradiol era inferior a 100 pg/mL después de 5 días de estimulación o cuando, en el curso de la estimulación, el nivel circulante de estradiol disminuía durante dos días consecutivos [22]. La tasa de cancelación global de este grupo de trabajo era, en aquella época, de 16%.

La tasa de cancelación por baja respuesta fue cifrada por Ben-Rafael [23] y por Scott [16] en el 12 y 30 %.

1.4. FACTORES DE RIESGO DE BAJA RESPUESTA

Ha sido afirmado que la baja respuesta puede ser debida a diversas causas o factores de riesgo cuya presencia puede servir para detectar el riesgo de que aquella se produzca. Barri y cols [18] y Ben-Rafael y cols [23] señalaron las siguientes:

- edad reproductiva avanzada
- historia familiar de fallo ovárico prematuro
- antecedentes personales de cirugía sobre los anexos
- endometriosis
- obesidad
- infertilidad idiopática
- consumo de tabaco

Por su parte, Mettler y cols [15] señalaron:

- edad reproductiva avanzada
- presencia de anticuerpos contra órganos endocrinos
- fallo ovárico prematuro, latente o no
- alteraciones anatómicas, como adherencias, pelvis congelada
- obesidad
- consumo de tabaco

Todo lo expuesto permite poner de manifiesto:

- la elevada incidencia de la baja respuesta, vinculada o no a la situación de fallo ovárico oculto.
- La relación del fallo ovárico oculto con la edad de la mujer
- La importancia clínica de estos dos trastornos y la trascendencia de los mismos en relación con los resultados finales de la fecundación in vitro.
- Se justifica, en consecuencia, tanto los esfuerzos dedicados al diagnóstico y pronóstico de la situación de riesgo para desarrollar una baja respuesta como a los intentos de desarrollar protocolos de estimulación específicos para forzar el desarrollo folicular adecuado para la FIV en las mujeres en las que se ha detectado el riesgo de baja respuesta.

**2. PRONOSTICO DE BAJA RESPUESTA.
EVALUACION DE LA RESERVA
OVARICA**

En distintas ocasiones a lo largo de esta introducción se ha señalado que en un programa de reproducción asistida es crucial identificar a las mujeres con riesgo de desarrollar una baja respuesta al estímulo, con objeto de darles el tratamiento estimulador más apropiado para evitar este desenlace, vinculado a la cancelación y al mal pronóstico en términos de posibilidades de gestación. El tratamiento destinado a mejorar la respuesta debe ser utilizado desde el inicio, durante el periodo de reclutamiento, puesto que fue evidenciado que cambios en el curso del mismo, cuando ya se hizo el reclutamiento folicular, resultan inefectivos [24]. Ello obliga a establecer un pronóstico e iniciar la estimulación en consecuencia, lo que puede conducir a errores, tanto por defecto (bajas respuestas no identificadas previamente al inicio de la estimulación) como por exceso (mujeres supuestas de baja respuesta que responden normalmente).

Parece obvio que la identificación de las mujeres de baja respuesta debe estar basada en el conocimiento de la fisiología del ovario.

2.1 FISIOLÓGÍA DEL DESARROLLO FOLICULAR

Parece bien establecido que las relaciones entre el folículo ovárico y la célula gonadotropa hipofisaria se establecen una vez que el folículo ha alcanzado la fase antral de su desarrollo.

Antes de esta fase, el desarrollo folicular es independiente de las gonadotrofinas, como se demuestra por el hecho de que la hipofisectomía experimental no impide el desarrollo de folículos preantrales [25] y por la presencia de éstos en los ovarios de fetos anencéfalos [26].

Ha sido demostrado mediante PCR en fragmentos de ovario obtenidos de cesáreas que, en la especie humana, los folículos primordiales no expresan receptores a FSH, que lo hacen en el 33% de los folículos primarios y en el 100 % de aquellos que presentan múltiples capas de células de la granulosa [27].

Durante la época de desarrollo **preantral** distintos factores de crecimiento podrían jugar un papel regulador o estimulador:

- Algunos autores [28] afirmaron que la activina y no la FSH es, en esta época el factor de crecimiento más importante. Erickson y cols [29] inyectaron activina a la rata durante tres días y observaron que se

producía un aumento de estradiol y que numerosos folículos alcanzaban el estadio de folículo preovulatorio, sin observarse un aumento de FSH; concluyeron que la administración de activina A a ratas adultas cíclicas conduce a la superovulación. Otros autores también han defendido este papel para la activina [30, 31].

- Sin embargo, se ha considerado por otros investigadores que, si la activina ejerce un papel estimulante sobre folículos antrales, el resultado podría ser deletéreo [32]
- Recientemente ha sido evidenciado que el Keratin Growth Factor (KGF), producido por las células de la teca, estimula el desarrollo preantral del folículo ejerciendo un papel antiapoptótico en una acción que se potencia por la FSH [27, 33].
- También en fecha reciente ha sido evidenciado que el propio ovocito juega un papel determinante en este proceso. Dong y cols [34] evidenciaron la producción de Growth Differentiation Factor-9, un miembro de la familia del TGF β ; comprobaron que el RNAm de éste sólo se encuentra en el ovocito y que la acción se expresa en las células granulosas.

Otras investigaciones han permitido corroborar el papel del GDF-9 [35-38].

Parece pues evidente que el desarrollo de los folículos preantrales está controlado por factores de crecimiento y diferenciación que se producen en el propio folículo y que su producción es independiente de la FSH que se libera o no en la hipófisis.

El desarrollo de folículos preantrales implica, además, que no se desencadenen fenómenos apoptóticos en el ovocito. Para ello es necesaria la expresión del gen bcl-2; la expresión de otros genes, como el gen Bax, conduce a la apoptosis del ovocito y a la atresia folicular [39, 40].

En resumen, respecto al fenómeno de la apoptosis como factor de depleción de folículos preantrales, parece poder afirmarse que, cuando se produce, se trata de un proceso iniciado en el ovocito. La apoptosis es poco frecuente en los folículos preantrales; sin embargo, es el destino de todo folículo antral que no alcanza la madurez, es decir, de más del 99% de los folículos antrales.

A diferencia de lo señalado para el folículo preantral, la acción de la FSH pasa a ser el estímulo de desarrollo más importante para los **folículos antrales**. Esta hormona confiere a las células granulosas la posibilidad de alcanzar su fenotipo maduro y, simultáneamente, la de desarrollar la apoptosis y, como consecuencia, la atresia folicular.

Zelevnik y cols [41] evidenciaron la presencia de una endonucleasa $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ dependiente en las células granulosas maduras, probablemente la desoxirribonucleasa. La presencia de esta enzima confiere a las células granulosas la posibilidad de morir por apoptosis, a menos que se evite su activación y, como consecuencia, la fragmentación del DNA [42, 43].

El más importante de los factores antiapoptóticos conocidos para el folículo antral es la FSH [44, 45], cuyos niveles se elevan, al final de cada fase lútea, como consecuencia de la disminución de los niveles de estradiol e inhibina. Cuando el nivel circulante de FSH alcanza el dintel de FSH [46, 47], una cohorte de folículos antrales pequeños es rescatada de la apoptosis e inicia su crecimiento y maduración: se produce la multiplicación de las células granulosas y, como consecuencia, el aumento de los niveles circulantes de estradiol e inhibina; este incremento conlleva una disminución de los niveles circulantes de FSH, lo que conduce a la selección del folículo dominante y a la atresia de los restantes folículos en desarrollo en ese momento.

Estos fenómenos se deben a que la acción de la FSH sobre el folículo ha conferido a las células granulosas su fenotipo maduro, haciéndolas FSH-dependientes. A medida que disminuye el nivel de FSH, en la fase folicular avanzada, sólo el folículo mejor vascularizado y mejor dotado de receptores a FSH es capaz de mantener su desarrollo hasta la maduración completa; las células granulosas de los restantes, FSH-dependientes pero privadas de esta hormona desarrollan fenómenos apoptóticos que conducen a la atresia folicular.

2.2. Evolución de la reserva ovárica a lo largo de la vida reproductiva

Desde el inicio de la madurez hasta el inicio de la época climatérica, que suele producirse en la segunda mitad de la cuarta década de la vida, en la mujer normal, los ciclos menstruales son estables, ovulatorios y de duración constante.

Al inicio de la etapa perimenopausica se produce un acortamiento del ciclo menstrual, a expensas de un acortamiento de la fase folicular, hasta que desaparece la menstruación, llegada la menopausia. La disminución de la fase folicular del ciclo (y con ella del ciclo menstrual) se debe a un aumento de los niveles de FSH, como consecuencia de la disminución de los niveles de estradiol e inhibina [48, 49].

A medida que la edad de la mujer avanza, el contenido de folículos en el ovario (reserva ovárica) y la calidad de los mismos disminuye. Esta disminución tiene como consecuencia que los niveles circulantes de inhibina B sean menores, lo que se traduce en que se produzca un aumento de los niveles de FSH –y, secundariamente, de estradiol– en los días iniciales del ciclo [50-53]. La fase folicular se acorta y, con ella, el ciclo menstrual. Esta situación favorece la aparición de picos prematuros de LH y ovulación o luteinización precoz [18].

El tamaño de la cohorte folicular que inicia su desarrollo en cada ciclo menstrual no depende tanto del nivel de FSH como del número de folículos disponibles en el ovario en el momento en que el nivel circulante de FSH sobrepasa el dintel de sensibilidad [54].

Sherman y cols [49] estudiaron un grupo de mujeres perimenopausicas con determinaciones diarias a lo largo de un ciclo menstrual de hormonas ováricas (estradiol y progesterona) e hipofisarias (FSH y LH).

Se ha comprobado que, con el paso del tiempo, desde el comienzo de la vida fetal hasta la menopausia, se produce una constante y progresiva disminución del número de folículos primarios, lo que se traduce en una disminución de los niveles de estradiol e inhibina y, como consecuencia, un aumento de FSH. En otras palabras, durante una época de la vida de duración variable que precede a la menopausia, coexisten niveles normales de estradiol y niveles ligeramente elevados de FSH, que son los causantes del mantenimiento del ciclo menstrual a expensas de un acortamiento del mismo y de una depleción exagerada de folículos.

También fue afirmado que la elevación monotrópica de FSH puede conducir a la regulación a la baja de los receptores de esta hormona a nivel de las células granulosas y ser la causa de la baja respuesta ante el estímulo [55].

El conocimiento de estas relaciones hormonales permite que la determinación de los niveles circulantes de las distintas hormonas sea útil para valorar la reserva folicular ovárica y para establecer un pronóstico sobre la capacidad reproductiva.

2.3. Evaluación de la reserva ovárica

Podría afirmarse que, en la práctica clínica, se hace necesario evaluar la reserva ovárica en todas las mujeres que van a ser tratadas mediante fecundación in vitro y esta afirmación estaría justificada por la frecuencia con que se observa una baja respuesta, por la frustración a que ésta conduce y por el costo de la cancelación del tratamiento o de los malos resultados del mismo.

Esta afirmación resulta más válida en una sociedad cuya evolución demográfica pone claramente de manifiesto que, cada vez, se retrasa más la reproducción y esto tiene como consecuencia un incremento en la edad de las mujeres que demandan un tratamiento mediante fecundación in vitro.

Sin embargo, la consideración de los costos del proceso diagnóstico de la esterilidad, la duración de este proceso, la falta de rigor de los distintos métodos diagnósticos propuestos, el costo adicional de los mismo y otro tipo de dificultades (geográficas, por ejemplo) llevan a pensar dónde está el límite de los procedimientos diagnósticos y a tener que dilucidar cuál o cuáles son los métodos diagnósticos que deben ser aplicados y cómo debe ser seleccionada la población a la que aplicarlos.

Parece, no obstante, razonable afirmar que el protocolo (sea cual sea) para la evaluación de la fecundidad se ponga en práctica ante toda mujer de edad superior a 35 años que requiere la fecundación in vitro porque es a partir de esa edad cuando se observa una disminución relevante de la capacidad reproductiva como consecuencia de la disminución de la reserva ovárica [16, 21].

A lo largo del presente epígrafe serán analizados los distintos métodos propuestos por diversos autores para evaluar la reserva ovárica o, lo que es lo mismo, establecer un pronóstico sobre la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas.

2.3.1. Edad

El potencial reproductivo de una mujer, definido como la capacidad para concebir en ausencia de alteraciones en su sistema reproductor, disminuye con la edad y, por lo tanto, el aumento de ésta favorece el aumento de la infertilidad [5, 10].

El porcentaje de mujeres incapaces de concebir aumenta de un 6% en menores de 25 años a un 43 % entre los 36 y 40 años [7], lo cual demuestra la relación clara con la edad.

Penzia y cols [56] desarrollaron un estudio en el que incluyeron 73 casos de transferencia intratubárica de gametos en pacientes mayores de 40 años; el resultado fue una tasa de gestación de 9,6% por transferencia, la cual es menor que la de pacientes menores de 40 años. Concluyeron que, en pacientes mayores de 40 años, debido a la disminución de su fecundidad, deben plantearse técnicas de reproducción asistida personalizadas, conociendo las limitaciones de las mismas por la edad de las pacientes.

Existen evidencias que permiten afirmar que los cambios relacionados con la edad del potencial reproductivo están relacionados con la capacidad funcional del ovario y con la calidad de ovocitos y embriones, como se evidencia en los programas de donación de ovocitos, en los que se obtienen elevadas tasas de gestación independientemente de la edad [57, 58].

Estas observaciones sugieren una disminución de la reserva ovárica (disminución del número de folículos desarrollados y disminución del número de ovocitos obtenidos en la punción) en ciclos de tratamiento para FIV [56] relacionada con la edad. Como consecuencia, aumentan las tasas de cancelación, la calidad biológica de los ovocitos y de los embriones es menor y se produce una disminución en la tasa de fecundación, de implantación y de gestación [59-61].

Levi y cols [62] definieron la reserva ovárica disminuida como la de aquellas pacientes con nivel circulante de FSH basal igual o superior a 14 UI/L, valorando 9800 ciclos de tratamiento; observaron que sólo el 2,7% de las pacientes con reserva ovárica disminuida gestaron tras FIV y, de las que gestaron, el 71,4% abortaron. La distribución por edad de los abortos acontecidos en el 1º trimestre de la gestación fue: del 57,1% en pacientes menores de 35 años, del 63,5% en pacientes entre 35 y 40 años y del 90% en pacientes mayores de 40 años. Concluyeron que la disminución de la reserva ovárica implica dificultad en la concepción y supone un aumento en el número de abortos.

En su día se produjo un intenso debate sobre si la disminución de la fertilidad femenina relacionada con la edad es debida, fundamentalmente, a la escasa calidad de los ovocitos y embriones o a la disminución de la capacidad del útero de sostener una adecuada implantación embrionaria.

Navot y cols [58] desarrollaron un estudio en el que se valoró el resultado de la donación de ovocitos procedentes de pacientes jóvenes (30 ± 4 años) a pacientes de edad inferior a 40 años y a pacientes mayores de 40 años. Tanto las mujeres de un grupo de receptoras como las del otro habían sido diagnosticadas de fallo ovárico por niveles de FSH > 25 UI/L. Se controló las variaciones posibles en la calidad de los ovocitos transfiriendo ovocitos procedentes de la estimulación de una donante a una receptora “joven” (edad < 40 años) y a una receptora “mayor” (edad > 40 años). No fueron observadas diferencias en la tasa de gestación entre ambos grupos y se obtuvo una menor tasa de abortos que en pacientes de la misma edad en las que se utilizaron sus propios ovocitos. Concluyeron que la capacidad para concebir y llevar una gestación a término, cuando la calidad de los óvocitos está controlada, es independiente de la edad del útero en pacientes en la 5ª década de vida.

Otros autores [63] habían reflejado que el empeoramiento con la edad del factor endometrial contribuye de manera decisiva a la disminución de la tasa de gestación, refiriendo entre otras causas: alteraciones en la perfusión vascular del endometrio por arteriosclerosis, variaciones en el colágeno endometrial, etc.

Con el aumento en la edad de la paciente, se produce una disminución en el número de folículos reclutados y de los ovocitos obtenidos y una disminución en la calidad de los ovocitos, haciéndose más frecuentes las alteraciones cromosómicas de los mismos (delecciones, no-disyunciones meióticas..) [64-66].

2.3.2. Determinaciones hormonales basales.

I. Esteroides sexuales

Puede afirmarse sin reservas que la disminución de la reserva ovárica está relacionada con la actividad endocrina del ovario [67]. Sin embargo la información recogida de diversos autores ofrece opiniones contradictorias.

Lee y cols [68], determinando E_2 y progesterona en voluntarias de edad comprendida entre 30 y 50 años y ciclos menstruales normales, no evidenciaron diferencias en los niveles de E_2 y P_4 , concluyendo que la determinación de los niveles

de esteroides sexuales no proporcionaba ningún valor añadido para la valoración del potencial reproductivo de la mujer, aunque otros autores, en estudios posteriores, han señalado que es evidente que existen diferencias según la edad que pueden ser útiles para determinar la capacidad reproductiva de la mujer [67].

Barri y cols [18] defendieron el valor del E₂ basal al inicio del ciclo como elemento discriminativo que permitiría la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar una mala respuesta entre las mujeres con nivel basal normal de FSH.

Scott 1989 (C31) señaló que los niveles elevados de E₂ al inicio de la fase folicular pueden ser útiles para predecir la respuesta ovárica a la estimulación por 3 razones fundamentales:

- pueden indicar que la paciente se encuentra en una fase más avanzada de reclutamiento y desarrollo folicular, lo cual supone que se podrá reclutar menos folículos con la administración exógena de gonadotrofinas
- suponen una disminución en los niveles de gonadotrofinas circulantes lo que proporciona una alteración en la estimación adecuada de esos valores
- suponen un desarrollo folicular más avanzado y un acortamiento de la fase folicular lo que es asimilable a un estado perimenopaúsico con el consiguiente peor pronóstico para la estimulación.

En un intento de analizar más detenidamente el problema en pacientes que van a ser sometidas a técnicas de reproducción asistida, Licciardi y cols [69] estudiaron el papel de la determinación de E₂ el día 3º del ciclo (sin administración previa de análogos) en la predicción de la respuesta ovárica a la administración de gonadotrofinas.

Observaron que en pacientes con niveles normales de FSH (<17 UI/L) en el día 3º del ciclo, el número de ovocitos obtenidos es menor cuando el nivel circulante de E₂ el día 3º del ciclo es >60 pg/mL. No obtuvieron ningún embarazo en pacientes en las que el E₂ el día 3º del ciclo fue >75 pg/mL.

Lo justificaron afirmando que, probablemente, en relación con la disminución de la producción de inhibina en el ovario, se produce un aumento de la liberación hipofisaria de FSH, que tiene como consecuencia un incremento del número de folículos espontáneamente reclutados, una aceleración del desarrollo folicular, un aumento del nivel circulante de estradiol al inicio del ciclo menstrual y un acortamiento

de la fase folicular del ciclo; por otra parte, los niveles elevados de estradiol que presentan las pobres respondedoras tienen como resultado una mayor inhibición de la liberación hipofisaria de FSH en las fases de selección y dominancia.

Smotrich y cols [70] analizaron el resultado de 292 ciclos de estimulación ovárica con protocolo largo de agonista; independientemente de las variables FSH y edad, señalaron que pacientes con niveles de $E_2 > 80$ pg/mL en el día 3° del ciclo presentan una peor respuesta y una mayor tasa de cancelación, no encontrando ninguna gestación en pacientes con nivel de $E_2 > 100$ pg/mL.

Lashen y cols [71] analizaron la estimulación para FIV en 124 pacientes diagnosticadas de pobres respondedoras (todas produjeron menos de 5 folículos tras estimulación). Todas ellas presentaron niveles circulantes de FSH entre 3 y 12 UI/L. Las dividieron en tres grupos según el número de folículos producidos en un ciclo anterior: a) 1 ó 2 folículos, b) 3 folículos y c) 4 folículos.

Observaron que no existían diferencias entre los grupos en cuanto a la dosis total de gonadotrofinas administradas, la duración del estímulo, los niveles de E_2 el día en que se administró la hCG, el número de ovocitos captados y las tasas de fecundación y de gestación. Esta última fue similar a la observada en pacientes de respuesta normal a la estimulación.

Concluyeron que un nivel circulante normal de FSH el día 3° del ciclo no siempre implica una reserva ovárica normal, lo cual determina que la FSH basal sola no es un buen factor predictivo de la respuesta ovárica [71] y existe otro factor que influye en la respuesta al estímulo. Este puede ser el E_2 inicial, cuyas concentraciones elevadas al inicio de la fase folicular pueden normalizar el valor elevado de la FSH basal [70].

Según Evers y cols [72], las pacientes con niveles de FSH > 17 UI/L deben ser advertidas de que presentan un riesgo 4.1 veces mayor de desarrollar una baja respuesta que las pacientes con niveles de FSH < 17 mUI/mL. Para estos autores, si el nivel basal de FSH es normal y el de E_2 basal es > 60 pg/mL, el riesgo de baja respuesta es 4.3 veces mayor que pacientes con FSH y E_2 basal normales.

Hugues y cols [73] propusieron un índice para valorar la respuesta ovárica, el obtenido de dividir el valor del nivel de E_2 el día de hCG entre el número total de ampollas de hMG utilizadas durante la estimulación ovárica. Encontraron un índice

significativamente más bajo ($48 \pm 3,8$) en las mujeres bajas respondedoras al compararlo con las mujeres normo-respondedoras (218 ± 20).

II. Inhibinas ováricas

Scott y cols, en su trabajo para conocer el valor predictivo de la respuesta ovárica determinado por los valores basales de FSH, LH y E_2 [74] concluyeron que el valor fundamental lo proporciona la FSH. Sin embargo, dado que los niveles de E_2 basal no se correlacionan con los niveles de FSH, sugirieron, al igual que Sherman [49], la influencia de factores no esteroideos en el desarrollo de los folículos y por lo tanto en la regulación de la secreción de gonadotrofinas en la fase folicular temprana; estos factores serían las activinas, inhibinas, etc.

Activina y folistatina son péptidos producidos por las células de la granulosa que regulan la secreción de FSH. No obstante, puesto que no se producen variaciones en los niveles de los mismos a lo largo del ciclo ovárico [75, 76], tendrían poca importancia como marcadores de la reserva ovárica.

Las inhibinas son polipéptidos que incluyen dos formas moleculares: inhibina A (formada por una subunidad α (común con la inhibina B) y una subunidad β) e inhibina B (formada por una subunidad α (igual a la inhibina A) y una subunidad β) [77]. Ambas son producidas en las células de la granulosa.

La inhibina A se secreta fundamentalmente alrededor de la ovulación (folículo preovulatorio y cuerpo lúteo), presentando su pico máximo a mitad de la fase lútea, lo cual puede orientar sobre la maduración del folículo y la calidad del ovocito.

La inhibina B se secreta fundamentalmente en la fase folicular temprana, a partir del aumento de FSH, presentado su pico en la mitad de la fase folicular, para posteriormente ir disminuyendo progresivamente, lo cual puede orientar sobre el número y la calidad de los folículos en desarrollo [77, 78]. El nivel medio de inhibina B en el día 3º del ciclo es de 45 pg/mL (intervalo de confianza del 95%).

Existe una correlación clara entre la disminución de los niveles de inhibina B y el aumento de los niveles basales de FSH en la fase folicular temprana [79]. Las concentraciones disminuidas de inhibina B constituyen un marcador bioquímico de la disminución de folículos pre-antrales y, por lo tanto, suponen un retrocontrol negativo sobre la producción de FSH hipofisaria [51]. En mujeres con disminución de la reserva

ovárica, la producción de inhibina B es inadecuada para mantener los niveles de FSH dentro de la normalidad. Este sería el fundamento fisiopatológico del test de clomifeno [79].

Este patrón de secreción de la inhibina B se puede relacionar con el pronóstico de baja respuesta de una paciente que va a ser sometida a una hiperestimulación ovárica controlada para técnicas de reproducción asistida:

- valores altos, tanto de inhibina A como de inhibina B se correlacionan con un mayor número de ovocitos reclutados y una mayor tasa de gestación en los ciclos estimulados con gonadotrofinas [78].
- mujeres con niveles menores a 45 pg/mL de inhibina B y, al mismo tiempo, niveles mayores de FSH, tienen menor reserva ovárica y, como consecuencia, se produce una peor respuesta al estímulo con gonadotrofinas [77].

La inhibina B se puede considerar mejor predictor de la respuesta a las gonadotrofinas exógenas que la edad y equivalente al valor de la FSH el día 3° del ciclo [80], pero las variaciones en la determinación de los niveles basales observados por lo distintos autores la relegan a un segundo plano [78].

Peñarrubia y cols [81] analizaron la utilidad para predecir la respuesta ovárica de las determinaciones de inhibina A, inhibina B y estradiol en el día 5° de la estimulación con gonadotrofinas. Observaron que los niveles de inhibina A, inhibina B y estradiol fueron significativamente más bajos en el grupo con cancelación previa frente al grupo control. Estableciendo una correlación con los datos de la estimulación ovárica observaron que la inhibina B se correlacionaba directamente con el número de folículos desarrollados, el número de ovocitos y la tasa de fertilización, pero no con la tasa de gestación. Concluyeron que la inhibina B es un buen factor predictivo de la respuesta ovárica en ciclos de estimulación para FIV/ICSI.

En un estudio posterior [82], analizando los resultados obtenidos en 120 pacientes, Creus y cols valoraron la capacidad predictiva de la edad, la FSH y la inhibina B, observando que la edad fue la única variable asociada con la tasa de gestación y la FSH fue el mejor predictor de la tasa de cancelación y, por lo tanto, mejor que la inhibina B.

III. Nivel basal de FSH

Fisiológicamente los niveles de FSH comienzan a aumentar durante el final de la fase lútea y disminuyen durante la mitad de la fase folicular como resultado de los efectos moduladores del E₂ circulante, las inhibinas, etc. sobre el eje hipotálamo-hipofisario [74].

La medición de los valores de LH no tiene ningún valor predictivo ya que su secreción pulsátil y su vida media corta impiden una valoración adecuada [74].

Según aumenta la edad de la paciente, se produce un aumento de los niveles de FSH en la fase folicular temprana ya que la hipófisis aumenta la producción en un intento de conseguir un crecimiento folicular adecuado [83] y, paralelamente a este aumento de la FSH endógena, se produce un empeoramiento de la respuesta folicular a la FSH exógena [84].

Scott 1989 [74] observó, analizando 758 ciclos de estimulación ovárica, que la tasa de gestación disminuía de forma proporcional al aumento de la FSH basal el día 3° del ciclo.

Muasher y cols [85] observaron que elevaciones en los niveles de FSH el día 3° del ciclo se asocian a niveles menores de E₂ el día de hCG, menor número de ovocitos obtenidos en la punción y menor tasa de gestación y permiten establecer distintos grupos de pacientes prediciendo la respuesta a la estimulación ovárica de las mismas.

Toner y cols [86], como consecuencia del análisis de 1478 ciclos de FIV consecutivos, afirmó que tanto el nivel basal de FSH como la edad son buenos factores predictores de la respuesta ovárica a la estimulación; el nivel basal de FSH, como factor predictor solo, es mejor que la edad de la paciente sola, respecto a tasa de cancelación, niveles de E₂ el día de hCG, número de ovocitos captados, número de ovocitos preovulatorios, número de embriones obtenidos y tasas de fecundación, transferencia y gestación. Respecto al número de abortos, únicamente señalaron que son más frecuentes en pacientes con FSH elevada (sobre todo en mujeres con FSH >25 UI/L) porque suelen ser pacientes más mayores y con ovocitos más "viejos".

Martinez y cols [87] señalaron que niveles basales de FSH >15 UI/L suponen una mala respuesta a la estimulación.

Se puede establecer que el nivel de la FSH en el 3º día del ciclo presenta un buen valor predictivo de la reserva ovárica [88] y, por lo tanto, de la respuesta ovárica al estímulo con gonadotrofinas y de la tasa de gestación en los ciclos de FIV [16, 72].

Gürgan [88] llevó a cabo un estudio destinado a determinar si el valor de la FSH el día 3º del ciclo es un buen predictor de la respuesta ovárica en pacientes sometidas a un protocolo corto de agonista (acetato de buserelina spray nasal 100 µg 4 veces/día, iniciado el 1º día de la menstruación y continuado hasta la administración de hCG) y estimulación ovárica controlada con hMG desde el día 3º del ciclo. Concluyó que los niveles elevados de FSH el día 3º del ciclo (punto de corte 13 UI/L) son la única variable independiente capaz de predecir los valores bajos de E₂ el día de hCG y, por lo tanto, la tasa de cancelación en el protocolo referido.

La ventaja de valorar la FSH basal, según Browen y cols [89], es su alto valor predictivo para nuevas determinaciones de la misma durante un año, ya que no se observan variaciones significativas en el período referido.

Al analizar la valoración del nivel circulante basal de FSH se han de considerar los siguientes apartados:

a) Relación de la edad con los cambios en los niveles de FSH

La caracterización de los aspectos endocrinológicos de la transición al climaterio se realizó en los años 70 y 80. Shermann y cols [48, 49] demostraron un aumento en los niveles de FSH en mujeres de 35 años con ciclos menstruales normales. Otros estudios confirmaron estos hallazgos y fue observado que las primeras elevaciones ocurren en el comienzo de la fase folicular [68, 90]. Esta apreciación apoya la idea de que el aumento de la FSH corre paralelo a la disminución de la reserva ovárica relacionada con la edad, como fue postulado [16].

b) Niveles de FSH basal y tasa de gestaciones

La descripción más temprana de la relación de los niveles de FSH y la tasa de gestaciones corresponde a Muasher y cols [85], quienes observaron escasas gestaciones en pacientes tratadas mediante FIV que presentaban tanto los niveles de FSH como la relación FSH/LH elevados; no obstante, el escaso número de pacientes valoradas en este estudio (n=88) lo hace poco concluyente.

Scott y cols [74], en un estudio retrospectivo de 758 ciclos de FIV, demostraron una disminución en las gestaciones a la par que un aumento en los niveles de FSH. Así, en mujeres con nivel de FSH <15 UI/L la tasa de gestación por ciclo iniciado fue de 24%; si el nivel basal de FSH se situaba entre 15 y 24 UI/L, la tasa de gestación bajó a 13,6% y, si este nivel era ≥ 25 UI/L, la tasa de gestación descendía a 10,7%. Esta reducción fue atribuida a una disminución de la reserva ovárica porque las mujeres con FSH elevada desarrollaron pocos folículos; fueron obtenidos pocos ovocitos y transferidos pocos embriones. Por el contrario, esta disminución de la tasa de gestación no se relacionó con la edad, ya que todas las pacientes rondaban los 35 años, ni con los valores iniciales de LH ni de E2. Concluyeron que el valor de la FSH el día 3° del ciclo puede considerarse un buen predictor de la respuesta folicular a la estimulación ovárica y de la tasa de gestación por lo que es útil para aconsejar a la paciente sobre su capacidad reproductiva. Estos hallazgos fueron confirmados por Feldberg y cols [91].

Padilla y cols [92] apreciaron una baja tasa de gestación por ciclo estimulado en pacientes con FSH basal ≥ 20 UI/L.

Toner y cols [86] llegaron a la conclusión que el nivel circulante basal de FSH tiene mejor valor predictivo sobre la tasa de gestación y de cancelación que la edad sola, aún reconociendo que existe una disminución de la tasa de gestación con el aumento de la edad.

En un intento de encontrar una explicación fisiopatológica a las variaciones referidas, se ha reportado que las células de la granulosa luteinizadas de mujeres con niveles de FSH elevados el día 3° del ciclo producen menos esteroides, tienen un índice mitótico disminuido, y producen menos IGF-I e IGF-II, aunque no se han detectado diferencias en la producción de inhibina [16].

c) Variabilidad ciclo a ciclo de los niveles basales de FSH

Antes de explicar a la paciente las posibilidades reproductivas según los niveles basales de FSH se ha de considerar las variaciones que los mismos presentan de un ciclo a otro. Así, Scott y cols [93] desarrollaron un estudio en el que incluyeron 81 mujeres tributarias de FIV con el fin de conocer el grado de variación individual de la FSH ciclo a ciclo y determinar si estas variaciones son capaces de predecir las alteraciones en la respuesta ovárica a la estimulación. Observaron que las pacientes con niveles de FSH <15 mUI/mL tienen escasas variaciones ciclo a ciclo ($\pm 2,6$ UI/L), pero las pacientes

con niveles más altos de FSH (≥ 15 UI/L) tienen un grado mayor de variación (± 7 UI/L). La variación ciclo a ciclo, por si sola, no predice los cambios en la respuesta ovárica pero las pacientes con variaciones importantes responden peor a la estimulación independientemente de la FSH basal. Por ello, si la FSH basal orienta sobre la posible respuesta folicular al estímulo ovárico, ya que informa de la actividad metabólica de los folículos en desarrollo, las pacientes deberían ser sometidas a HOC en los ciclos con los niveles basales de FSH más bajos y se obtendría una mejor respuesta a la estimulación ovárica.

Estos datos indican que, con el paso del tiempo, la mujer desarrolla mayor variabilidad de la FSH basal, lo que forma parte del proceso de disminución en la reserva ovárica [86].

Scott y cols [93] recomendaron determinar 2 valores distintos de FSH basal para conocer las variaciones ciclo a ciclo lo cual ayudaría a completar la estimación de la respuesta ovárica a la estimulación y, por lo tanto a planificar mejor la estimulación.

d) Screening de la FSH basal en mujeres con un solo ovario

Parece razonable plantear las siguientes preguntas en esta situación:

- ¿se produce un aumento de la FSH sérica basal en pacientes con un ovario sólo?
- ¿el valor de la FSH basal es predictor de la respuesta ovárica en estas pacientes?
- ¿deben ser modificados los valores de referencia de la FSH para predecir la baja respuesta en estos casos?

En estas pacientes existe una disminución de la cohorte inicial de folículos pero no se relaciona con una disminución en la calidad de los mismos [16].

Khalifa y cols [94], comparando los niveles basales de FSH en pacientes con un solo ovario (140 pacientes) con las pacientes con dos ovarios (985 pacientes), observaron que las primeras tenían niveles de FSH más elevados que las segundas. Durante la estimulación ovárica, únicamente se obtuvo un nivel más alto de E_2 y un mayor número de folículos para punción en pacientes con dos ovarios que en las de un solo ovario (al considerar la influencia del número de ovarios para valores iguales de los niveles de FSH). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de gestación en los ciclos de FIV realizados. Concluyeron que los niveles basales de FSH,

como predictores de la baja respuesta, son igualmente valorables en las pacientes con un solo ovario.

e) Niveles de Estradiol y FSH el día 3 del ciclo

El momento considerado óptimo para la determinación de los niveles basales de FSH es el día 3º del ciclo, que es cuando los niveles de E₂ alcanzan su máximo [16]. Se puede inferir que los niveles altos de E₂ circulante produzcan una disminución en los niveles de FSH [16].

Licciardi y cols [69] determinaron que aumentos progresivos en los niveles de E₂ basal, en el día 3 del ciclo, iban asociados con una disminución en la respuesta ovárica y en la tasa de gestación, pero no fue capaz de demostrar que esta información adicional añadiera algo a la obtenida mediante los niveles basales de FSH. Sin embargo, Smotrich y cols [70] situando el punto de corte del nivel de E₂ basal en 80 pg/mL (Licciardi había valorado un nivel de 45 pg/mL) comprobaron que las pacientes con niveles mayores que este punto de corte presentaban disminuida su capacidad reproductiva: menor tasa de gestación con mayor porcentaje de cancelación.

f) Relación FSH/LH basal

Los niveles basales de FSH tienen alta especificidad pero baja sensibilidad, ya que se ha comprobado que valores elevados sugieren poca respuesta ovárica pero existen muchas pacientes con valores normales que también presentan escasa respuesta a la estimulación ovárica [16].

Algunos autores han descrito una baja respuesta ovárica a la estimulación en pacientes con niveles no elevados de FSH y aumento en la relación FSH/LH (cociente mayor de 3) a expensas de una disminución de la LH (sobre todo ante valores < 3 UI/L) [95]. No obstante, está por demostrar la repercusión de esta situación sobre la tasa de gestación.

Muasher y cols [85] y Droesch y cols [96], del mismo grupo de trabajo, establecieron las siguientes categorías en función del cociente FSH/LH:

- pacientes hiper-respondedoras aquellas con un cociente LH/FSH ≥ 1.5
- pacientes normo-respondedoras con un cociente FSH/LH de 1 (ambos valores por debajo de 10 UI/L)

- pacientes pobres respondedoras con una FSH basal > 15 UI/L y un cociente FSH/LH > 1.5 , estas últimas con tasas de gestación muy bajas.

2.3.3. Determinaciones hormonales dinámicas (Pruebas funcionales)

Las pruebas basales estáticas proporcionan valores (de FSH, de E_2 , de LH) que, como se ha visto, presentan variaciones ciclo a ciclo y, también, se ha observado que los valores de las mismas como predictores de baja respuesta, a veces, no lo son tanto, ya que existen pacientes con niveles hormonales dentro de la normalidad pero que, ante una estimulación ovárica controlada, se comportan como bajas respondedoras. De ahí la utilidad que pueden tener, en la valoración de la respuesta ovárica, las pruebas funcionales o dinámicas.

I. Test de Clomifeno

Descrito en 1987 por Navot y cols [97] para valorar la reserva ovárica en mujeres mayores de 35 años con ciclos normales y esterilidad de causa desconocida. Incluyeron en un estudio 51 pacientes, determinando los niveles de FSH, LH, 17β estradiol, andrógenos ováricos (androstendiona, testosterona,...) el día 2°-3° del ciclo y el día 9°-11° del mismo ciclo, tras administración de 100 mg/día de citrato de clomifeno (CC) del día 5° al 9°.

Afirmaron que un nivel de FSH mayor de 26 UI/L el día 9°-11° del ciclo define una respuesta patológica (reserva ovárica disminuida) y, por lo tanto, menor tasa de gestación en la estimulación ovárica controlada.

En las pacientes con reserva ovárica normal, tras un estímulo con citrato de clomifeno, el crecimiento folicular producido es capaz de llevar el valor de FSH a rangos normales, por su acción a nivel del eje hipotálamo-hipofisario [16, 97].

La explicación fisiopatológica vendría determinada porque, durante la perimenopausia, se produce un gradual aumento de las gonadotropinas séricas, siendo mayor y más rápido el aumento de FSH que el de LH. Cuando se administra CC durante la vida reproductiva de la mujer, se produce un aumento mayor y más mantenido de la LH que de la FSH.

En las pacientes con reserva ovárica disminuida, con el test de clomifeno se induce un aumento de FSH similar al de la fase perimenopáusica, que puede ser atribuido a una disminución en la producción de inhibina por el ovario, debido a una

disminución del número de folículos (disminución de la capacidad de secreción de las células de la granulosa) y de ovocitos.

La capacidad de las células de la granulosa para producir inhibina se puede relacionar con la calidad de los ovocitos y, por lo tanto, con la capacidad para concebir.

Los valores de andrógenos estudiados son similares en pacientes con disminución de la reserva ovárica (FSH >26 UI/L) y en pacientes con FSH <26 UI/L. Así, en pacientes con test de clomifeno alterado, indicativo de baja reserva ovárica, se observa baja respuesta ovárica a la estimulación y baja tasa de gestación.

Scott y cols [21] definieron como test anómalo (reserva ovárica disminuida) aquél en el que el nivel de FSH es >10 UI/L el día 10° del ciclo; esto equivaldría a las 25 UI/L referidas por Navot [97].

El test de clomifeno se describió en 51 mujeres, con una edad superior a 35 años, diagnosticadas de infertilidad [97]. Todas tenían niveles de FSH normales pero en 18 de ellas se apreció un test de clomifeno anómalo, que indicó disminución de la reserva ovárica que podría ocasionar una baja respuesta tras la estimulación con gonadotrofinas. Ello supondría menor número de folículos, menores niveles de E2, menor número de ovocitos y menor número de embriones. De hecho, sólo una de las 18 mujeres concibió, mientras que hubo 14 gestaciones en las 33 restantes.

Tambo y cols [55] observaron peor respuesta folicular, menor número de ovocitos captados y menor número de embriones transferidos en pacientes con respuesta anómala al test de clomifeno tras estimulación ovárica con distintos protocolos (protocolo largo de agonista más hMG, clomifeno más hMG y hMG sola). Como consecuencia de estas observaciones afirmaron que un test de clomifeno anormal tendría un valor predictivo del 85% para la cancelación debido a pobre respuesta ovárica y un 100 % para fallo de concepción.

Loumaye y cols [98] analizaron los resultados obtenidos mediante el test de clomifeno en un grupo de 114 pacientes: sumando el valor basal de la FSH y el valor del día 10°, describió un valor predictivo del 100 % para fallo de concepción en aquellas pacientes con un nivel de FSH mayor de 26 UI/L.

Todo parece indicar que el test anómalo (niveles altos de FSH) ofrece una utilidad clara para identificar pacientes con mal pronóstico entre las mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida (inducción de la ovulación, FIV).

Scott y cols [21] evaluaron la capacidad predictiva del test de clomifeno en un grupo de 236 pacientes infértiles a lo largo de un año. Refirieron una incidencia del 10% de resultados anormales en esta población infértil. Observaron que la incidencia de un test anormal aumentaba con la edad (7% entre 30 y 34 años, 10% entre 35 y 39 años y 26% en mayores 40 años) y que la tasa de gestación era menor en pacientes con test anómalo indicativo de reserva ovárica disminuída.

Como consecuencia, sugirieron que la prueba de estímulo con clomifeno podría ser más sensible que la determinación de la FSH sola para diagnosticar la pobre reserva ovárica. Observaron también que existía una alta incidencia de test anómalo en pacientes con infertilidad de causa desconocida, lo cual indica que la disminución de la reserva ovárica puede ser, por sí sola, una causa de esterilidad.

Afirmaron que el test de clomifeno podría servir para aconsejar a la paciente sobre el tipo de tratamiento de estimulación y para informarla sobre los posibles resultados del mismo, sobre todo respecto a las posibilidades de obtener una gestación.

Anserini y cols [99] señalaron que la incidencia de un test de clomifeno anormal en pacientes infértiles es de un 10 %, independientemente de la edad.

Barri y cols [18] observaron menores niveles de E_2 y mayores niveles de FSH tras el test de clomifeno, con diferencias estadísticamente significativas, en pacientes baja respondedoras.

El test de clomifeno tiene mayor valor predictivo respecto a la tasa de gestación que la edad sola y que la determinación de la FSH basal sola. Sin embargo, en pacientes con una reserva ovárica adecuada (pruebas funcionales normales), el aumento de la edad supone una disminución de la tasa de gestación. Existen cambios en el sistema reproductor que no son detectables por el test de clomifeno ya que, por ejemplo, presenta escaso valor predictivo en pacientes de 40 años cuando los resultados del test son normales. Ello es, probablemente, debido a que este test puede detectar los pequeños cambios que la edad produce en las relaciones hipotálamo-hipófiso-ováricas; sin embargo, en modo alguno podría detectar cambios en la calidad biológica de los ovocitos que, también disminuye, muy verosímilmente por la edad.

En otras palabras, la disminución de la fecundidad relacionada con la edad tiene, probablemente, dos componentes: la calidad biológica de los ovocitos, relacionada con su carga genética, y los cambios hormonales, relacionados con la reserva ovárica. Sólo

estos últimos serían detectables por medio de valoraciones hormonales. Esto podría justificar que un test de clomifeno anormal sea un hallazgo más tardío que la disminución del potencial reproductivo de los ovocitos [16, 100].

II. Test EFORT (Exogenous Follicle stimulating hormone Ovarian Reserve Test)

Debido a la simplicidad de la determinación, la FSH basal el día 3° del ciclo, ha sido utilizada como determinación que orienta sobre la posible respuesta del ovario a la hiperestimulación controlada, pero la relación entre los niveles referidos y la respuesta ovárica es, a veces, discordante.

Con el objeto de mantener la simplicidad y mejorar el valor predictivo de la FSH sobre la respuesta ovárica, Fanchin y cols [101] desarrollaron el test EFORT. Este test consiste en administrar 300 UI de FSH el día 3° del ciclo y realizar determinaciones de FSH y E₂ antes de la administración de FSH (basales) y a las 24 h del estímulo. Valoraron la FSH basal y el incremento de E₂ tras el estímulo. En función de un estudio previo, en el que 30 pg/mL fue el incremento más bajo a las 24 h en pacientes con respuesta adecuada a la estimulación ovárica, consideraron que éste era el mínimo incremento del E₂ necesario para considerar una respuesta normal. El punto de corte para la FSH basal se colocó en 11 UI/L (resultado normal FSH b ≤ 11 UI/L, resultado anormal FSH basal >11 UI/L).

Tras 2 menstruaciones, sin tener en cuenta los resultados de los tests realizados, a todas las pacientes se pautó la supresión hipofisaria mediante la administración de 3,75 mg de acetato de leuprolide en el 2° día del ciclo y se inició la estimulación ovárica 18 días después tras comprobar supresión hipofisaria. Se establecieron tres grupos de respuesta:

- baja: los casos con nivel de E₂ menor de 1300 pg/mL y obtención de 3 o menos ovocitos (un total de 11 entre 14 pacientes, fueron canceladas).
- intermedia: los casos en que el nivel de E₂ fue menor de 2500 pg/mL y mayor de 1300 pg/mL, obteniéndose entre 3 y 6 ovocitos en la punción.
- normal: los casos con nivel de E₂ >2500 pg/mL el día de hCG y más de 6 ovocitos maduros en la punción.

Tras el análisis de los datos se observó que mediante la FSH basal y el incremento del E₂ valorados en el test se puede identificar una buena respuesta en el 90

% de los casos, y se puede identificar una baja respuesta en el 80% de los casos de test anormal (FSH b ≥ 11 UI/L e incremento de $E_2 < 30$ pg/mL), lo cual es importante ya que el valor predictivo de la FSH sola para la baja respuesta es de 45%.

Este test podría ser utilizado sistemáticamente en pacientes en las que una baja respuesta fuera esperable: mayores de 37 años, ciclos irregulares, patología orgánica ovárica y baja respuesta previa [90].

III. Test de estimulación con agonistas de GnRH

El test de estimulación con agonistas de la Gn-RH tiene utilidad en la valoración de pacientes con inducción de la ovulación complicada, en las que es necesaria una correcta determinación del protocolo de tratamiento (tanto agonista como gonadotrofinas. La valoración cuidadosa (E_2 , FSH y LH) de la fase folicular en respuesta a la administración de acetato de leuprolide (aGnRH) en protocolo "flare up" determina el pronóstico del ciclo de HOC [92, 102].

Así estos autores han utilizado los valores de FSH, LH y E_2 , en la fase folicular temprana (del día 2° al 5° del ciclo, determinados diariamente), tras la administración de análogos de la GnRH (acetato de leuprolide 0,75 ó 1 mg/día según el peso de la paciente, durante los días 2°, 3° y 4° del ciclo de estimulación) para determinar el pronóstico de la estimulación ovárica con gonadotrofinas [102].

La respuesta del E_2 refleja la actividad biológica de las gonadotrofinas hipofisarias y la capacidad funcional de los folículos ováricos. Estos mismos autores definieron 4 grupos de respuesta del E_2 al análogo. El más común fue aquél en que los niveles de E_2 se duplicaron el día 3° del ciclo y cayeron bruscamente el día 4°; este grupo se asoció a una mayor tasa de gestación que los restantes. Describieron otro grupo en donde no se produjeron variaciones en los niveles del E_2 tras el análogo; este fue el que tuvo peor calidad en los ovocitos obtenidos y donde se concentraron todos los ciclos cancelados por falta de respuesta ovárica y, por lo tanto, fue el grupo con menor tasa de gestación. Probablemente, el aumento de la producción hipofisaria de gonadotrofinas en el protocolo "flare-up" induce la formación de receptores para FSH en las células de la granulosa.

Concluyeron que la respuesta biológica del ovario, representada por las variaciones del E_2 , fue mejor indicador que los niveles basales y tras estimulación de FSH y LH, observando que una respuesta positiva (doblar los valores basales), en los

niveles de E₂ tras el estímulo con el análogo supuso una mayor tasa de gestación, aunque sin diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos. Los valores de LH no fueron determinantes ya que en todas las pacientes se doblaron sobre los basales el día 3° del ciclo [102].

En otro estudio, basándose en los distintos tipos de evolución del E₂ descritos tras la administración de acetato de leuprolide, Padilla y cols [92] plantearon distintos tipos de estimulación ovárica (protocolo largo o protocolo flare-up) Observaron que las pacientes con elevación de E₂ al doble en el día 3° del ciclo y en las que lo doblaban en el día 4° se obtenían buenos resultados en la estimulación ovárica con el protocolo flare-up. En las pacientes en las que se observaba una elevación progresiva del E₂ se obtenían mejores resultados realizando supresión hipofisaria con acetato de leuprolide en la mitad de la fase lútea previa al estímulo que mediante el protocolo flare-up. Por último, en las pacientes que no mostraban aumento del E₂ era necesario realizar un estímulo con altas dosis de gonadotrofinas para conseguir mejorar la tasa de gestación y los porcentajes de cancelación.

Winslow y cols [103] intentaron valorar la capacidad del test de estimulación con agonistas para predecir la respuesta ovárica a la estimulación. Administraron acetato de leuprolide el día 2°, el día 3° y el día 4° del ciclo (1 mg/día) para disminuir a la mitad el día 5°, manteniendo esta dosis hasta la administración de hCG. Determinaron los niveles de FSH, LH y E₂ el día 2°, 3° y 4°, comenzando la administración de gonadotrofinas el día 4° del ciclo. Definieron 4 grupos distintos en la evolución del E₂:

- grupo 1 con aumento al doble en el día 3° y aumento en un 33% más el día 4°
- grupo 2 con aumento al doble el día 3° y meseta el día 4°
- grupo 3 con aumento al doble el día 3° y disminución mayor del 33% el día 4°
- grupo 4 con aumento del E₂ menor del doble referido en los otros grupos.

No encontraron diferencias en las características de la estimulación ni en la tasa de gestación en los grupos 1, 2 y 3. Sí observaron mayor porcentaje de cancelación y peor respuesta a la estimulación en el grupo 4 respecto a los otros grupos. El E₂ y sus variaciones (en el grupo 1, 2 y 3) no tuvieron valor predictivo del número de ovocitos reclutados –como refieren Padilla y cols [102] ni de la tasa de gestación (a diferencia de

lo encontrado por Padilla y cols [102]. Sólo observaron menor número de ampollas de hMG/FSH y menor número de días de estímulo en los grupos 1 y 2 al compararlos con los grupos 3 y 4. No encontraron diferencias en los niveles de FSH y LH determinados entre los grupos 1, 2 y 3. Concluyeron que el test de estimulación con análogos agonistas es un buen predictor de la respuesta ovárica a la estimulación al compararlo con predictores como la edad y la FSH basal.

IV. Respuesta a la estimulación gonadotropa

Ante un ciclo de estimulación ovárica, [22] el grupo de Norfolk demostró que las mujeres que respondían mal a la estimulación gonadotropa desarrollaban menos folículos, se recuperaban menos ovocitos y presentaban un porcentaje de gestación menor. La disminución de la reserva ovárica va acompañada de una reducción en el tamaño y la actividad de los folículos.

El inconveniente se manifiesta en que el diagnóstico de la baja respuesta es un dato obtenido a posteriori, o sea tras un ciclo de hiperestimulación ovárica controlada.

2.3.4. Ecografía Vaginal

La reducción de la función ovárica o de su reserva se debe a la disminución del número de folículos primordiales desde aproximadamente 250.000 en la menarquia a escasos folículos al final de la fase reproductiva. Esta pérdida se ve acelerada por la edad, sobre todo, a partir de los 37 años y, sobre los 50 años, sólo unos cientos de folículos persisten [104].

Desde que un folículo comienza su desarrollo hasta que se convierte en un folículo primordial pasan 3 meses. La medición del número de folículos (entre 2 y 5 mm) al inicio de la fase folicular (que oscila entre 3 y 11 por ovario en pacientes entre 24 y 33 años [105]) orienta sobre la respuesta ovárica.

Lass y cols [106] plantearon un estudio sobre la hipótesis de que el tamaño pequeño de los ovarios, valorado por ecografía transvaginal, se asocia con baja respuesta, por lo que, midiendo el volumen del ovario, se podría predecir la respuesta del ovario a la estimulación. Con esta hipótesis incluyeron 140 pacientes de 24 a 46 años de edad. Todas ellas mostraron un nivel de FSH <15 UI/L. Fueron estimuladas con un protocolo largo de tratamiento con acetato de buserelina y una estimulación con hMG.

Definieron dos grupos: grupo A) pacientes con volumen ovárico $<3 \text{ cm}^3$ (n=17) y grupo B) pacientes con volumen ovárico $>3 \text{ cm}^3$ (n=123).

Encontraron menor número de folículos desarrollados, menor número de ovocitos captados, mayor número de ampollas de hMG utilizadas en el grupo A con diferencias estadísticamente significativas sobre el grupo B.

La tasa de cancelación fue 4 veces mayor en el grupo A (20%) que en el grupo B (5%), aunque la tasa de fecundación y la tasa de gestación fueron similares en ambos grupos. Concluyeron que las pacientes con menor volumen ovárico en ecografía transvaginal presentan peor respuesta a la estimulación para FIV.

Pellicer y cols [107], utilizando la ecografía tridimensional para medir el número de folículos antrales reclutables (2-3 mm), intentaron predecir la respuesta ovárica a la estimulación.

Analizaron 10 pacientes consideradas pobres respondedoras por obtención de menos de 4 folículos en estímulos previos; todas ellas menores de 35 años y con niveles basales de FSH y E_2 normales. Realizaron la estimulación con agonista (acetato de leuprolide) en protocolo largo y administración de FSH pura y hMG. Observaron, en las pacientes pobres respondedoras, menor número de folículos reclutables y menor número de folículos totales, comparándolas al grupo control de normo-respondedoras. No existían diferencias estadísticamente significativas en el volumen del ovario de ambos grupos, quizás sea debido a la edad de las pacientes.

Chang y cols [108] publicaron que la disminución de los folículos antrales (≥ 2 mm), que se relaciona con el aumento de la edad, permite establecer la capacidad de respuesta de la paciente a la estimulación ovárica.

**3. ANALISIS DE LOS PROTOCOLOS DE
TRATAMIENTO UTILIZADOS EN
PACIENTES CON BAJA RESPUESTA**

Los recursos terapéuticos que se han ido utilizando para mejorar la respuesta a la estimulación ovárica en aquellas mujeres susceptibles de responder deficientemente al estímulo con altas dosis de gonadotrofinas responden al constante objetivo del clínico: conseguir que este tipo de pacientes establezcan un desarrollo folicular adecuado, en términos de calidad biológica de los ovocitos, como paso previo imprescindible para que se produzca la gestación viable que se pretende.

Han sido muy variados, evolucionando paralelamente al desarrollo de los conocimientos relativos a la fisiología del folículo ovárico. Algunos han contribuido a mejorar el pronóstico de las pacientes que nos ocupan, las que muestran un desarrollo folicular deficiente como respuesta al tratamiento; otros, en cambio, han mostrado su ineficacia y han sido pronto abandonados.

Han sido, y siguen siendo, muy variados y, con frecuencia, combinan distintos conceptos, modificando simultáneamente la posología de diversos agentes farmacológicos. Incluso a la modificación de un fármaco habitualmente utilizado en la estimulación, como las gonadotrofinas, se ha asociado otro no habitual, como la hormona somatotropa (GH).

Aunque no siempre se ha visto debidamente justificada por la evidencia, esta conducta no deja de ser lógica, partiendo del principio de la búsqueda de soluciones para pacientes que no siempre tienen solución.

Forzosamente los recursos terapéuticos para las mujeres que responden peor que la media a las gonadotrofinas, deben ser diversos, si se considera que esta población es muy heterogénea y precisa de variaciones muy individualizadas en el tratamiento de inducción de la ovulación, como afirmaron Scott y cols [16].

La diversidad apuntada, la vertiginosa adquisición de conocimientos, el desarrollo de nuevos fármacos y la consecuentemente rápida sucesión de los cambios en la orientación terapéutica hacen el análisis que se pretende muy difícil y no siempre sistematizable. No obstante, conviene señalar que se hará en función de ciertos conceptos que parecen firmemente establecidos:

- el citrato de clomifeno induce una liberación de FSH y LH que no es controlable ni predecible. Por otra parte, las características de su acción farmacológica no permiten utilizarlo simultáneamente con los agonistas de GnRH.

- las gonadotrofinas, concretamente la FSH, son los agentes que permiten el mejor manejo de la estimulación mediante la administración general, aunque otras hormonas puedan ser mediadoras o coadyuvantes a su acción local.

En particular, la hMG, única forma farmacológica (hasta la fecha) que contiene acción LH puede potenciar la producción de estradiol, aumentando a nivel de la teca la producción de andrógenos, substrato de la aromatasas de la granulosa.

Cabe sin embargo señalar que, en general, los preparados de hMG están “contaminados” con hCG, lo que puede resultar absolutamente deletéreo sobre el folículo en desarrollo.

Los agonistas de GnRH rinden magníficos servicios para la estimulación: bien porque ejercen una acción inicial estimulando la liberación de gonadotrofinas endógenas, bien porque esta acción deja paso al bloqueo hipofisario, evitando la ovulación espontánea y la luteinización precoces. Sin embargo, la liberación de gonadotrofinas (efecto “flare up”) no es controlable ni predecible y parece poder afirmarse que, establecido el bloqueo hipofisario, ejercen un efecto antigonadotropo.

El IGF-I ejerce una acción coadyuvante y mediadora de la acción de FSH sobre la granulosa [109]; en consecuencia, cabe pensar que GH y los agentes farmacológicos que estimulan su secreción pueden mejorar la acción farmacológica de la FSH administrada.

El manejo farmacológico del desarrollo folicular para fecundación in vitro, tal como lo conocemos en la actualidad, se apoya en algunos principios que conviene recordar:

1. Los resultados obtenidos en FIV cuando se ha desarrollado esta técnica aprovechando el ciclo natural han conducido a resultados muy mediocres.
2. Las células granulosas inmaduras carecen de receptores para LH
3. Es fundamental el aumento de la FSH que se inicia al final de la fase lútea del ciclo anterior al estímulo, ya que éste, cuando sobrepase el “dintel de FSH” va a determinar el reclutamiento folicular del ciclo de estímulo [110-113]. Entre las disponibles en la farmacopea, esta es la única hormona capaz de estimular el desarrollo folicular sin producir efectos indeseables.

4. La acción precoz o excesiva de LH (cuya secreción es sensiblemente pulsátil) sobre el folículo ovárico resulta deletérea –existe un “techo de LH”– aunque fisiológicamente la maduración final del folículo dependa de esta hormona como consecuencia del declive de la FSH. Sin embargo, conviene recordar que, durante el manejo farmacológico de la FSH, este declive no existe salvo que se provoque.

Recordados brevemente estos conceptos básicos, a lo largo del presente epígrafe serán analizados los distintos protocolos de estimulación que han sido utilizados para las mujeres de baja respuesta de la forma más sistematizada posible.

3.1. Evolución del uso de gonadotrofinas hipofisarias

Los resultados del uso de gonadotrofinas para el grupo de Norfolk [22] fueron:

- tasa de cancelación que osciló entre el 0% (1981) y el 16% (1984).
- mayor número de ovocitos preovulatorios en pacientes tratadas con FSH/hMG
- identificación de distintos parámetros de evolución del E2 a lo largo de la estimulación que condicionarían el resultado de la misma.

El protocolo con mayor número de ovocitos obtenidos y, por lo tanto, mayor número de embriones transferidos, fue aquél en que se apreció un aumento progresivo de estradiol durante la administración de gonadotrofinas y después de la administración de hCG

3.1.1. hMG

Estos preparados de gonadotrofinas comenzaron a ser utilizados en la época de los 60 para inducción de la ovulación, en los años 80 se utilizaron en técnicas de reproducción asistida para conseguir un crecimiento multifolicular y su uso se ha mantenido hasta la fecha, en que se han introducido la FSH y la LH recombinantes.

Las primeras gonadotrofinas se obtenían de orina de mujer menopaúsica. La primera preparación de fue la hMG, hormona hipofisaria obtenida a partir de purificación de la orina de mujeres postmenopaúsicas que tiene, en cada ampolla de 75 UI, una actividad equivalente a 75 UI de FSH y 75 UI de LH, pero también contiene proteínas urinarias que no se han eliminado en el proceso de obtención. Se observó que

su uso en los protocolos de estimulación para FIV supuso la obtención de un mayor número de ovocitos y una mayor tasa de gestación.

En el grupo de Norfolk [22] observaron que, con la administración de hMG, sin utilizar análogos de GnRH, obtenían mejor respuesta folicular, mejor tasa de gestación y menor tasa de cancelación que con el citrato de clomifeno. Siguieron el siguiente protocolo:

- la estimulación comenzaba el día 3° del ciclo, tras ecografía y determinación de estradiol, con 2 amp de hMG/día durante 3 días
- el control se realizaba mediante: determinaciones séricas diarias de E2, examen ecográfico diario y control clínico (volumen de moco, filancia, densidad, cristalización en hehecho y dilatación del orificio cervical externo).
- después del día 6°, a partir del día del cambio biológico (moco cervical), hicieron determinaciones de LH cada 4 h para detectar el pico endógeno de LH (ya que la ovulación ocurre a las 10 ± 5 horas del pico de LH)
- se administró 10000 UI de hCG 2 ó 3 días después de la última dosis de hMG o de la confirmación del cambio biológico en el moco cervical.
- mediante laparoscopia se practicó la captación ovocitaria a las 35-36 horas de hCG.

En los distintos estudios publicados [114] se ha observado que pequeñas cantidades de LH son necesarias para la maduración folicular pero cantidades mayores pueden determinar un efecto deletéreo en el proceso reproductivo (fertilización, calidad embrionaria, incluso mayor tasa de abortos) [115]. Esto, junto al descubrimiento de un método para eliminar la acción LH de la hMG, supuso la utilización de la FSH pura.

3.1.2. Uso de FSH pura y hMG

La FSH pura (FSHp) tiene una actividad FSH del 99% y una actividad LH del 1%.

El uso de FSHp fue descrito por Jones y cols 1985 (C25.5) en pacientes en donde el uso de hMG, ó el uso de FSH urinaria unida a hMG no resultó efectivo. Observaron un mayor número de ovocitos y un mayor número de embriones transferidos. Concluyeron que la FSH sola, sin la acción de la LH, es capaz de iniciar y mantener los niveles de E2, testimonio de una correcta maduración folicular.

Ante pacientes en que la respuesta ovárica es escasa con hMG, [116] propusieron la asociación de FSH a la hMG. La estimulación se inició con 2 ampollas de FSH y 2 ampollas de hMG el día 3° y el 4°, el día 5°, a partir del cual se mantuvo la hMG sólo. Se realizó control diario según se ha referido anteriormente [22].

Daya y cols [114] realizaron un estudio randomizado para testar la hipótesis que la administración de LH exógena tiene efectos negativos en los ciclos de HOC para FIV: 172 pacientes recibieron FSHp y 171 pacientes recibieron hMG, todas ellas estimuladas junto a agonistas en protocolo corto (iniciado el día 1° del ciclo).

Concluyeron que, aunque la media de número de ovocitos fertilizados fue similar, la proporción de pacientes con fallo completo en la fertilización fue significativamente más alta en las pacientes tratadas con hMG y se obtuvo mayor tasa de gestación en pacientes tratadas con FSHp.

En un meta-análisis previo de Daya [114] sobre la valoración de 8 estudios randomizados comparando el uso de FSHp con el de hMG (con protocolos corto o largo de agonista) concluyeron que, a la luz del análisis practicado, la probabilidad de gestar fue significativamente mayor con el uso de FSHp (frente a hMG) y con los protocolos largos de agonista.

Al analizar el efecto de la FSHp o de la hMG sobre las células de la granulosa, se observó que la FSHp produjo proliferación de las células de la granulosa en los folículos que habían sido seleccionados para el crecimiento en el ciclo; posteriormente, tuvo lugar la expresión de receptores para la LH y ésta, actuando sobre las mismas células, redujo su proliferación y aumentó la síntesis de progesterona. Lobb y cols [117] desarrollaron un estudio para valorar la influencia del protocolo de tratamiento (FSHp frente a hMG) en el desarrollo y las características de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Observaron que la producción esteroideogénica, sobre todo de progesterona, por las células luteinizadas de la granulosa en pacientes tratadas con FSHp era el doble del valor de la obtenida en el grupo de hMG

Valorando la calidad de los ovocitos obtenidos tras punción según el protocolo de estimulación (FSHp frente a hMG) se observó por Daya 1998 (K0) que no hubo diferencias en la calidad según la preparación utilizada excepto que el uso de FSH se asoció con mayor proporción de ovocitos en estadio de metafase II y con zona pelúcida

más delgada. Así, el uso de FSH se asoció con mayor tasa de fecundación con FIV pero no con ICSI.

3.1.3. FSH ultra pura (FSH-HP)

Con el desarrollo tecnológico, la FSHp, cuya vía de administración es intramuscular, ha dejado el paso a la FSH ultrapura (FSH-HP) que permite la administración subcutánea, ya que le han sido eliminadas las proteínas urinarias contaminantes sin modificar su farmacocinética y su farmacodinamia. Por lo tanto las dosis son equivalentes [118].

Distintos estudios han valorado los resultados de la estimulación con FSH-HP comparándola con la estimulación con hMG y se ha observado que los parámetros de la estimulación son iguales con las dos valoradas [119] y que los niveles de E2 son mayores en protocolos con hMG [120].

Quizás todo ello se justifica por los bajos niveles de LH durante la estimulación ya que algunos autores han publicado que el grado de síntesis endógena de LH requerido para la normal síntesis esteroidea es muy bajo, habiendo sido demostrado que menos del 1% de los receptores de LH han de ser ocupados para obtener máxima respuesta en síntesis esteroides sexuales [115].

Por todas estas razones, Söderström-Anttila y cols [118] concluían que, con los mismos resultados en la estimulación y la facilidad posológica de la vía subcutánea, ésta aumentaría su uso.

3.1.4. FSH recombinante (FSHr)

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ha permitido la producción de una FSH altamente purificada sin actividad LH, la FSH recombinante.

Se cuestionó si, con la ausencia de actividad LH, tendría el mismo efecto sobre el crecimiento folicular y la esteroidogénesis que las preparaciones de FSH urinaria. Se ha de recordar que la síntesis de estrógenos comienza en la producción LH-dependiente de andrógenos en las células de la teca, andrógenos que son aromatizados por un proceso FSH-dependiente.

Devroey y cols [121] valoraron el resultado obtenido en 51 pacientes tratadas con distintas pautas: sólo FSHr, FSHr con agonista en protocolo corto y FSHr con protocolo largo. Observaron que la FSHr es capaz de inducir tanto el crecimiento

multifolicular como la esteroidogénesis ovárica adecuadamente, aún no teniendo efecto LH.

Out y cols [122] en un estudio multicéntrico, prospectivo en el que fueron incluidas 981 pacientes compararon la FSHr y la FSHp (ambos grupos con protocolo largo de agonista), concluyendo que el uso de FSHr mejora el número de ovocitos obtenidos, disminuye el número de ampollas de FSH utilizadas en la estimulación, sin apreciarse diferencias en tasa de implantación ni en tasa de gestación por punción o por transferencia. Concluyeron que la FSHr resulta más eficiente que la FSHp.

Berg y cols [123] compararon los resultados obtenidos en 118 pacientes que recibieron FSHr con los observados en 115 pacientes que recibieron FSH-HP; confirmaron los datos a favor de una mayor eficacia de la FSHr en la estimulación ovárica referidos anteriormente por Out en 1995 [122].

Se puede resumir que, aunque no hay una evidencia clara en la mejoría de la FSHr en términos de tasa de gestación, los resultados de la estimulación son equiparables a la FSH urinaria y la FSHr es más eficiente y se puede usar subcutánea, lo cual siempre es una ventaja para la paciente [124].

Balash y cols, el año 2001 [125], llevaron a cabo un estudio prospectivo y randomizado para comparar la respuesta ovárica a la estimulación al usar FSH recombinante sola o asociada a LH recombinante. Incluyeron dos grupos de tratamiento: grupo 1 con FSHr sólo (13 pacientes) y grupo 2 asociando LHr a la FSHr (15 pacientes).

No observaron diferencias en el número de folículos y los valores de estradiol el día de hCG. El porcentaje de ovocitos metafase II y la tasa de fertilización fue significativamente mayor en el grupo tratado con FSHr. La baja tasa de fertilización en el grupo de LHr se comprobó también porque, en ciclos anteriores en las mismas pacientes, con FSH sólo, se había obtenido una tasa de fertilización más alta. Concluyeron que la adición de LHr a la FSHr no mejora la respuesta ovárica y puede tener un efecto negativo en la maduración ovocitaria y en la tasa de fertilización.

3.2. Aumento de la dosis de gonadotrofinas

Dentro de los recursos terapéuticos en la estimulación ovárica, lo más sencillo es aumentar los niveles circulantes de gonadotrofinas ante el diagnóstico de baja respuesta.

Hofmann y cols [11], en un grupo de 23 pacientes diagnosticadas de pobres respondedoras, según criterios definidos anteriormente (ver concepto de baja respuesta), demostraron que dosis de 450 UI FSH/día (en comparación con ciclos estimulados a las mismas pacientes con 300 UI/día) tuvieron como consecuencia una mejor respuesta, con diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de FSH, los niveles de E2 y la tasa de gestación; señalaron que el número de ovocitos reclutados, fertilizados y transferidos era ligeramente mayor en el grupo de dosis de 450 UI/día, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Crosignani y cols [126] observaron que con altas dosis de FSH en pacientes con supresión hipofisaria establecida con análogos agonistas desde el ciclo anterior, se mejoró la respuesta (número de folículos, número de ovocitos reclutados,...) a la estimulación ovárica controlada en pacientes diagnosticadas de pobres respondedoras.

Hofmann y cols [11] precisaron que, en bajas respondedoras, dosis superiores a 450 UI/día no mejoran el reclutamiento folicular ni la tasa de gestación.

Land y cols [84] trataron de determinar la respuesta a la estimulación ovárica en pacientes diagnosticadas de pobre respondedoras cuando se doblaba la dosis de hMG (de 225 UI/día a 450 UI/día). Observaron que, con una mayor duración del estímulo en pacientes tratadas con 450 UI/día se producía menor número de cancelaciones, se obtuvo mayor número de ovocitos y se consiguió una mejor tasa de gestación, a pesar que esta última era muy inferior a la obtenida en pacientes normo-respondedoras. Esto les llevó a afirmar que el estímulo en las pacientes pobres respondedoras consistente en aumentar la dosis de hMG no supuso un beneficio en los resultados ya que se trató de pacientes con escasa calidad de los folículos y de los ovocitos y, por lo tanto, se obtuvieron bajas tasas de gestación.

Otros autores no encuentran efectos beneficiosos en el aumento de la dosis de gonadotrofinas [127]. Del mismo modo, van-Hoff y cols [24] concluyeron que doblando la dosis de hMG no mejoraba la respuesta a la estimulación ovárica en bajas respondedoras, lo cual está de acuerdo con los conocimientos que refieren que el reclutamiento folicular ocurre al final de la fase lútea o en la fase folicular precoz del ciclo menstrual y en estas pacientes esta capacidad de reclutamiento estaría alterada.

Aunque no hay determinada una dosis máxima efectiva de gonadotrofinas, los estudios precedentes referidos sugieren que, en pacientes diagnosticadas de bajas

respondedoras, se mejora la estimulación ovárica con el aumento de la dosis de FSH pero no se aprecian beneficios de aumentar la dosis diaria de FSH por encima de 450 UI [128].

3.3. Combinación de citrato de clomifeno y hMG

El citrato de clomifeno es un antiestrógeno con acción a nivel hipotalámico; compete con el estradiol en su fijación a los receptores estrogénicos de las neuronas de los centros gonadotropos. Esto supone una anulación del feed-back negativo ejercido por los estrógenos endógenos, por lo que el hipotálamo reconoce un estado hipoestrogénico que le conduce a la secreción de GnRH, responsable de la liberación de FSH y LH hipofisarias. Para ejercer su acción, el clomifeno requiere la integridad de los mecanismos de feed-back y del sistema hipotálamo-hipófisis así como niveles previos estrogénicos suficientes que permitan ejercer su acción antagónica.

Esta combinación fue originariamente descrita por Edwards [129], que añadió hMG al citrato de clomifeno para compensar el hipoestrogenismo provocado por este último.

Las dosis utilizadas de citrato de clomifeno han variado según los autores, así como el día de comienzo de la administración. Marrs y cols [130] 1984, tras estimular la ovulación con clomifeno comenzando en distintos días del ciclo, concluyeron que, tanto el mayor número de ovocitos captados y embriones transferidos, como la menor tasa de cancelación se obtuvo cuando la administración se inició el día 5º del ciclo.

Algunos autores han observado mejoría en el resultado de la estimulación ovárica y, como consecuencia, en la tasa de gestación en pacientes pobres respondedoras tratadas con citrato de clomifeno y hMG al comparar aquéllas con otros grupos tratados con agonista de GnRH junto a hMG sola [131, 132].

Con los estudios referidos podemos concluir que el citrato de clomifeno junto a hMG es efectivo y menos costoso que los protocolos que utilizan agonistas de la GnRH, pero hemos de considerar las desventajas [22] de su uso: efecto antiestrogénico en el moco cervical y en el endometrio, con mayor incidencia de cancelación por pico endógeno de LH o por pobre respuesta del estradiol.

3.4. Regulación con análogos agonistas de la Gn-RH

Los análogos agonistas de la GnRH (GnRHa) son modificaciones en el decapeptido de la GnRH que ejercen el mismo efecto biológico que la molécula original, con una potencia muy superior y durante un tiempo mucho más prolongado. Cuando se administra el agonista se produce una estimulación a nivel hipofisario con liberación de FSH y LH; si el agonista sigue actuando se produce una regulación a la baja (“down-regulation”) resultando un estado de hipogonadismo hipogonadotropo que ha recibido el apelativo de “castración médica reversible” [133].

La utilización de los agonistas en reproducción asistida tiene su origen en el hipogonadismo obtenido en distintos tratamientos oncológicos con escasa toxicidad y escasos efectos secundarios [134].

El uso de los agonistas en la estimulación ovárica supone:

- evitar los picos endógenos de LH durante la fase folicular y la luteinización del ovócito, mejorando la respuesta al estímulo [135] [12] [136].
- disminuir los niveles de androstendiona, testosterona, estradiol y estrona; la producción de E₂ por las células de la granulosa es dependiente de las gonadotrofinas, requiriéndose FSH y LH para el comienzo de la esteroidogénesis [137, 138].
- aumentar el reclutamiento folicular en la liberación inicial de gonadotrofinas (“flare-up”) y producir una maduración folicular sincrónica con la administración ulterior de gonadotrofinas exógenas [139, 140].
- disminuir el porcentaje de cancelación y aumentar el porcentaje de gestación por ciclo y por transferencia [96, 140-142] en relación con los ciclos estimulados únicamente con gonadotrofinas.
- mejorar la calidad de los ovocitos y, por lo tanto de los embriones, por la disminución en los niveles de LH en el folículo y la disminución de los andrógenos intraováricos [140, 141].
- también se ha observado un efecto directo en el ovario modulando la esteroidogénesis y la maduración ovocitaria [134, 136, 143, 144]. Se

evidenció la presencia de agonista en el líquido folicular, con niveles proporcionalmente menores al sérico, a las 36 h de su administración [145]; este hecho podría constituir una prueba indirecta de su posible acción a nivel ovárico. La primera referencia a la existencia de receptores de GnRH en las células de la granulosa humana fue hecha por Latouche y cols [146].

- Parinaud y cols [144] habían sugerido que los agonistas de la LH-RH (buserelina) modulan la esteroidogénesis en la granulosa de los folículos preovulatorios mediante una acción estimulante a dosis bajas (sobre receptores de alta afinidad) y una acción inhibitoria a dosis altas (sobre receptores de baja afinidad), dependiendo del grado de maduración folicular.
- Yoshimura y cols [136], 1992 estudiando el efecto de los agonistas en el folículo y ovocito de conejo, observaron que los agonistas tienen efecto directo sobre el folículo y pueden desencadenar la maduración meiótica prematura del ovocito, sobre todo cuando se utilizan a dosis altas. Esto supone valorar adecuadamente el uso de agonistas a dosis altas puesto que puede resultar perjudicial en ciclos de estimulación ovárica controlada sobre la calidad de los ovocitos obtenidos.
- Estas observaciones permiten concluir que la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas puede mejorar si el efecto del agonista se reduce durante la estimulación [147], hecho a tener especialmente en cuenta en el contexto de pacientes con pronóstico de baja respuesta, cuya esteroidogénesis durante la estimulación se encuentra afectada.

- disminuir el porcentaje de abortos en pacientes diagnosticadas de síndrome de ovario poliquístico [148].

Está por determinar cual es el papel concreto que los receptores a GnRH presentes en el ovario tienen en la respuesta ovárica a un protocolo de inducción de la ovulación y cuál es la mejor dosis de agonista en los distintos protocolos de estimulación en pacientes pobres respondedoras. Por otra parte, muy verosíblemente,

distintas mujeres presentan distintos grados de sensibilidad a la neurohormona y sus agonistas.

Hughes y cols [140] realizaron un metanálisis en el que fueron incluidos 10 artículos comparando el estímulo con gonadotrofinas asociando o no GnRHa y 7 artículos comparando el estímulo con gonadotrofinas asociado a GnRHa bien en protocolo corto bien en protocolo largo, independientemente del análogo utilizado (acetato de leuprolide, acetato de buserelina, acetato de triptorelina). Como consecuencia, extrajo las observaciones siguientes que, por la heterogeneidad de los distintos artículos valorados no se pudieron extraer conclusiones definitivas:

- con el uso de los aGn-RH se consiguió evitar los picos de LH que, durante la estimulación con gonadotrofinas, ocasionan la cancelación
- fueron necesarias más dosis de gonadotrofinas en los ciclos en que se asoció el agonista pero se reclutaron mayor número de ovocitos
- se obtuvo mejor tasa de gestación por ciclo iniciado y por transferencia en los ciclos tratados con análogos que en protocolos sin análogos
- no observó diferencias estadísticamente significativas en la tasa de gestación al comparar el grupo de agonista en protocolo corto con el grupo de agonista en protocolo largo
- con el uso de los agonistas no parece aumentar la tasa de abortos.

Todos los autores han coincidido en señalar la mejoría en la estimulación, en pacientes pobres respondedoras, con el uso de agonistas de la GnRH pero también se ha sugerido la necesidad de aumentar la dosis de hMG durante la estimulación en estas pacientes, quizás por el papel supresor de los GnRHa en la esteroidogénesis ovárica [149] o por la excesiva supresión hipofisaria [150].

Para valorar la dosis de agonista útil en estimulación ovárica controlada, evitando los efectos secundarios de los mismos, Kowalik y cols [151] plantearon un estudio en el que incluyeron dos grupos de pacientes:

- grupo 1: pacientes con inicio de la administración del agonista (acetato de leuprolide, 1 mg/día) el día 8º de la fase lútea previa y disminución a la mitad tras comprobar supresión hipofisaria ($E2 < 50$ pg/mL)

- grupo 2: pacientes con el mismo protocolo de tratamiento pero el agonista se comienza administrando a razón de 0,5 mg/día.

Observaron que las mujeres del grupo 2 presentaban un aumento más rápido en los niveles de E₂, un mayor pico de E₂, y menor requerimiento de gonadotrofinas, consiguiéndose evitar, igual que el grupo 1, los picos prematuros de LH.

Los efectos secundarios e inconvenientes que podríamos atribuir a los agonistas pueden reflejarse en los siguientes: sofocaciones, cefaleas y fatiga sobre todo en los protocolos largos, necesidad de aumentar la dosis de gonadotrofinas de la estimulación [151, 152], aumento de la incidencia de formación de quistes de ovario sobre todo en los protocolos de agonista en la fase folicular temprana (Ritz 1990 K04.5), problemas de interferencia con una gestación inicial (ocurre en un 1% de casos [153] cuando el inicio del agonista se produce en la mitad de la fase lútea). Por estas razones, otros autores plantearon otras opciones terapéuticas como los anticonceptivos orales [154].

La dosis, la vía de administración y el tipo de agonista también han sido motivo de múltiples estudios. En el metanálisis realizado por Daya y cols [155] incluyendo 1253 ciclos de tratamiento no fueron observadas diferencias en la tasa de gestación al comparar mujeres tratadas con una formulación depot de agonista y las tratadas con dosis diaria de agonista.

Parinaud y cols [156] concluyeron que el uso de acetato de buserelina proporciona mayor supresión hipofisaria que el acetato de triptorelina.

Benadiva y cols [157] valoraron 3 protocolos distintos de tratamiento según el momento de inicio del agonista: uno con inicio el día 1 de la menstruación, otro el día 3 de la menstruación, simultáneamente al inicio de la administración de gonadotrofinas y otro sin agonista. Concluyeron que, en las pacientes tratadas con agonista desde el día 3º del ciclo, se obtenían mayor número de ovocitos y mayor número de embriones para transferir, junto a una menor tasa de cancelación que el resto de grupos estudiados.

Senoz y cols [158], estudiando pacientes tratadas con agonistas iniciados antes que la estimulación con gonadotrofinas concluyeron que la administración del agonista durante 10 días es suficiente para suprimir la producción endógena de gonadotrofinas.

Existen distintos protocolos de tratamiento con agonistas en función de variaciones en el comienzo de la administración (fase folicular temprana, fase lútea

precoz, fase lútea tardía,...), de la duración de la administración, de la dosis utilizada y de las variaciones de la misma en el curso del tratamiento.

La supresión hipofisaria obtenida con la administración de agonistas de la GnRH antes del comienzo de la administración de las gonadotrofinas permitió mejorar los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada en pacientes diagnosticadas de baja respuesta [159-161].

La administración de análogos agonistas puede ser iniciada durante la fase lútea del ciclo anterior al estímulo, consiguiéndose la supresión hipofisaria para, posteriormente, comenzar la administración de gonadotrofinas (protocolo largo); también puede iniciarse en la fase folicular temprana del ciclo de tratamiento (protocolo corto o "flare-up").

Gelety y cols [162] desarrollaron un estudio con el objetivo de conocer la respuesta hormonal a nivel hipofisario y a nivel ovárico a la administración de agonistas para determinar el momento ideal de inicio del tratamiento consiguiendo un adecuado reclutamiento folicular. Incluyeron en su estudio tres grupos de tratamiento, utilizándose, en los 3, acetato de leuprolide (1 mg/día) como agonista: 1) comenzando el día 3º de la fase folicular y manteniéndolo durante 5 días, 2) comenzando el día 8º de la fase lútea del ciclo anterior, tras comprobación del pico de LH y 3) comenzando el día 13º de la fase lútea del ciclo anterior. No observaron diferencias en el aumento de la amplitud y la frecuencia de los pulsos de LH según el día de administración del agonista, tampoco en el aumento de la FSH aunque sí observaron que la duración del aumento del nivel de FSH fue menor al administrar el agonista en la fase folicular (por una importante depleción al 4º día de administración de agonista). Respecto a las hormonas ováricas observaron lo siguiente: mayor aumento en los niveles de estrona y estradiol con agonistas en la fase folicular respecto a los otros dos grupos (sin diferencias entre estos últimos). Este efecto es debido al aumento de la acción de la LH endógena (provocado en fase folicular) sobre la teca y la granulosa, lo que provocaría, también, un aumento en la progesterona sérica y en los niveles de andrógenos y esto podría suponer un efecto deletéreo sobre el desarrollo del folículo [163]. Hay que hacer constar que el aumento en los andrógenos circulantes (androstendiona y, sobre todo, testosterona) con los agonistas en la fase lútea tardía es mayor que el observado con agonistas en la fase lútea media, lo cual favorecería la atresia folicular. Por lo tanto ni el

inicio de la administración de agonistas en la fase lútea tardía ni en la fase folicular conferiría ninguna ventaja sobre el comienzo con agonistas en la fase lútea media.

La administración de GnRHa durante la mitad de la fase lútea previa al estímulo para, a continuación, disminuir su dosis o suspender su administración durante la HOC ha sido usada en pobres respondedoras obteniendo mejores resultados en captación de ovocitos y porcentaje de gestación [160] [96], aunque la mejoría no fue tan importante [133] y otros autores señalaron la necesidad de utilizar mayores dosis de gonadotrofinas en estas pacientes [134].

Con el protocolo "flare-up" se consigue un aumento suprafisiológico en los niveles de gonadotrofinas, que es usado para mejorar el inicio de la estimulación ovárica [19].

McKenna y cols [133] plantearon distintos protocolos de administración de agonistas en pobres respondedoras: a) comienzo del agonista el día 21° del ciclo previo al estímulo, b) comienzo del agonista el día 14° del ciclo previo, y c) comienzo del agonista el día 2° del ciclo de estímulo). Obtuvieron mayor número de ovocitos que en anteriores ciclos de baja respuesta pero igual número de ovocitos que en pacientes normo-respondedoras, disminuyendo el porcentaje de cancelaciones.

Estos resultados coinciden con lo referido por Droesch y cols [96], quienes obtuvieron mayor número de ovocitos preovulatorios en pacientes estimuladas con protocolo largo de agonista (acetato de leuprolide 1mg/día desde día 21 de fase lútea ciclo anterior) que en pacientes estimuladas sin agonista, requiriendo las primeras mayor dosis de gonadotrofinas. A pesar de la mejoría en la estimulación referida, estos autores no observaron mejoría alguna de la tasa de abortos en pacientes tratadas con agonistas con niveles de FSH y LH normales al compararlas con aquéllas con niveles de LH mayores a FSH, lo cual les permitió inferir que si la causa de la baja respuesta se encuentra en el ovario y no en el eje hipotálamo-hipofisario, la terapia con agonistas no mejoraría la tasa de abortos.

Dirnfeld y cols [161]1991 observaron mayor número de ovocitos captados, mayor número de embriones desarrollados, mayor tasa de gestación y menor tasa de cancelación en pacientes con baja respuesta en ciclos anteriores, que fueron tratadas con agonistas desde la mitad de la fase lútea, disminuyendo la dosis al comienzo de la estimulación con hMG que en pacientes tratadas con agonistas al comienzo de la fase

folicular; quizás estas observaciones fueron debidas al mejor estado de hipogonadismo en el grupo primero con reducción de los niveles de LH y, por lo tanto, de andrógenos a nivel folicular.

3.4.1. Protocolos de utilización de agonistas

Las observaciones y las consideraciones que han sido expuestas han tenido como consecuencia que se utilice distintos tipos bien definidos de protocolo para el uso de análogos agonistas en fecundación in vitro.

I. Protocolo largo

Consiste en iniciar la administración del agonista en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior a la estimulación ovárica manteniéndose la dosis, durante la estimulación con gonadotrofinas, hasta la administración de la hCG.

Una desventaja es la interferencia con una gestación incipiente, publicada en un 1% de casos [153] aunque, si esto ocurre, se ha comprobado que no incrementa el riesgo de anomalías congénitas (hipospadias, labio leporino,...), que es, aproximadamente, de un 1,6% [155].

Bhattacharya y cols [164] realizaron un metanálisis incluyendo 10 estudios randomizados en el que compararon el efecto en la estimulación ovárica de la administración del agonista según protocolo largo con el observado con protocolo corto. Los resultados de su trabajo deben ser considerados con precaución ya que los estudios analizados no son rigurosamente uniformes en cuanto a metodología, aunque los sesgos de los estudios se repartían en ambos protocolos de forma uniforme.

No observaron ventajas significativas del protocolo largo frente al corto en tasa de gestación, coincidiendo con el resultado de un metanálisis previo desarrollado por Hughes [140], ni tampoco en la tasa de cancelación.

Biljan y cols [165], en un estudio prospectivo randomizado en el que fueron incluidas 91 pacientes, compararon los resultados en la estimulación del uso de agonistas según protocolo largo frente a agonistas según protocolo corto. Se observó mejor reclutamiento folicular, mejor captación ovocitaria y mejores tasas de fertilización y de gestación con el protocolo largo que con el protocolo corto. Concluyeron que la mayor supresión hipofisaria obtenida con el protocolo largo tenía

como consecuencia niveles más bajos de LH durante la fase folicular que repercutieron en la mejor respuesta a la estimulación gonadotropa.

Dentro del protocolo largo se pueden llevar a cabo modificaciones con la finalidad de obtener mejor respuesta ovárica, sobre todo para pacientes con diagnóstico de baja respuesta. Así:

a) Protocolo largo con disminución de la dosis de agonista a la mitad al iniciar las gonadotrofinas.

Feldberg y cols [91] establecieron 3 grupos de tratamiento: a) grupo 1 con administración de 3,75 mg de triptorelina en la mitad de la fase lútea, b) grupo 2 con administración de 0,5 mg/día de triptorelina desde la mitad de la fase lútea hasta el 2º día, tras la menstruación, disminuyéndose la dosis a partir de este momento a 0,1 mg/día y c) grupo 3, con administración de 0,1 mg desde el día 21º de fase lútea y, el día 2º tras la menstruación, disminuir a 0,05 mg/día.

Las mujeres de estos 3 grupos fueron estimuladas con 3 ampollas de FSH pura desde el día 3º del ciclo.

Se observó mejor respuesta en términos de tasas de fecundación y de gestación, en el grupo en que fueron utilizadas dosis más bajas de agonista (grupo 3) al compararlo con las pacientes estimuladas según el protocolo largo habitual (grupo 2) y con el protocolo depot (grupo 1). Ello parece debido a que se consiguió evitar los picos endógenos de LH y la excesiva supresión hipofisaria de las dosis altas de agonistas.

Olivennes y cols [149] analizaron los resultados obtenidos con 2 protocolos de estimulación: grupo A con administración de acetato de triptorelina 3,75 mg (agonista depot) y grupo B con administración de acetato de leuprolide 0,5 mg, en la mitad de la fase lútea y disminución del agonista a la mitad de dosis al comprobar la supresión hipofisaria para comenzar la estimulación con 4 amp/día de hMG. Obtuvieron mejor respuesta a la estimulación con menos días de la misma, menos dosis de hMG y mayor número de folículos desarrollados, ovocitos captados y embriones transferidos en el grupo B.

b) Protocolo largo con supresión del agonista al iniciar la estimulación con gonadotrofinas

El uso de agonista tiene un efecto adverso sobre la función del ovario, sobre todo en la esteroidogénesis ovárica [144, 149]. La calidad ovocitaria también parece depender de la dosis de agonista [166]. Por todo ello se puede concluir que la respuesta del ovario a la estimulación puede mejorar si se disminuye el efecto del agonista durante la misma [147].

Distintos autores han referido los beneficios y desventajas de este protocolo:

Faber y cols [17] definieron las mujeres con riesgo de baja repuesta como aquéllas que presentan un nivel de FSH basal ≥ 9 UI/L día 3° del ciclo y/o aquéllas que, en un ciclo de estimulación previo han hecho una baja respuesta ($E_2 \leq 600$ pg/mL y/o obtención de ≤ 4 ovocitos maduros). Identificaron así a 182 pacientes a las que estimularon en 224 ciclos bajo supresión hipofisaria mediante la administración de 0,5 mg de acetato de leuprolide desde la mitad de la fase lútea previa. La administración de agonista fue suspendida al inicio del tratamiento con gonadotrofinas, en el día 3° del ciclo. Establecieron 2 grupos: grupo A, estimulado con 6 ampollas de FSH pura al día y grupo B, estimulado con 4 ampollas de FSH pura y 2 ampollas de hMG.

Sólo en 1 caso se demostró un pico endógeno de LH; todos los demás ciclos presentaron una supresión hipofisaria adecuada a lo largo de la estimulación. No encontraron diferencias en el resultado de la estimulación al comparar los dos grupos: similares número de folículos desarrollados, ovocitos captados, embriones transferidos y tasa de gestación por ciclo o por transferencia.

Un metanálisis de Daya y cols [114] reveló una mejora en la tasa de gestación en pacientes tratadas con FSH únicamente. Con este protocolo de supresión del agonista se consiguió una adecuada tasa de gestación (32%) y los inconvenientes fundamentales fueron una tasa de cancelación del 12,5% y la necesidad de usar mayor dosis de gonadotrofinas.

Dirnfeld y cols [19], tras definir la baja respuesta como la de aquellas pacientes con $E_2 < 2000$ pmol/L y/o obtención de 4 o menos ovocitos maduros en un ciclo anterior de FIV, desarrollaron un estudio prospectivo con dos grupos de pacientes: grupo 1, en el que el agonista (acetato de buserelina) fue iniciado en la mitad de la fase lútea anterior al estímulo y suspendido al inicio de la administración de gonadotropinas

y grupo 2 (grupo control) en el que el agonista fue iniciado en la mitad de fase lútea anterior al estímulo y mantenido hasta la administración de hCG. La estimulación ovárica se hizo con hMG y/o FSH hasta obtener 3 o más folículos de 18 mm en ambos grupos.

Observaron mayor porcentaje de cancelación en las pacientes del grupo 1. Concluyeron que el cese de análogos al comienzo del estímulo no ofrece mejores resultados que el protocolo largo convencional, pero a pesar de no existir mejora en los resultados, con una meticulosa selección de las pacientes, sobre todo aquellas con FSH <12 mUI/mL, puede ofrecer beneficios a la estimulación.

García-Velasco y cols [167] incluyeron 70 pacientes en un estudio destinado a comparar los resultados de la estimulación en dos grupos de tratamiento en los que la administración del agonista se inició en la fase lútea previa: grupo 1 (34 pacientes), en que se suprimió el agonista al comienzo de la menstruación y grupo 2 (36 pacientes) con administración continua del agonista hasta la administración de hCG. Utilizó acetato de leuprolide 1 mg/día. Las dosis iniciales de gonadotrofinas fueron similares: 3 ampollas de FSH pura y 1 ampolla de hMG.

En el grupo 1 (protocolo stop) se redujo el número de ampollas de gonadotrofinas requeridas y se obtuvo mayor número de ovocitos maduros. No se observó diferencias en las tasas de cancelación, gestación ni implantación. Se asumió que la tasa de cancelación en el protocolo stop no se debió a picos endógenos de LH, ya que se ha comprobado que la supresión del agonista realizada en la fase folicular es efectiva de 16 a 22 días después de su cese [168].

Aunque sin una demostración formal, ha sido sugerido que las mejoras observadas al suprimir precozmente la administración del agonista podrían deberse a un efecto directo de los agonistas de la GnRH en el ovario por la presencia de receptores específicos en el mismo [146].

Algunos autores postularon que el desarrollo folicular depende del adecuado flujo vascular para la distribución de las gonadotrofinas [169]; con la supresión hipofisaria se produciría una disminución del flujo vascular ovárico y, al retirar la influencia del agonista (protocolo stop), mejoraría el flujo ovárico y folicular y, por lo tanto, el número de ovocitos recuperados tras estimulación.

García-Velasco y cols [167] concluyeron que la administración de altas dosis de gonadotrofinas en protocolo stop permitió obtener un número mayor de ovocitos, por lo que pacientes bajas respondedoras con niveles de FSH basales normales podrían beneficiarse del tratamiento mediante este tipo de administración del agonista.

Pinkas y cols [170] estudiaron 39 pacientes diagnosticadas de baja respuesta sometidas a un tratamiento con agonista (acetato de nafarelina) desde la mitad de la fase lútea hasta el inicio de la menstruación, comparándolas con un total de 60 ciclos previos de estimulación de las mismas pacientes con protocolo largo convencional y protocolo corto. Observaron, con diferencias estadísticamente significativas, mayor número de ovocitos captados y de embriones transferidos y mayor tasa de gestación en las pacientes con la supresión del agonista. Concluyeron que el protocolo de agonista suprimiéndolo previamente a la administración de gonadotrofinas constituía una buena alternativa de tratamiento en pacientes con baja respuesta, ya que consiguió beneficios en la estimulación y no produjo un aumento en la tasa de cancelación por picos prematuros endógenos de LH.

Schachter y cols [147] compararon los resultados obtenidos en 36 pacientes sometidas a un protocolo largo de acetato de nafarelina (200 µg/inhalación 3 veces al día) más hMG con otro ciclo de tratamiento en el que, a estas mismas pacientes, que habían sido diagnosticadas de baja respuesta, se administró nafarelina en protocolo largo pero suspendido al 5º día de la administración de la hMG.

No apreciaron una mayor tasa de cancelación al suspender el agonista por los picos endógenos de LH ya que la ausencia de agonista hasta la punción no fue mayor de 7 días, y se observó un mayor número de embriones transferidos con una mejor morfología de los mismos.

II. Protocolo corto

Consiste en la administración del agonista al inicio de la fase folicular y mantenimiento del mismo durante la estimulación con gonadotrofinas hasta la administración de hCG. Tiene la ventaja del aumento inicial de las gonadotrofinas producido por el efecto “flare-up” de los agonistas.

San Román y cols [176] llevaron a cabo un estudio prospectivo comparando 2 grupos de tratamiento. En el grupo 1 se administraron agonistas de GnRH (1 mg/día de acetato de leuprolide) desde el día 21 de la fase lútea previa y, cuando se consiguió la

supresión hipofisaria, se disminuyó la dosis de agonista a la mitad y se inició el tratamiento con hMG. En el grupo 2 se inició la administración de 0,5 mg/día de acetato de leuprolide el día 3° del ciclo, al mismo tiempo que la estimulación con hMG.

Observaron niveles elevados de LH durante más tiempo en la estimulación en el grupo 2, siendo éstos los responsables del aumento en los niveles de testosterona y progesterona circulantes antes de la captación ovocitaria que, como consecuencia, en opinión de Gelety y cols, alterarían la calidad ovocitaria [162]. Aunque en su estudio San Román y cols no observaron estas alteraciones en la calidad ovocitaria, siendo las características del ovocito y del embrión parecidas en ambos grupos analizados. No encontraron diferencias en la tasa de gestación aunque si observaron mayor número de abortos en las pacientes tratadas con el "flare regimen" posiblemente justificados por alteraciones bioquímicas en el ovocito y el embrión así como en la receptividad endometrial.

Padilla y cols [171] analizaron el efecto de altas dosis de FSH y hMG con protocolo corto (acetato de leuprolide) en 284 pacientes diagnosticadas de baja respuesta en función del test de estimulación con agonistas de la GnRH descrito en 1990 [102]. Establecieron 3 grupos de tratamiento: grupo 1 constituido por 177 pacientes estimuladas con protocolo corto de acetato de leuprolide y encuadradas dentro del grupo de normo-respondedoras definido anteriormente, grupo 2 formado por 53 pacientes diagnosticadas de baja respuesta y tratadas con protocolo corto de acetato de leuprolide y altas dosis de FSH (150 UI/día) y hMG (150 UI/día) y grupo 3 formado por 54 pacientes con protocolo largo de acetato de leuprolide encuadrables en el grupo en que, tras el test del agonista, se produce una elevación progresiva del E₂.

Observaron que los niveles de E₂ y el número de ovocitos obtenidos fueron menores en las pobres respondedoras con protocolo corto y altas dosis de gonadotrofinas; sin embargo, las pacientes que desarrollaron una respuesta ovárica adecuada mostraron tasas de fecundación y de gestación similares a las normo-respondedoras y a las mujeres tratadas con protocolo largo de agonista. También señalaron que la tasa de cancelación fue más alta en las pobres respondedoras. La conclusión del estudio fue que el protocolo corto junto a altas dosis de gonadotrofinas puede ser una alternativa a las pacientes diagnosticadas de bajas respondedoras

III. Protocolo de estimulación inicial con agonista ("flare up")

El protocolo ultracorto consiste en administrar el GnRH α los días 3 $^{\circ}$, 4 $^{\circ}$ y 5 $^{\circ}$ de la fase folicular, con lo que se disminuye la supresión ovárica, referida para los protocolos largo y corto, y se obtiene un estímulo ovárico adicional consecutivo a la liberación de gonadotrofinas endógenas causada por el agonista.

Esta posología del agonista produce un aumento endógeno en las gonadotrofinas cuya intensidad no es controlable, pero la desensibilización hipofisaria no se produce hasta, aproximadamente, los 5 días de la administración del GnRH α [172].

Algunos autores [173, 174] han obtenido con éstos regímenes un aumento en las tasas de implantación y de gestación y una disminución en la tasa de cancelación.

Estos regímenes también han supuesto mayor número de ovocitos degenerados o de peor calidad, junto al rescate del cuerpo lúteo del ciclo anterior con el consiguiente aumento en los niveles de progesterona circulantes [175].

En general, han supuesto peores respuestas a largo plazo; la razón de estos resultados ha sido justificada por San Román y cols [176] por un aumento de la LH sérica al comienzo de la fase folicular por el GnRH α , lo que no ocurre en pacientes que comienzan el análogo en la mitad de la fase lútea anterior al estímulo. El aumento de LH se acompaña de un aumento de la progesterona y de la testosterona, lo que produce una inhibición de la aromatasas de las células de la granulosa que es la responsable de la presencia de folículos atrésicos [162]. Este efecto puede ser por acción directa de GnRH α sobre la secreción de LH y/o por rescate del cuerpo lúteo del ciclo anterior.

Brzysky y cols [177] analizaron el resultado de la administración de 1 mg/día de acetato de leuprolide, comenzando el día 3 $^{\circ}$ del ciclo simultáneamente a las gonadotrofinas, en 12 pacientes diagnosticadas de baja respondedoras y ya tratadas con distintos protocolos de estimulación. Concluyeron que este protocolo no mejora la respuesta folicular, ni el número de ovocitos, ni la tasa de gestación y, por el contrario, favorece el aumento de folículos atrésicos.

Katayama y cols [174], utilizando igual protocolo que Brzysky, pero en 7 pacientes únicamente, no apreció mejoría en la estimulación y en la tasa de gestación al comparar los resultados a los obtenidos utilizando un protocolo de agonista iniciado en la mitad de la fase lútea previa.

Toth y cols [173] llevaron a cabo un estudio comparando dos grupos: a) un grupo con protocolo corto con administración de acetato de leuprolide (1 mg/día) los días 2, 3 y 4 del ciclo y disminuyendo la dosis a la mitad el día 5, para continuar así hasta la administración de hCG; la administración de FSH o hMG comenzó el día 4º del ciclo y b) otro grupo con supresión con agonista (acetato de leuprolide) 0,5 mg/día desde el 22º de fase lútea previa hasta la administración de hCG. Ambos grupos se dividieron en dos según que los valores de FSH basal fueron < 0 o \geq de 15 UI/L.

Observaron que el protocolo corto supuso peor respuesta ovárica y peores resultados reproductivos que el protocolo de supresión en paciente con FSH < 15 UI/L. Sin embargo, en pacientes con FSH ≥ 15 UI/L, la tasa de gestación fue mejor cuando se utilizó el régimen flare que en las pacientes con protocolo largo, a pesar de que fue captado un menor número de ovocitos. Esto podría justificarse en función de mejoras en la calidad de los ovocitos, de la receptividad endometrial o de ambos.

En un estudio prospectivo que incluyó 80 pacientes, Barri y cols [18] observaron que ni el protocolo "flare up" ni el protocolo corto mejoran los resultados si se comparan con el protocolo largo.

Ron-El y cols [175] compararon los resultados obtenidos en dos grupos de tratamiento, cada uno de los cuales incluía 92 ciclos. En uno de ellos se utilizó el protocolo ultracorto (acetato de triptorelina 0,5 mg/día, 3 días) y en el otro el protocolo largo (acetato de triptorelina 3,75 mg en la fase folicular temprana o la fase lútea media).

Observaron que en el primer grupo las concentraciones altas, tanto de LH como de progesterona, entre los días 2º a 7º del ciclo de estímulo, tuvieron un efecto deletéreo sobre el desarrollo del ovocito que se tradujo en un mayor número de ovocitos inmaduros, con desarrollo de menos embriones de buena calidad y, por lo tanto, menor tasa de gestación. No encontraron diferencias en la tasa de cancelación en ambos grupos.

Spandorfer y cols [178] trataron a 450 pacientes mediante el siguiente protocolo: 1 mg de acetato de leuprolide los días 2º, 3º y 4º de la fase folicular del estímulo; el día 5º reducción de la dosis de leuprolide a la mitad, manteniéndose hasta la administración de hCG. La administración de gonadotrofinas comenzó el día 3º del ciclo con 450 UI/día de FSH o 300 UI/día de FSH más 2 amp de hMG.

Observaron una tasa de cancelación de 24% y una tasa de gestación por ciclo iniciado de 20,4%; las pacientes cuyo nivel de E₂ aumentó al doble tras el agonista presentaron menor porcentaje de cancelación (13,6% vs 35,6%) pero no se observaron diferencias en el desarrollo de la gestación en ambos grupos si no hubo cancelación. Spandorfer y cols señalaron que el aumento en los niveles de E₂ desde el día 2° al 3° de estímulo fue indicativo de menor tasa de cancelación, mayor nivel de E₂ el día de hCG, mayor número de ovocitos captados, pero no marcó diferencias estadísticamente significativas en la tasa de gestación.

Karacan y cols [179] analizaron el resultado del tratamiento seguido por 111 pacientes diagnosticadas de baja respuesta previa, al haber sido estimuladas con gonadotrofinas bajo supresión hipofisaria con un protocolo largo de agonista.

Todas recibieron acetato de leuprolide (0,5 mg/día) a partir del día 2 del estímulo. Observaron un 39% de cancelación por falta de respuesta en estas pacientes, siendo la tasa de gestación por ciclo iniciado fue de 9,9%; sin embargo, la tasa de recién nacidos vivos fue del 2,5%.

Concluyeron que la escasa mejoría en la tasa de gestación no se ve reflejada en la tasa de recién nacido vivo de estas pacientes, bajas respondedoras.

En resumen, estos protocolos en los que se intenta aprovechar la acción estimulante de la secreción gonadotropa de los agonistas de GnRH pueden aportar algún beneficio a las pacientes en las que no se hayan obtenidos buenos resultados con otros tratamientos [173].

IV. "Microdose Flare" Agonista estimulante en microdosis

Diversos estudios han llegado a la conclusión que la desensibilización de la hipófisis consecutiva al tratamiento con GnRHa puede ser dosis dependiente. La disminución de la dosis de GnRHa produce efectos beneficiosos en los resultados por provocarse un menor aumento de LH, implícito, por otra parte, a estos tratamientos [180-182].

Ben-Rafael y cols [150] estudiaron un grupo de 106 mujeres diagnosticadas de baja respuesta en dos ciclos previos consecutivos, sometiéndolas a tres tipos de tratamiento: 1) supresión hipofisaria con una dosis de 3,75 mg de acetato de triptorelina, administrada en la mitad de la fase lútea previa, 2) supresión hipofisaria con 0,5 mg de acetato de triptorelina al día desde la mitad de la fase lútea y 0,1 mg al partir del 2° día

de estimulación y 3) supresión hipofisaria con 0,1 mg de acetato de triptorelina desde día 21 de la fase lútea, disminuyendo a 0,05 mg/día el día 2º de la estimulación. Todas las pacientes fueron estimuladas con hMG según dosis individualizadas.

El grupo de pacientes tratadas con minidosis de agonista tuvo menor tasa de cancelación y mayor número de ovocitos y embriones transferidos, así como mayor tasa de gestación.

Los autores sugirieron que la mejora en la tasa de implantación por embrión en pacientes tratadas con agonistas en minidosis sugiere una mejor calidad embrionaria, una mejor receptividad endometrial o ambos.

Scott y cols [180] estudiaron el impacto de las microdosis de GnRH α en bajas respondedoras. Llevaron a cabo un tratamiento con 20 μ g de acetato de leuprolide cada 12 horas desde el día 3º del ciclo de estímulo e iniciaron la administración exógena de gonadotrofinas el día 5º del ciclo. Estas pacientes habían tomado anticonceptivos durante el ciclo anterior. Compararon los resultados con un protocolo largo de agonista (1 mg de acetato de leuprolide desde el día 21º del ciclo previo al estímulo) y llegaron a las siguientes conclusiones:

- la microdosis de agonista (1/5 de la dosis normal) es capaz de inducir un aumento endógeno de las gonadotrofinas clínicamente significativo (mayor pico de E2, mayor número de ovocitos captados, mayor número de embriones transferidos)
- este aumento es adecuado para iniciar una respuesta multifolicular que es mayor que la observada en las pacientes tratadas con el protocolo largo referido
- las microdosis de agonista fueron suficientes para suprimir los picos prematuros de LH.

El mismo grupo, completando el estudio referido anteriormente, observó que existía un aumento en el número de folículos reclutados pero que sólo mejoraba la tasa de gestación en las pacientes diagnosticadas de baja respuesta pero con tests de screening de reserva ovárica dentro de la normalidad [16].

Surrey y cols [182] valoraron el resultado de utilizar el protocolo de microdosis de agonista en 34 pacientes, comparándolo con el protocolo largo habitual.

Administraron un tratamiento anticonceptivo durante 21 días para, tres días después de terminarlo, comenzar la administración de 40 µg/día de acetato de leuprolide; a los 2 días de comenzada la administración del agonista se inició la estimulación con gonadotrofinas.

Observaron menor tasa de cancelación y mayor tasa de gestación con el protocolo de microdosis. En este protocolo se evitan elevaciones en los andrógenos circulantes y la progesterona que se producía con el protocolo “flare régimen”. Por otra parte, al administrar anticonceptivos en el ciclo anterior se elimina el posible rescate del cuerpo lúteo del ciclo anterior que puede producir el agonista.

Leondires y cols [183] compararon dos grupos de tratamiento: uno con agonistas en protocolo largo, disminuyendo la dosis a la mitad al inicio de la administración de gonadotrofinas; otro con anticonceptivos hasta el inicio de la menstruación seguidos de la administración de un agonista a dosis de 20 µg/12h durante 3 días para, al 5º día del ciclo iniciar la estimulación con gonadotrofinas.

No observaron diferencias en las variables que definieron la estimulación (número de ampollas de FSH, días de estimulación, niveles de estradiol alcanzados, número de ovocitos obtenidos), no se produjeron diferencias en la tasa de gestación; la tasa de cancelación fue más elevada en el grupo tratado con microdosis de agonista.

V. Modificaciones en el tipo de agonista utilizado

Barri y cols [18] observaron que utilizando acetato de leuprolide se consumen menos gonadotrofinas, se obtiene un nivel más alto de E₂ y mayor número de ovocitos y embriones que utilizando buserelina

VI. Modificaciones de la técnica ICSI

Algunos autores [184] propusieron la práctica sistemática de eclosión asistida para mejorar la tasa de implantación de los embriones obtenidos en pacientes diagnosticadas de baja respuesta.

3.5. Tratamientos adyuvantes

3.5.1. Hormona de crecimiento

A la hormona de crecimiento se le ha atribuido un papel en la regulación del crecimiento folicular y ha sido investigado su uso en la mejora de la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas.

Adashi y cols [185] señalaron el papel del insulin growth-factor (IGF-1) en el desarrollo folicular en sus estudios sobre células de granulosa en ratas. El IGF-1 tiene una acción sinérgica con la FSH sobre la granulosa a través de estimulación de la actividad aromatasas, inducción de receptores de LH, síntesis de prostaglandinas y proteoglicanos y acumulación de AMP cíclico. La producción de IGF-1 es dependiente de la hormona de crecimiento (GH)

Hsu y cols [186] estudiaron los efectos de FSH, LH y E₂ sobre cultivos de células de granulosa porcina y establecieron que las gonadotrofinas y el E₂, a través del AMP cíclico, estimulan la secreción de IGF-1 en las células ováricas, el cual actuaría como mecanismo autocrino en el crecimiento y la diferenciación folicular.

Se ha evidenciado una actividad conjunta en la maduración folicular tanto de la FSH como de la GH [187].

Barreca y cols [188], estudiando cultivos de células de granulosa ovárica humana obtenidas tras aspiración folicular en pacientes sometidas a tratamiento de inducción de la ovulación con FSH y asociando GH, demostraron que el efecto estimulador de la GH en la función ovárica depende no solamente del aumento de los niveles de IGF-1 ováricos, sino también del efecto directo de la GH sobre las células de la granulosa, sensibilizándolas a los distintos factores insulínicos de crecimiento.

El test de clonidina (300 µg oral) permite testar la reserva de GH hipofisaria, considerándose normal un pico de GH en plasma igual o superior a 10 µg/L. Menashe y cols [189] observaron que pacientes con test de clonidina normal presentan buena respuesta a la hMG; así, el test de clonidina puede servir para establecer un pronóstico sobre la sensibilidad de las pacientes a las gonadotrofinas en la estimulación ovárica. Otros autores defendieron el test de clonidina como un buen factor predictivo de la terapia combinada (GH y hMG) en pacientes diagnosticadas de baja respuesta [190].

Distintos protocolos de estudio han valorado la estimulación ovárica añadiendo directamente GH o a través de GH-RH.

Homburg y cols [187] desarrollaron un estudio randomizado a doble ciego de 16 pacientes incluidas en tratamiento de reproducción asistida: 8 tratadas con hMG y placebo y 8 tratadas con hMG y GH a dosis de 24 UI/día a días alternos durante la estimulación. Los resultados demostraron una reducción del 30% en el total de dosis de gonadotrofinas requeridas para inducir la ovulación. Esto implica que el uso de GH sensibiliza al ovario a la acción de las gonadotrofinas, aumentando la respuesta de éste, sin que se observen efectos secundarios adversos (tensión arterial, alteraciones en la secreción de insulina, ...).

Owen y cols [191] observaron escasa mejoría en el número de folículos desarrollados en 20 pacientes tratadas con GH en protocolo de estimulación ovárica con gonadotrofinas. Afirmaron que únicamente en las pacientes diagnosticadas de ovario poliquístico se aprecia que la administración de GH supone mayor número de folículos reclutados y niveles mayores de E₂ el día de HCG.

Dor y cols [14] desarrollaron un estudio prospectivo, randomizado, doble ciego, para demostrar el efecto de asociación de GH a la estimulación ovárica con agonista en protocolo corto (acetato de triptorelina 0,1 mg/día), FSH y hMG. Se analizaron dos grupos de 7 pacientes cada uno, además, uno de los grupos recibió GH y el otro placebo.

No observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de ampollas de gonadotrofinas utilizadas, folículos desarrollados, ovocitos captados, embriones transferidos ni en la tasa de fecundación. No se observó aumento del E₂ ni de IGF-1 en suero ni en líquido folicular en pacientes tratadas con GH, en contraposición con las observaciones previas de Hughes y cols [73]. Concluyeron que la asociación de GH a la estimulación con gonadotrofinas no mejora la estimulación ovárica en pobres respondedoras.

En el estudio multicéntrico europeo y australiano desarrollado en 1995 [192] fueron incluidas 64 pacientes menores de 35 años afectas de amenorrea por hipogonadismo hipogonadotrofo. Se las distribuyó en 4 grupos:

- grupo 1: estimulación con hMG y placebo

- grupo 2: estimulación con hMG y 4 UI/día de GH (IM, cada 2 días, un máximo de 7 inyecciones en 2 semanas)
- grupo 3: hMG y GH 12 UI/día
- grupo 4: hMG y GH 24 UI/día.

No se observaron diferencias en la estimulación entre los distintos grupos. Se concluyó que el tratamiento con GH en pacientes con hipogonadismo hipogonadotropo mejora la respuesta ovárica a la estimulación, produciendo una disminución en el número de ampollas de hMG necesarias (en el grupo 4 hasta un 39% de disminución), pero no consiguieron determinar la dosis mínima eficaz para mejorar la respuesta ovárica. Apreciaron un aumento de IGF-1 al aumentar las dosis de GH utilizadas pero persiste la duda respecto a si la mejoría en la respuesta ovárica es por acción directa de la GH o a través de IGF-1.

Cuando se ha querido analizar el efecto de la GH en la estimulación ovárica de las pacientes diagnosticadas de bajas respondedoras los resultados también han sido poco concluyentes

Hugues y cols [73] intentaron determinar si la administración de GH-RH mejora la respuesta a las gonadotrofinas en mujeres diagnosticadas de baja respuesta. En su estudio fueron incluidos dos grupos de pacientes de 12 miembros cada uno. El grupo 1 fue tratado con protocolo corto de agonistas junto a hMG y el grupo 2 con protocolo corto de agonista, hMG y 500 µg sc c/12h de GH-RH desde el día 2 hasta la administración de HCG.

Concluyeron que en las pacientes tratadas con GH-RH se produce una mejora en la producción de E₂ folicular pero no observan variaciones en las necesidades de gonadotrofinas. La GH-RH produce un aumento en la producción de GH hipofisaria, pero los niveles de IGF-1 aumentan escasamente ya que se ha visto que el E₂ a altas concentraciones disminuye los niveles de IGF-1 en plasma por disminución de la expresión del gen del IGF-1 en el hígado.

Levy y cols [193] estudiaron 20 pacientes diagnosticadas de baja respuesta para valorar si la asociación de GH a la hMG mejora la estimulación ovárica. Establecieron 2 grupos: 10 pacientes tratadas con hMG y GH y 10 pacientes tratadas sólo con hMG. Todas las pacientes fueron tratadas con agonista depot previo a la estimulación con hMG. El nivel basal medio de FSH fue de 12 UI/L. No consiguieron mejorar la

respuesta ovárica en las pacientes tratadas con GH. Se realizaron tests de clonidina y de insulina para valorar la función GH de la hipófisis y se observó que no existía correlación entre los resultados de los tests de función hipofisaria y la respuesta ovárica a las gonadotrofinas.

Suikkari y cols [194], en un estudio randomizado a doble ciego, incluyeron a 22 mujeres diagnosticadas de bajas respondedoras que fueron tratadas mediante protocolo corto de agonista (acetato de leuprolide) y hMG, divididas en 3 grupos: en el grupo 1, de 6 pacientes, se asoció placebo, en el grupo 2, de 10 pacientes, se asoció GH (4 UI/día) y en el grupo 3, de 6 pacientes, se asoció también GH a dosis de 12 UI/día.

No observaron diferencias en la estimulación en los distintos grupos; únicamente se observó aumento de IGF-I en el grupo 3 respecto a los demás. Concluyeron que la adición de GH a los protocolos de estimulación ovárica no mejora esta última.

Schoolcraft y cols [181] desarrollaron un estudio en el que incluyeron a 32 pacientes diagnosticadas de baja respuesta con el fin de demostrar los beneficios de administración de GH. Se hicieron dos grupos de tratamiento: el grupo 1 fue tratado con agonista (protocolo largo con disminución a la mitad al comienzo de las gonadotrofinas) junto a FSH y asociación de GH (4UI/día IM hasta administración de HCG). El grupo 2 fue pretratado con anticonceptivos y 3 días antes de terminar éstos iniciaron la administración de acetato de leuprolide a dosis de 40 µg sc/12h junto a GH (4 UI/día IM) continuándolos hasta HCG; la estimulación se hizo con FSH. En el grupo 2 obtuvieron mejor respuesta a la estimulación en el nivel de E₂, el número de ovocitos y menos tasa de cancelación. Así, este protocolo puede ser útil para pacientes en donde otros protocolos de tratamiento no han sido eficaces, pero al utilizar distintas pautas unidas en un mismo protocolo no se conoce adecuadamente la influencia de cada una de ellas: las microdosis de agonista mejoran la respuesta ovárica y con el uso de anticonceptivos se evita el rescate del cuerpo lúteo y la producción de progesterona del mismo

La producción hipofisaria de GH está controlada por el GH-RH el cual puede tener también un efecto directo sobre el ovario. Para valorar la respuesta a la estimulación ovárica asociando el GH-RH, Howless y cols [195] incluyeron en un estudio multicéntrico, randomizado, doble ciego 196 pacientes diagnosticadas de baja respuesta. Establecieron 2 grupos: grupo 1: 96 pacientes tratadas según protocolo largo

de agonista y FSH 300 UI/día y asociación de GH-RH (500 µg/dos veces al día, subcutánea) y grupo 2: 100 pacientes tratadas con protocolo largo de agonista y FSH 300 UI/día. El grupo 1 presentó mayores concentraciones de GH e IGF-I séricas que el grupo 2, pero no se observó mejoría en la respuesta ovárica a la FSH con la asociación de GH-RH (en términos de número de folículos desarrollados, número de ampollas de FSH necesarias y tasa de gestación).

La conclusión de los distintos estudios valorados es que si se administra GH durante la estimulación se potenciará el efecto de la FSH, pero como recientes estudios han sido incapaces de demostrar este beneficio en todas las pacientes (sólo para casos determinados como el ovario poliquístico y éstas no lo requieren) y no se conoce la dosis mínima eficaz, se desaconseja el uso de la GH [23, 128]. Por otra parte, se complica y encarece en exceso la estimulación.

3.5.2. Administración de anticonceptivos

En los protocolos de hiperestimulación ovárica controlada la supresión hipofisaria previa se ha considerado fundamental para establecer un crecimiento folicular sincrónico y mejorar los niveles séricos de E₂. Con ella se evitan los picos endógenos de LH.

Dentro de los posibles recursos terapéuticos para conseguir la supresión hipofisaria se dispone de los anticonceptivos orales en el ciclo previo a la estimulación.

Gonen y cols [154] desarrollaron un estudio para valorar si la supresión hipofisaria conseguida con la administración de anticonceptivos orales mejora los resultados de la estimulación ovárica. Valoraron los resultados obtenidos en 2 grupos de tratamiento: el grupo 1 incluyó 181 ciclos de tratamiento con supresión previa con anticonceptivos orales y el grupo 2 incluyó 113 ciclos sin supresión previa. En ambos se realizó la estimulación ovárica con citrato de clomifeno (100 mg/día del 5º al 9º día de ciclo) y hMG a partir del 5º día del ciclo (el día 1º del ciclo fue considerado a partir del 3º tras la última píldora anticonceptiva).

En el grupo 1 aumentó el número de ovocitos captados, disminuyeron los picos endógenos de LH y mejoraron las tasas de fecundación y de gestación.

Otros autores [196] reflejaron mayor porcentaje de cancelación cuando los anticonceptivos se usan durante 30 días, frente al grupo de uso durante sólo 15 días.

Gonen y cols [154] señalaron que el inicio de la estimulación el día 5° del ciclo (como plantea en su estudio) mejora los resultados al compararlos con los que inician el período de estímulo el día 1° tras la última píldora. Estos mismos autores defendieron que el inicio del estímulo el 5° día (8° tras cese de los anticonceptivos) favorece que los niveles de gonadotrofinas vuelvan a rangos que mejoren el reclutamiento folicular, hecho también sugerido por Benadiva [197] y concluyeron que el uso de anticonceptivos orales previos a la estimulación ovárica debe ser considerada como otra opción terapéutica.

Lindheim y cols [198] valoraron los resultados obtenidos en 69 pacientes diagnosticadas de pobres respondedoras y tratadas según 4 protocolos de tratamiento: el grupo I (n=22) fue tratado con anticonceptivos durante 3 semanas, el grupo II (n=26) con protocolo largo de supresión hipofisaria, disminuyendo a la mitad la dosis de agonista al inicio de la estimulación, el grupo III (n=11) con protocolo corto de agonista y el grupo IV (n= 10) con gonadotrofinas sólo.

Observaron que los resultados del grupo I no mejoran sustancialmente los datos de la estimulación ovárica, pero como se aprecia una tasa de gestación del 30% (mayor a la de los otros grupos) y una tasa de cancelación 23% (menor a la de los otros grupos) concluyeron que se ha de considerar el uso de los anticonceptivos orales en el ciclo previo a la estimulación como un protocolo alternativo en pacientes pobres respondedoras.

Biljan y cols [199] llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo fue determinar el efecto del pretratamiento con anticonceptivos en la formación de quistes durante la supresión ovárica con agonistas de la GnRH. Establecieron 2 grupos: el grupo 1 incluyó 51 pacientes tratadas con anticonceptivos durante 15 días, el día 16 comenzaron el agonista (acetato de buserelina 500 µg/día) según protocolo largo. El grupo 2 incluyó 51 pacientes tratadas con acetato de buserelina en protocolo corto comenzando el 2° día del ciclo de estimulación. Ninguna de las pacientes tratadas con anticonceptivos desarrolló quistes de ovario durante la estimulación y se disminuyó el tiempo requerido para obtener la supresión hipofisaria adecuada, con lo cual, al recibir menor dosis de agonista se apreció una respuesta ovárica más rápida. También se obtuvo una tasa de gestación mayor en las pacientes pretratadas con anticonceptivos. Concluyeron que el tratamiento con anticonceptivos previo al ciclo de estímulo es una alternativa a valorar en pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida.

En resumen, la administración de AO en el ciclo previo al de HOC favorece la abolición del crecimiento del cuerpo lúteo, eliminando los picos de LH, disminuyendo las necesidades de gonadotrofinas y la formación de quistes [154, 199].

3.5.3. Administración de L-Arginina

La consideración de los aspectos hemodinámicos, tanto uterinos como ováricos, durante el estudio de la reproducción humana, lleva a determinar que la mejora en la vascularización de los folículos ováricos es una de las responsables en la selección y maduración folicular tanto en ciclos espontáneos como en ciclos estimulados para FIV [200]. Entre los factores reguladores del flujo ovárico se encuentran las gonadotrofinas, las hormonas esteroideas, las prostaglandinas, el óxido nítrico,... El óxido nítrico no tiene un papel claramente determinado en la maduración folicular y la ovulación pero podría participar en vasodilatación periovulatoria ovárica necesaria para una adecuada ovulación [201].

La L-Arginina es un precursor del óxido nítrico. Battaglia y cols [202] llevaron a cabo un estudio prospectivo con el objetivo de determinar la mejora que la administración de L-Arginina (precursor del óxido nítrico, potente vasodilatador) produce en el flujo uterino y folicular, y en la respuesta ovárica a las gonadotrofinas en mujeres diagnosticadas de pobres respondedoras. Incluyeron en su estudio 2 grupos: el grupo 1 contó con 17 pacientes tratadas mediante protocolo corto de acetato de triptorelina (0.1 mg/día desde el día 1º del ciclo hasta HCG) y FSH pura y el grupo 2 con 17 pacientes tratadas con el mismo protocolo corto referido, FSH pura y L-Arginina (16 mg/día vía oral durante todo el periodo de estimulación).

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en número de ampollas de FSH utilizadas y número de días de estimulación. Sí hubo diferencias en número de folículos desarrollados, número de ovocitos captados y número de embriones transferidos a favor del grupo de L-Arginina. En el grupo 2 se apreciaron niveles mayores de L-Arginina en el líquido folicular, lo cual favorece la permeabilidad folicular a las proteínas plasmáticas y la mayor susceptibilidad a la acción de la FSH y de la GH. Se observó una disminución de la impedancia a nivel uterino en el grupo de L-Arginina, lo que produce un aumento del flujo y podría mejorar la receptividad uterina. Concluyeron que la administración de L-Arginina puede mejorar la respuesta ovárica y la receptividad endometrial.

No está claro si en la paciente diagnosticada de baja respondedora se unen las alteraciones cuantitativas (menor número de ovocitos, menor pico de E2,...) junto con las alteraciones cualitativas (disminución de la tasa de implantación por embrión transferido).

Han sido expuestos los esfuerzos encaminados a mejorar la respuesta folicular como paso previo para enmarcar el presente estudio.

MATERIAL Y METODOS

1. PACIENTES

Fueron incluidas en el estudio 233 pacientes a las que se practicó un total de 235 ciclos (a dos pacientes se les realizó dos ciclos de tratamiento) de hiperestimulación ovárica controlada para fecundación in vitro, durante el período comprendido entre enero 2001 y diciembre de 2001.

Todas las pacientes y sus parejas eran mayores de edad y firmaron un consentimiento informado para la realización de un tratamiento de reproducción asistida (FIV o ICSI), en el que se hizo constar que se trataba de un tratamiento especial por pronóstico de baja respuesta. En ningún caso existió contraindicación médica o legal para la práctica de dicho tratamiento.

1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Fueron incluidas en el estudio las pacientes estériles, subsidiarias de tratamiento mediante técnicas de reproducción asistida (FIV/ICSI), que reunían alguno de los siguientes criterios para definir y, por lo tanto, establecer el pronóstico de baja respuesta:

- edad \geq 40 años (33 ciclos)
- FSH basal $>$ 8,5 UI/L (175 ciclos)
- Baja respuesta en un ciclo previo de tratamiento (entendida como desarrollo de menos de 4 folículos preovulatorios tras la estimulación ovárica) (40 ciclos)

En 13 de los ciclos se reunían dos de los criterios considerados.

1.2. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

Fueron establecidos 4 protocolos distintos de hiperestimulación ovárica controlada que fueron denominados de la siguiente forma:

- Protocolo STOP-Combinación (“STOP-Combo”)
- Protocolo STOP-FSH
- Protocolo Bajando-Combinación (“Bajando-Combo”)
- Protocolo Bajando-FSH

Las características de la estimulación de cada uno de los protocolos serán comentadas en el apartado de estimulación ovárica.

Estos protocolos fueron asignados de forma aleatoria, quedando la muestra dividida en 4 grupos:

- Grupo 1 - Protocolo STOP – Combinación (49 ciclos)
- Grupo 2 - Protocolo STOP – FSH (55 ciclos)
- Grupo 3 - Protocolo Bajando – Combinación (68 ciclos)
- Grupo 4 - Protocolo Bajando – FSH (63 ciclos)

Comparada mediante test de Chi-cuadrado la distribución de los distintos protocolos se comprobó que no existían diferencias significativas, es decir, que la distribución de los mismos no pudo introducir sesgos en los resultados (Tabla 1)

Protocolo			
	N observado	N esperado	Residual
STOP-Combo	49	58,8	-9,8
STOP-FSH	55	58,8	-3,8
Bajando-Combo	68	58,8	9,3
Bajando-FSH	63	58,8	4,3
Total	235		

Tabla 1. Análisis estadístico de la distribución por protocolos ($p=3.62$)

En 104 ciclos se realizó la supresión hipofisaria con protocolo largo-STOP y en 131 con protocolo largo-Bajando.

En 97 ciclos se realizó la estimulación ovárica con una combinación de FSHr y hMG y en 118 ciclos con FSHr.

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Las características generales de la población estudiada (edad de la mujer, IMC, edad del varón, años de esterilidad, menarquia, FSH el día 3º del ciclo y LH el día 3º del ciclo) se reflejan en la Tabla 2.

Variable	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Error típico	Desviación típica
Edad mujer (años)	235	14.00	26.00	40.00	35.7574	.2192	3.3609
IMC	235	22.06	16.51	38.57	23.6980	.2620	4.0160
Edad varón (años)	235	33.00	28.00	61.00	38.0553	.3344	5.1259
Años esterilidad	235	17.00	2.00	19.00	7.1702	.2344	3.5932
Menarquia (años)	235	9.00	8.00	17.00	12.4638	.1004	1.5393
FSH3 (UI/L)	235	36.10	2.20	38.30	10.6674	.3220	4.9356
LH3 (UI/L)	152	39.60	1.40	41.00	5.8966	.3301	4.0693

Tabla 2. Descripción de las características generales de la muestra

3. CARACTERÍSTICAS DE CADA UNO DE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO

3.1. EDAD DE LA MUJER, IMC, EDAD DEL HOMBRE, AÑOS DE ESTERILIDAD, MENARQUIA

Las características de las pacientes (edad de la mujer, IMC, edad del hombre, años de esterilidad y menarquia) consideradas como ciclos de tratamiento e incluidas en cada uno de los protocolos referidos se reflejan en la Tabla 3.

Análisis descriptivo de la muestra

Protocolo		Edad mujer	IMC	Edad hombre	Años esterilidad	menarquia
STGP-Combo	N	49	49	49	49	49
	Media	35.8776	23.4239	37.2857	6.8571	12.6327
	Desv. típ.	3.3269	3.5169	5.1720	3.6742	1.6291
	Mínimo	29.00	17.72	28.00	2.00	8.00
	Máximo	40.00	36.73	61.00	17.00	17.00
STOP-FSH	N	55	55	55	55	55
	Media	35.7273	24.0665	38.0727	7.5818	12.1091
	Desv. típ.	3.1059	4.2382	4.9995	4.1037	1.8122
	Mínimo	29.00	18.29	31.00	2.00	9.00
	Máximo	40.00	37.33	53.00	18.00	17.00
Bajando-Combo	N	68	68	68	68	68
	Media	35.7059	24.2060	39.0294	6.8824	12.4559
	Desv. típ.	3.6978	4.5734	5.2261	3.2987	1.2747
	Mínimo	26.00	17.71	29.00	2.00	9.00
	Máximo	40.00	38.57	53.00	19.00	15.00
Bajando-FSH	N	63	63	63	63	63
	Media	35.7460	23.0413	37.5873	7.3651	12.6508
	Desv. típ.	3.2970	3.4851	5.0438	3.3902	1.4498
	Mínimo	30.00	16.51	29.00	3.00	9.00
	Máximo	40.00	31.96	53.00	19.00	16.00
Total	N	235	235	235	235	235
	Media	35.7574	23.6980	38.0553	7.1702	12.4638
	Desv. típ.	3.3609	4.0160	5.1259	3.5932	1.5393
	Mínimo	26.00	16.51	28.00	2.00	8.00
	Máximo	40.00	38.57	61.00	19.00	17.00

Tabla 3. Estudio descriptivo de las variables: edad mujer, IMC, edad hombre, años esterilidad y menarquia para cada uno de los grupos de tratamiento

Las varianzas de estas variables fueron homogéneas, a excepción de la edad de la menarquia. Se realizó un test de ANOVA no encontrándose diferencias significativas entre los 4 grupos de tratamiento (los resultados se expresan en la Tabla 4).

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Edad mujer	Inter-grupos	,946	3	,315	,028	,994
	Intra-grupos	2642,229	231	11,438		
	Total	2643,174	234			
IMC	Inter-grupos	55,874	3	18,625	1,157	,327
	Intra-grupos	3718,059	231	16,095		
	Total	3773,933	234			
Edad hombre	Inter-grupos	107,361	3	35,787	1,368	,253
	Intra-grupos	6040,920	231	26,151		
	Total	6148,281	234			
Años esterilidad	Inter-grupos	22,148	3	7,383	,569	,636
	Intra-grupos	2999,044	231	12,983		
	Total	3021,191	234			

Tabla 4. Análisis de la varianza para edad de la mujer, IMC, edad del hombre, años de esterilidad.

Las varianzas de la variable "menarquia" no fueron homogéneas por lo que se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en la que no se observó significación estadística.

3.2. FSH BASAL, LH BASAL, ANTECEDENTE DE BAJA RESPUESTA

El valor medio de los niveles de FSH y LH en el día 3° del ciclo para cada uno de los 4 grupos de tratamiento se expresa en la Tabla 5.

Análisis descriptivo de la muestra

Protocolo		FSH3	LH3
STOP-Combo	N	49	37
	Media	9.5263	5.5108
	Desv. típ.	2.6397	2.9063
	Mínimo	3.75	1.90
	Máximo	17.20	17.50
STOP-FSH	N	55	31
	Media	10.6056	5.2881
	Desv. típ.	4.3167	2.0799
	Mínimo	3.14	1.40
	Máximo	23.60	9.60
Bajando-Combo	N	68	44
	Media	11.8843	5.8170
	Desv. típ.	6.3305	2.9607
	Mínimo	2.20	2.00
	Máximo	38.30	13.00
Bajando-FSH	N	63	40
	Media	10.2956	6.8125
	Desv. típ.	4.9205	6.4824
	Mínimo	2.40	1.40
	Máximo	30.20	41.00
Total	N	235	152
	Media	10.6674	5.8966
	Desv. típ.	4.9356	4.0693
	Mínimo	2.20	1.40
	Máximo	38.30	41.00

Tabla 5. Descripción de las medias de FSH y LH para cada uno de los grupos de tratamiento. Los resultados de la LH día 3º están referidos a 152 muestras recogidas adecuadamente.

Al realizar el estudio comparativo se observó que el test de ANOVA para la LH resultó no significativo. Para la FSH, al encontrarse significación en el test de homogeneidad de las varianzas, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que no reveló diferencias significativas en los 4 grupos.

La distribución del antecedente de **baja respuesta previa** por grupos de tratamiento se recoge en la Tabla 6 y el test de Chi-cuadrado, que no reveló significación estadística ($p=0.917$), en la Tabla 7.

Tabla de contingencia

		Protocolo				Total
		STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH	
Baja respuesta previa	.00	Recuento	41	45	58	195
		% de Protocolo	83.7%	81.8%	85.3%	81.0%
	1.00	Recuento	8	10	10	40
		% de Protocolo	16.3%	18.2%	14.7%	19.0%
Total		Recuento	49	55	68	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 6. Recuento y porcentaje de baja respuesta previa (1.00) en cada uno de los grupos de tratamiento.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.510 ^a	3	.917
Razón de verosimilitud	.514	3	.916
Asociación lineal por lineal	.044	1	.834
N de casos válidos	235		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8.34.

Tabla 7. Test de Chi-cuadrado para el antecedente de baja respuesta previa por grupos de tratamiento

3.3. ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

Los antecedentes obstétricos de la muestra analizada reflejaron que 52 pacientes (22,1%) habían presentado gestaciones previas; el antecedente de parto previo sólo se halló en 11 mujeres (4,7%), mientras que 39 (16,6%) habían presentado algún aborto.

Las pacientes de cada uno de los grupos que tuvieron alguna **gestación previa** quedan reflejadas en la Tabla 8. Esta distribución no mostró diferencias estadísticamente significativas (p=0.703).

Tabla de contingencia

		Protocolo				Total	
		STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH		
GESTPRE2	.00	Recuento	40	44	53	46	183
		% de Protocolo	81.6%	80.0%	77.9%	73.0%	77.9%
	1.00	Recuento	9	11	15	17	52
		% de Protocolo	18.4%	20.0%	22.1%	27.0%	22.1%
Total		Recuento	49	55	68	63	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 8. Descripción de las pacientes con antecedentes de gestaciones previas (GESTPRE2=1.00) por grupos de tratamiento

Las pacientes de cada uno de los grupos que tuvieron algún parto previo quedaron reflejadas en la Tabla 9. La distribución de las mismas no reflejó diferencias estadísticamente significativas ($p=0.787$)

Tabla de contingencia

		Protocolo				Total	
		STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH		
PARTOPR2	.00	Recuento	48	52	64	60	224
		% de Protocolo	98.0%	94.5%	94.1%	95.2%	95.3%
	1.00	Recuento	1	3	4	3	11
		% de Protocolo	2.0%	5.5%	5.9%	4.8%	4.7%
Total		Recuento	49	55	68	63	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 9. Descripción de las pacientes con antecedentes de partos previos (PARTOPR2=1.00) por grupos de tratamiento

Las pacientes que tuvieron algún aborto previo quedaron reflejadas en la Tabla 10 y su distribución no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0.775$)

Tabla de contingencia

		Protocolo				Total	
		STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH		
ABORTOP2	.00	Recuento	42	46	58	50	196
		% de Protocolo	85.7%	83.6%	85.3%	79.4%	83.4%
	1.00	Recuento	7	9	10	13	39
		% de Protocolo	14.3%	16.4%	14.7%	20.6%	16.6%
Total		Recuento	49	55	68	63	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 10. Descripción de las pacientes con antecedentes de abortos previos (ABORTOP2=1.00) por grupos de tratamiento

3.4. DIAGNOSTICOS DE ESTERILIDAD

Factor femenino

La esterilidad de causa femenina, expresada en número de casos y porcentajes, se concentró en 4 diagnósticos fundamentalmente, como se muestra en la Tabla 11.

Diagnóstico esterilidad (origen femenino)	(n° casos)	Porcentaje
Anovulación	61	26%
Endometriosis	25	10,6%
Patología tubárica	71	30,2%
Función reproductora normal	78	33,2%

Tabla 11. Distribución del factor femenino de esterilidad.

Al analizar cada uno de los factores femeninos causantes de esterilidad y su distribución en todos los grupos de tratamiento, mediante un test de Chi-cuadrado no se observaron diferencias estadísticamente significativas por lo que se concluyó que los grupos eran homogéneos.

Factor masculino

Las alteraciones seminales de acuerdo con los criterios de la OMS, expresadas en número de casos y porcentajes, figuran en la Tabla 12.

Características del semen	Frecuencia (n° casos)	Porcentaje sobre el total de la muestra
Astenozoospermia moderada	73	31.1%
Astenozoospermia severa	43	18.3%
Azoospermia	9	3.8%
Normal	16	6.8%
Oligoastenozoospermia moderada	15	6.4%
Oligoastenozoospermia severa	75	31.9%
Oligozoospermia severa	4	1.7%
Total	235	100.0%

Tabla 12. Distribución de las características del seminograma como factor masculino de esterilidad

Se analizó la distribución de los diagnósticos derivados de la valoración del seminograma, entre todos los grupos de tratamiento, mediante un test de Chi-cuadrado y no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas, lo que llevó a concluir que las características seminales de las parejas de la muestra estudiada eran homogéneas.

En resumen, la ausencia de diferencias significativas, en los distintos grupos, de todas las variables que caracterizan la muestra, permite realizar el estudio propuesto en ausencia de sesgos vinculados a las características de la población estudiada.

4. DIAGNÓSTICO DE ESTERILIDAD

El estudio diagnóstico básico de la esterilidad realizado a la totalidad de las mujeres fue el siguiente: •bacteriología intracervical, •ecografía vaginal, •determinación de los niveles circulantes de FSH, LH, Estradiol, Prolactina y SHBG en el tercer día del ciclo y de progesterona en los días que, teóricamente correspondieron a la fase lútea media, •biopsia de endometrio, practicada en los días teóricamente premenstruales, •histerosalpingografía.

Cuando el caso así lo requirió, fueron realizadas exploraciones adicionales, como: laparoscopia diagnóstica, histeroscopia, pruebas funcionales hormonales (pruebas de estímulo con LHRH y ACTH y sobrecarga oral de glucosa con determinaciones de insulinemia) y determinación de anticuerpos antiespermatozoides séricos.

Básicamente, al hombre le fue practicado un espermiograma con capacitación espermática mediante swim-up. Cuando el caso así lo requirió, fueron realizadas pruebas adicionales como: determinaciones hormonales, anticuerpos antiespermatozoides séricos y pruebas de capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides.

5. ESTIMULACION OVARICA CONTROLADA

5.1. La supresión hipofisaria

El tratamiento farmacológico para conseguir la supresión hipofisaria se inició mediante la administración de un análogo agonista de GnRH (acetato de triptorelina 0,1 mg/día, Decapeptyl ® Ipsen Pharma, Barcelona) en el día 22 del ciclo menstrual precedente a aquél en que la punción folicular había sido programada, siguiéndose el protocolo que se conoce, generalmente, como “protocolo largo”.

Dentro del protocolo largo se analizaron dos grupos distintos:

- “Protocolo STOP” en el que la administración de agonista se suspendió el 3º día de la menstruación del ciclo del estímulo, o lo que es lo mismo, al comienzo de la administración de gonadotrofinas.
- “Protocolo Bajando” en el que la dosis de agonista se disminuyó a la mitad el 3º día de la menstruación del ciclo del estímulo.

Se consideró como supresión hipofisaria la determinación sérica de estradiol <50 pg/mL y ecografía vaginal con ovarios cuyos folículos medibles fueran menores de 10 mm de diámetro el día 3º del ciclo, o sea al comienzo de la estimulación ovárica.

5.2. La estimulación ovárica

La estimulación con gonadotrofinas se inició en el tercer día del ciclo menstrual, tras la administración del agonista, siempre y cuando se comprobara la supresión hipofisaria

El desarrollo de la estimulación ovárica con gonadotrofinas de las pacientes para cada uno de los grupos de tratamiento vino determinado por la asignación al protocolo correspondiente, de ahí que en las pacientes asignadas a los protocolos STOP-FSH y Bajando-FSH se comenzó la estimulación con 450 UI/día de FSH recombinante (Gonal F®, Laboratorios Serono, Madrid, o Puregón®, Laboratorios Organon, Barcelona) y en las pacientes asignadas a los protocolos STOP-Combo y Bajando-Combo se comenzó la estimulación con 300 UI/día de FSH recombinante y 2 ampollas de hMG (hMG-Lepori®, Laboratorios Farma-Lepori, Barcelona) (1 ampolla de hMG equivale a 75 UI de FSH y 75 UI de LH).

Estas dosis iniciales se administraron de forma continuada durante los primeros cinco o seis días, manteniéndose, incrementándose o disminuyéndose a partir del sexto o séptimo día en función de la respuesta individual al tratamiento.

El objetivo del tratamiento fue siempre utilizar la mínima dosis eficaz de FSH para lo cual se pretendió siempre, en la medida de lo posible, alcanzar el dintel de FSH y, una vez iniciado el desarrollo folicular de forma clínicamente apreciable, mantener la mínima dosis necesaria.

En resumen las pautas de tratamiento de los 4 grupos fueron:

- **Grupo 1** (protocolo STOP-Combo): agonista en protocolo largo y supresión al inicio de la administración de las gonadotrofinas (FSHr más hMG)
- **Grupo 2** (protocolo STOP-FSH): agonista en protocolo largo y supresión al inicio de la administración de las gonadotrofinas (FSHr sola)
- **Grupo 3** (protocolo Bajando-Combo): agonista en protocolo largo y disminución a la mitad de la dosis del mismo al inicio de la administración de las gonadotrofinas (FSHr más hMG)
- **Grupo 4** (protocolo Bajando-FSH): agonista en protocolo largo y disminución a la mitad de la dosis del mismo al inicio de la administración de las gonadotrofinas (FSHr sola).

5.3. Control del desarrollo folicular

El control del desarrollo folicular se realizó mediante ecografía transvaginal y determinaciones del nivel circulante de estradiol. Ambos parámetros fueron siempre valorados en el mismo día y programados en función del desarrollo folicular observable. Siempre se realizó un control el día de inicio del estímulo, previo al mismo y, diariamente, a partir del momento en que fueron visibles en la ecografía folículos de 14 ó 15 mm de diámetro. Se utilizó un ecógrafo Sigma 110 Master con sonda vaginal de 6,5 MHz (Kontron Medical®, Kontrol SA, Plaisir Cedex, France)

La determinación de estradiol se llevó a cabo en una muestra de sangre tomada entre las 08:00 y las 09:00 horas de la mañana. A continuación fue practicada la ecografía, en la que se registró localización, número y diámetro de todos los folículos iguales o mayores a 10 mm así como aspecto y espesor endometriales.

La administración de FSHr o de la combinación de ésta y hMG, según el protocolo asignado, se mantuvo hasta que existieron criterios de madurez folicular. Estos fueron: al menos 3 folículos con un diámetro igual o mayor a 18 mm y niveles séricos de estradiol de al menos 1000 pg/ml.

5.4. Criterios para la administración de hCG

Se indicó la administración de 10.000 UI de hCG (Profasi HP ®10000, Serono, Madrid), para desencadenar la ovulación, cuando se comprobó la presencia de los criterios de madurez folicular referidos, siempre que no existieran criterios de cancelación.

5.5. Criterios de cancelación

El tratamiento estimulador fue suspendido y la punción folicular cancelada cuando se produjo alguna de las siguientes situaciones:

- ausencia de respuesta, definida como presencia de menos de tres folículos en desarrollo después de 14 días de estimulación.
- niveles de estradiol superiores a 3.500 pg/mL previos a la administración de hCG.
- ambos ovarios de diámetro superior a 65 mm.

En caso de cancelar el tratamiento por riesgo de hiperestimulación, se suspendió la administración de gonadotrofinas y se mantuvo la supresión hipofisaria con análogo de Gn-RH hasta que se produjo la menstruación.

6. LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

6.1. Punción-Aspiración folicular

Se programó la punción-aspiración folicular 35-36 horas después de la inyección de hCG.

La punción y aspiración de los folículos se llevó a cabo, bajo anestesia general, por vía vaginal y controlada mediante ecografía. Fueron sistemáticamente puncionados y aspirados todos los folículos visibles de 14 o más milímetros de diámetro.

El aspirado folicular fue trasladado al laboratorio de embriología, adyacente al quirófano, donde se procedió al aislamiento y catalogación del ovocito en función de su estadio madurativo nuclear o del aspecto del complejo corona-cúmulo.

Una vez los ovocitos hubieron sido clasificados, fueron mantenidos en cultivo en estufa de CO₂ y a 37° C durante dos horas hasta su inseminación o microinyección.

6.2. Clasificación morfológica de los ovocitos

Se ha seguido la clasificación de los distintos estadios según Veeck [203].

Se distinguieron 7 estadios en las características microscópicas de los ovocitos, determinadas tras la captación, que se distribuyeron como sigue:

- *Ovocitos Metafase II maduros*: Tienen corpúsculo polar, ovoplasma homogéneo y claro, contorno redondo, cúmulo filante con células expandidas, células de la granulosa grandes, abundantes y formando láminas laxas.
- *Ovocitos Metafase II postmaduros*: tienen corpúsculo polar completo o fragmentado, a menudo muy grande, ovoplasma granuloso y oscuro, en ocasiones contorno irregular y pueden presentar vesículas citoplasmáticas
- *Ovocitos Metafase I maduros*: no poseen corpúsculo polar ni vesícula germinal, contorno redondo, ovoplasma regular, corona ligeramente radiante, cúmulo expandido y granulosa madura.

- *Ovocitos Metafase I inmaduros*: no presentan corpúsculo polar ni vesícula germinal, contorno redondo, ovoplasma granular, corona compacta, cúmulo denso y granulosa madura o inmadura
- *Ovocitos Profase I*: presentan vesícula germinal localizada en la zona central del ovocito, corona compacta, cúmulo compacto y células de la granulosa pequeñas e inmaduras
- *Ovocitos Atrésicos o degenerados*: pueden presentar corpúsculo polar o vesícula germinal, o ninguno de ellos. El corpúsculo polar puede ser grande o muy fragmentado. Son de contorno irregular, ovoplasma oscuro y, en ocasiones multivesiculado. Puede no haber cúmulo y la granulosa es oscura y compacta, pudiendo aparecer coágulos de sangre
- *Ovocitos con la zona fracturada*: son de estado nuclear no identificable, la zona pelúcida está fracturada con el ovoplasma oscuro saliéndose, la corona radiante, el cúmulo expandido o ausente y las células de la granulosa maduras.

6.3. Preparación del semen, inseminación o microinyección

La muestra de semen fue obtenida por masturbación, en general, en el propio centro, después de lavado de manos y genitales, entre las 08:00 y las 09:30 horas, de la mañana, del día previsto para la inseminación, y entregada en el laboratorio. Pudo ser obtenida en el domicilio de la paciente en aquellos casos en que el traslado hasta el centro pudo hacerse en un tiempo límite de 30 min. En los casos en que se utilizó semen de donante, la muestra fue suministrada por la pareja, que la solicitó a un banco de semen.

Al recibo de la muestra se procedió a su análisis, valorándose volumen, concentración y motilidad de los espermatozoides. Inmediatamente se procedió a su capacitación mediante la técnica de swim-up, utilizando medio de cultivo IVF (Medicult, Cat: 10315060), suspendiéndose finalmente los espermatozoides en 0,5 ml de medio.

En caso de semen criopreservado de donante éste se descongeló previamente a temperatura ambiente para luego ser capacitado de igual forma que el semen fresco.

La inseminación de los ovocitos se llevó a cabo en macrogota (de aproximadamente 200 μ L), depositando la cantidad de medio de cultivo que contuviera aproximadamente 200.000 espermatozoides en los casos de semen normal o hasta 500.000 espermatozoides en los casos de muestras oligo, asteno u oligoastenozoospermicas.

La microinyección se llevó a cabo según la técnica habitual, utilizándose un microinyector Narishige acoplado a un microscopio invertido Nikon Diaphot.

El diagnóstico de fecundación se hizo cuando dos pronúcleos fueron visibles 16 horas después de la inseminación o la microinyección.

Los embriones normales fueron preparados para transferencia o criopreservación; los embriones aneuploides o aquellos que detuvieron su desarrollo fueron desechados.

6.4. Clasificación morfológica de los embriones

La catalogación de los embriones está basada, principalmente, en la originalmente descrita por Veeck 1986. Así, la evaluación de la calidad embrionaria utilizada en el Laboratorio de Embriología de nuestro centro fue la siguiente:

- **Embriones de grado 1:** Son embriones que no muestran fragmentación de sus blastómeras. El tamaño de las blastómeras es similar, y la disposición de las mismas es simétrica. Un embrión grado 1 no debe tener blastómeras multinucleadas. La textura de las blastómeras debe ser lisa y el color claro. Las blastómeras deben estar expandidas, no dejando demasiado espacio hueco entre ellas y la zona pelúcida, y la forma del embrión es esférica.
- **Embriones grado 2:** Básicamente son similares a los anteriores, pero presentan escasa fragmentación (hasta un 15%).
- **Embriones grado 3:** Presentan fragmentación variable (escasa o hasta un 30%) pero a menudo las blastómeras son muy desiguales, y la textura es de aspecto rugoso. La forma del embrión puede ser no esférica (elíptica, en forma de pera, etc.). Son embriones de mala calidad.

- **Embriones grado 4:** Presentan más de un 60% de fragmentación. Las blastómeras son desiguales y a menudo algo oscuras y rugosas. La forma puede no ser esférica. Son embriones de mala calidad.
- **Embriones grado 5:** Son embriones completamente fragmentados, con citoplasma oscuro muchas veces. El embrión ha sufrido atresia y está casi completamente degenerado. Son embriones de muy baja calidad, nunca se transfieren.

La clasificación de los embriones se completó con la valoración el número de células del embrión en el momento de la transferencia, determinando las siguientes variables: número de células del embrión número 1, número de células del embrión número 2, número de células del embrión número 3 y número de células del embrión número 4. Fueron considerados embriones de “buena calidad” aquellos que presentaron un número de células igual o mayor a 4 y correspondían a un grado 1 ó 2.

6.5. Transferencia de embriones

Se llevó a cabo en ambiente estéril a las 48 a 72 horas de la punción. Se transfirieron un máximo de 3 embriones, congelándose, en su caso los embriones excedentes.

Para la transferencia, se asepticizó la vagina y se aspiró el moco del cervix, el cual, posteriormente, fue canalizado utilizándose para ello un catéter de transferencia de Cook, a través del cual los embriones fueron depositados en el fondo de la cavidad uterina.

Tras la transferencia, las pacientes permanecieron 2-4 horas en reposo en el centro.

7. CONTROL DE LA FASE LÚTEA Y TRATAMIENTO DE APOYO DE LA MISMA

Durante la fase lútea se realizaron determinaciones de estradiol y progesterona, los días +2 y +8 (considerando como día 0 el día de la punción folicular).

Como soporte a la fase lútea se utilizaron 400 mg/día de progesterona micronizada (Utrogestán®, Laboratorios Seid, Barcelona o Progeffik®, Laboratorios Effik, Madrid), por vía vaginal.

8. DIAGNÓSTICO DE LA GESTACION

Se llevó a cabo la determinación de β -hCG sérica a los 15 días de la punción folicular, en el caso de que la menstruación no se hubiera producido. Se consideró positiva esta determinación cuando superó el nivel de 20 mUI/mL. En estos casos, se citó y se practicó una ecografía vaginal dos semanas mas tarde.

Se diagnosticó la existencia de un embarazo sólo cuando en la ecografía fue visible al menos un saco embrionario, independientemente de su localización. En este estudio no fueron consideradas las gestaciones bioquímicas.

9. LABORATORIO DE HORMONAS

Las determinaciones analíticas de FSH (UI/L), LH (UI/L), estradiol (pg/mL), progesterona (ng/mL) y β -hCG (mUI/mL) se realizaron en el laboratorio de hormonas de nuestro centro según las siguientes técnicas:

9.1. FSH

Para la determinación cuantitativa de la FSH en el suero se utilizaron los Sistemas Automatizados de Quimioluminiscencia de Chiron Diagnostics ACS: 180®. El ensayo FSH de Chiron Diagnostics en el ACS:180 es un inmuno ensayo sandwich en dos sitios con tecnología quimioluminométrica directa, que utiliza cantidades constantes de dos anticuerpos con especificidad para la molécula de FSH intacta. El primer anticuerpo, en el Reactivo Lite, es un anticuerpo policlonal anti-FSH de oveja marcado con éster de acridinio. El segundo anticuerpo, en la Fase Sólida, es un anticuerpo monoclonal anti-FSH de ratón que está acoplado covalentemente a partículas paramagnéticas.

El ensayo de FSH del ACS:180 está estandarizado respecto al material de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2a. IS 94/632

Los rangos de referencia, con intervalo de confianza del 95%, para mujeres, se expresan en la Tabla 13.

Categoría de la muestra	N	Mediana (UI/L)	Range (UI/L)
Menstruación normal			
Fase folicular	95	5,6	2,5-10,2
Pico de mitad de ciclo	49	9,0	3,4-33,4
Fase lútea	99	2,9	1,5-9,1
Embarazo	92	0,0	<0,3

Tabla 13. Rango de referencia de los valores de FSH extraídos de 524 individuos aparentemente sanos

Para valorar la especificidad se determinó la reactividad cruzada del ensayo de FSH del ACS:180 con TSH, LH, hCG, prolactina y hormona de crecimiento agregando estas hormonas a muestras de suero que contenían FSH.

La sensibilidad del ensayo de FSH ACS:180 mide concentraciones de FSH hasta 200 UI/L con una concentración mínima detectable de 0,3 UI/L

Para valorar la precisión de la técnica se analizaron 3 veces tres muestras en cada uno de los 8 ensayos (n=24 para cada muestra) y se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla 14.

Media (UI/L)	% CV dentro de la serie	% CV total
4,3	2,8	4,6
20,9	1,7	4,5
45,1	1,2	4,7

Tabla 14. Resultados de precisión de la técnica de detección de FSH (CV: coeficiente de variación)

9.2. LH

Para la determinación cuantitativa de la LH en el suero se utilizaron los Sistemas Automatizados de Quimioluminiscencia de Chiron Diagnostics ACS:180®. El ensayo LH de Chiron Diagnostics en el ACS:180 es un inmuno ensayo sandwich en dos sitios con tecnología quimioluminométrica directa, que utiliza cantidades constantes de dos anticuerpos con especificidad para la molécula de LH intacta. El primer anticuerpo, en el Reactivo Lite, es un anticuerpo monoclonal anti-LH de ratón marcado con éster de acridinio. El segundo anticuerpo, en la Fase Sólida, es un anticuerpo monoclonal anti-LH de ratón que está acoplado covalentemente a partículas paramagnéticas.

El ensayo de LH del ACS:180 está estandarizado respecto al material de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2ª IS 80/552

Los rangos de referencia, con intervalo de confianza del 95%, para mujeres, están expresados en la Tabla 15.

Categoría de la muestra	N	Mediana (UI/L)	Rango (UI/L)
Menstruación normal			
Fase folicular	119	4,4	1,9-12,5
Pico de mitad de ciclo	53	31,3	8,7-76,3
Fase lútea	105	2,8	0,5-16,9
Embarazo	49	<0,1	<0,1-1,5

Tabla 15. Rango de referencia de los valores de LH extraídos de 569 individuos aparentemente sanos

Para valorar la especificidad se determinó la reactividad cruzada del ensayo de LH del ACS:180 con TSH, FSH, hCG, β -hCG, β -LH, prolactina y hormona de crecimiento agregando estas hormonas a muestras de suero que contenían LH.

La sensibilidad del ensayo de LH ACS:180 mide concentraciones de LH hasta 200 UI/L con una concentración mínima detectable de 0,07 UI/L

Para valorar la precisión de la técnica se analizaron 3 veces siete muestras en cada uno de los 6 ensayos (n=72 para cada muestra) y se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla 16.

Media (UI/L)	% CV dentro de la serie	% CV total
5,3	4,7	6,3
7,2	5,0	6,2
14,8	4,4	6,3
36,5	4,5	5,2
92,9	5,6	7,2
96,5	5,1	6,2
194,0	4,4	5,0

Tabla 16. Resultados de precisión de la técnica de detección de LH

9.3. Estradiol

El estradiol se determinó mediante un test inmunológico in vitro. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia "ECLIA" está concebido para su uso en los analizadores automáticos Elecsys 1010 y 2010 de Laboratorios Roche.

Se obtuvo de suero recogido en tubos estándar de muestra o tubos conteniendo gel de separación. Plasma tratado con heparina (Li, Na), K3-EDTA, citrato sódico, fluoruro sódico/oxalato potásico.

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 66 mg/dL), hemólisis (Hb < 1,0 g/dL), lipemia (Intralipid® < 1000 mg/dL), biotina < 36 ng/mL.

El intervalo de medición fue 18,4-15.781 pmol/L (5,00-4.300 pg/mL) (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como < 18,4 pmol/L o < 5,00 pg/mL y los superiores como > 15.781 pmol/L o > 4.300 pg/mL (o hasta 78.905 pmol/L o 21.500 pg/mL para muestras diluidas 5 veces)

Los valores de referencia se expresan en la Tabla 17.

	N	Percentil 50	Percentil 5-95%
Fase folicular	231	53,9	24,5-195
Fase ovulatoria	35	224	66,1-411
Fase lútea	212	109	40,0-61

Tabla 17. Valores de referencia de estradiol en pg/mL

La sensibilidad analítica (límite de detección inferior) fue 18,4 pmol/L o 5 pg/mL que corresponde a la más baja concentración de estradiol medible que puede distinguirse de cero.

La sensibilidad funcional fue de 44 pmol/L o 12 pg/mL que es la concentración mínima de estradiol que puede medirse con reproductibilidad con un coeficiente de variación interensayo de $\leq 20\%$.

9.4. Progesterona

La progesterona se determinó mediante un test inmunológico in vitro. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia "ECLIA" está concebido para su uso en los analizadores automáticos Elecsys 1010 y 2010 de Laboratorios Roche.

Se obtuvo de suero recogido en tubos estándar de muestra o tubos conteniendo gel de separación. Plasma tratado con heparina (Li, Na), K3-EDTA, citrato sódico, fluoruro sódico/oxalato potásico.

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 54 mg/dL), hemólisis (Hb $< 1,0$ g/dL), lipemia (Intralipid® < 720 mg/dL), biotina < 20 ng/mL.

El intervalo de medición fue 0,095-191 nmol/L (0,030-60,00 ng/mL) (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como $< 0,095$ nmol/L o $< 0,030$ ng/mL y los superiores como > 191 nmol/L o > 60 ng/mL (o hasta 1910 nmol/L o 600 ng/mL para muestras diluidas 10 veces)

Los valores de referencia se expresan en la Tabla 18.

Fase folicular	0,16-1,4
Fase lútea	1,9-18,8

Tabla 18. Valores de referencia de progesterona en ng/mL

La sensibilidad analítica (límite de detección inferior) fue 0,095 nmol/L o 0,03 ng/mL que corresponde a la más baja concentración de la progesterona medible que puede distinguirse de cero.

La sensibilidad funcional fue de < 0,48 nmol/L o 0,15 ng/mL que es la concentración mínima de la progesterona que puede medirse con reproductibilidad, con un coeficiente de variación interensayo de < 20%.

9.5 β -hCG

Se ha realizado un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia "ECLIA" concebido para su uso en analizadores automáticos Elecsys 1010 y 2010 de Laboratorios Roche. Se trata de un test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la suma de la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana en suero y plasma humanos.

Se obtuvo de suero recogido en tubos estándar de muestra o tubos conteniendo gel de separación. Plasma tratado con heparina (Li, Na), K3-EDTA, citrato sódico, fluoruro sódico/oxalato potásico.

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 24 mg/dL), hemólisis (Hb < 1,0 g/dL), lipemia (Intralipid® < 1400 mg/dL), biotina < 80 ng/mL.

El intervalo de medición fue 0,100-10.000 mUI/mL (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como < 0,100 mUI/mL y los superiores como > 10.000 mUI/mL (o hasta 1.000.000 mUI/mL para muestras diluidas 100 veces)

Valores de referencia: Se consideró positivo para el diagnóstico de gestación una β -hCG >20 mUI/mL.

La sensibilidad analítica (límite de detección inferior) fue $< 0,1$ mUI/mL que corresponde a la más baja concentración de β -hCG medible que puede distinguirse de cero.

La sensibilidad funcional fue de $< 0,6$ mUI/mL que es la concentración mínima de β -hCG que puede medirse con reproductibilidad, con un coeficiente de variación interensayo del 20%.

Especificidad analítica: para los anticuerpos monoclonales empleados se han obtenido las siguientes reacciones cruzadas: LH, TSH: no detectable, FSH $< 0,1\%$.

10. VARIABLES ANALIZADAS EN EL ESTUDIO

Las variables analizadas en el estudio estadístico, para cada uno de los protocolos de tratamiento examinados, fueron:

* El estudio epidemiológico realizado recogió los siguientes parámetros: edad de la mujer en años, índice de masa corporal (IMC), edad del hombre en años, años de esterilidad, menarquia, determinación de FSH sérica el día 3° del ciclo, determinación de LH sérica el día 3° del ciclo, antecedentes de baja respuesta previa, diagnóstico de esterilidad para el factor femenino, diagnóstico de esterilidad para el factor masculino, antecedentes de gestaciones previas, antecedentes de partos previos, antecedentes de abortos previos.

* Los datos de la estimulación ovárica, punción folicular para cada uno de los grupos fueron reflejados teniendo en cuenta las variables que se exponen a continuación:

- control ecográfico del ovario según: tamaño ovario derecho en mm, tamaño ovario izquierdo en mm, número de folículos ≥ 16 mm, diámetro del folículo mayor en mm, grosor del endometrio en mm, todos ellos corresponden al día en que se administra la hCG.
- determinaciones analíticas (en sangre): estradiol día de hCG, estradiol el día previo a la punción, progesterona el día previo a la punción, estradiol el día de la punción, progesterona el día de la punción, estradiol el 2° día de fase lútea, progesterona el día 2° de fase lútea, estradiol el día 8° de fase lútea, progesterona el día 8° de fase lútea.

- punción folicular: se valoró número de folículos puncionados, número de ovocitos obtenidos.
 - duración estimulación según: días de estimulación con gonadotrofinas, duración de la fase folicular (desde la menstruación hasta la punción folicular) en días, duración de la fase lútea (en las pacientes que no quedaron gestantes) en días.
 - dosis de gonadotrofinas: la dosis total FSH se obtuvo de sumar la dosis total de FSH y la actividad de FSH contenida en la hMG. La dosis total de LH se obtuvo cuantificando la actividad LH contenida en el preparado de hMG.
- * Los datos del laboratorio de embriología, para cada uno de los grupos, se determinaron según las siguientes variables:
- caracterización de los ovocitos: atrésicos, rotos, metafase II, metafase II postmaduros, metafase I maduros, metafase I inmaduros, profase I.
 - fase de laboratorio se valoró según la tasa fecundación FIV y la tasa fecundación ICSI.
 - la transferencia embrionaria se valoró según el número de embriones transferidos, prestando especial atención a la causa de no transferencia
 - calidad embrionaria, en función del número de células del embrión en el momento de la transferencia y del grado en que queda encuadrado tras su clasificación. Se consideró embriones de buena calidad todos aquellos con un número de células mayor o igual a 4 y cuyo grado era 1 ó 2 (según la clasificación descrita)
- * Los resultados del ciclo de estimulación ovárica se valoraron en función de:
- tasa de cancelación (número de ciclos cancelados durante la estimulación/ número de ciclos iniciados X 100)
 - tasa de cancelación por no transferencia (número de ciclos cancelados por no transferencia/ número de ciclos iniciados X 100)
 - tasa de implantación (número de sacos visualizados en ecografía / número de embriones transferidos X 100) en todos los ciclos en que se realizó transferencia y entre los ciclos cuyo resultado fue la gestación.

- tasa de gestación por ciclo iniciado con administración de gonadotrofinas (número de gestaciones/ número de ciclos en que se administraron gonadotrofinas en la estimulación X 100)
- tasa de gestación por punción (número de gestaciones/ número de ciclos en que se realizó punción folicular X 100)
- tasa de gestación por transferencia (número de gestaciones/ número de transferencias realizadas X 100)

11. REVISION BIBLIOGRAFICA

Se ha revisado la bibliografía publicada más relevante sobre la baja respuesta en FIV obtenida a partir de la búsqueda realizada mediante internet-Pubmed (período 1980-2001) utilizando las siguientes palabras clave: “poor responder”, “low responder”, “poor ovarian response” y “poor ovarian responsiveness” y los artículos que se han considerado de interés para el desarrollo del tema derivados de la búsqueda inicial.

12. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico del presente trabajo se presenta en 3 niveles:

1.- Análisis estadístico descriptivo de las variables estudiadas

Los resultados de las variables cuantitativas se presentan como media, desviación típica y rango. Las variables cualitativas se presentan con sus frecuencias absolutas y relativas (proporciones)

2.- Análisis univariante

Las comparaciones de proporciones se han realizado utilizando la prueba de Chi-cuadrado, excepto cuando alguna de las celdas de la tabla de contingencia tenía menos de 5 valores observados. En estos casos se utilizó la prueba exacta de Fisher.

Cuando se comparaban medias de dos grupos se ha utilizado la prueba T de Student. En los casos en que alguno de los grupos tenía menos de 30 elementos se comprobó la normalidad de la distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando no se cumplía el supuesto de normalidad se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Las comparaciones de 3 ó más medias se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) tras comprobar la homogeneidad de las varianzas y la normalidad

de los datos. En los casos en que se objetivaron diferencias significativas entre los grupos se aplicaron contrastes a posteriori mediante el método de Scheffé. Cuando se vulneraron las condiciones de aplicación (supuesto de homocedasticidad o de igualdad de las varianzas) se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3.- Análisis multivariante

Para analizar la tasa de implantación se han construido unos modelos de regresión lineal múltiple con el número de sacos gestacionales obtenidos como variable dependiente y el grupo de protocolo como variable independiente principal, e incluyendo los posibles factores de confusión utilizados en los modelos de regresión logística. Estos modelos se construyeron para todos los ciclos con gestación final y para todos aquellos en que se realizó transferencia de embriones. Se calcularon los riesgos relativos (RR) y sus intervalos de confianza al 95%. Valores superiores a 1 indican un efecto positivo sobre la tasa de implantación.

Para determinar si existían diferencias en la probabilidad de gestación entre los 4 grupos (objetivo principal) se han construido modelos de regresión logística con la probabilidad de gestación como variable dependiente y el grupo de protocolo como variable independiente o predictora principal. Ello se ha realizado para todos los ciclos iniciados, los ciclos en que se realizó punción folicular y para los ciclos en que efectivamente se realizó transferencia de embriones. Además los modelos incluyeron como otras variables independientes o predictoras a todas aquellas que en el análisis univariante habían determinado influencia en la probabilidad de gestación y aquellas que se citan como posibles factores de confusión en la bibliografía.

Se calcularon los odds ratio (OR) y sus intervalos de confianza al 95%. Valores superiores a 1 indican una mayor probabilidad de gestación.

Todos los contrastes de hipótesis fueron bilaterales. Se consideraron significativos valores de p menores de 0,05. Los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete SPSS 10.0.1.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA ESTIMULACION OVARICA

1.1. CRITERIOS ECOGRÁFICOS

Los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada, para cada grupo de tratamiento, teniendo en cuenta los criterios ecográficos valorados (tamaño del ovario derecho, tamaño del ovario izquierdo, número de folículos preovulatorios desarrollados, diámetro del folículo mayor, grosor del endometrio) se presentan en la Tabla 19.

Han sido excluidos los ciclos cancelados durante la estimulación.

Características de la estimulación ovárica

Protocolo		Ovario derecho	Ovario izquierdo	Número de folículos	Diámetro folículo mayor	Grosor endometrio
STOP-Combo	N	37	38	38	38	38
	Media	39.7297	40.5263	5.8421	20.7895	11.4211
	Desv. típ.	7.7733	7.3069	2.6866	1.5796	1.5532
	Mínimo	23.00	26.00	2.00	18.00	9.00
	Máximo	58.00	55.00	15.00	27.00	15.00
STOP-FSH	N	41	41	42	42	42
	Media	43.1220	41.4634	6.5000	20.7857	11.5476
	Desv. típ.	7.2498	7.4300	3.0624	1.8151	2.2437
	Mínimo	32.00	27.00	2.00	17.00	8.00
	Máximo	57.00	59.00	16.00	24.00	18.00
Bajando-Combo	N	58	58	59	59	59
	Media	41.4483	39.8448	5.2881	21.0678	12.0169
	Desv. típ.	7.3298	6.7090	2.0515	1.7701	2.3525
	Mínimo	25.00	28.00	2.00	18.00	7.00
	Máximo	62.00	58.00	11.00	27.00	18.00
Bajando-FSH	N	49	49	50	50	50
	Media	43.2653	41.8776	6.3200	21.1200	12.0800
	Desv. típ.	6.8974	8.0016	2.5269	1.4934	2.4061
	Mínimo	33.00	23.00	3.00	18.00	7.00
	Máximo	60.00	59.00	12.00	24.00	18.00
Total	N	185	186	189	189	189
	Media	41.9568	40.8763	5.9418	20.9630	11.8095
	Desv. típ.	7.3579	7.3345	2.5830	1.6675	2.2063
	Mínimo	23.00	23.00	2.00	17.00	7.00
	Máximo	62.00	59.00	16.00	27.00	18.00

Tabla 19. Resultados ecográficos tras estimulación ovárica según grupo de tratamiento.

Tras comprobar la homogeneidad de las varianzas para las variables ecográficas consideradas se realizó un Test de ANOVA cuyos resultados se expresan en la Tabla 20.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Ovario derecho	Inter-grupos	338.071	3	112.690	2.119	.099
	Intra-grupos	9623.583	181	53.169		
	Total	9961.654	184			
Ovario izquierdo	Inter-grupos	129.618	3	43.206	.801	.495
	Intra-grupos	9822.538	182	53.970		
	Total	9952.156	185			
Número de folículos	Inter-grupos	45.825	3	15.275	2.338	.075
	Intra-grupos	1208.534	185	6.533		
	Total	1254.360	188			
Diámetro folículo mayor	Inter-grupos	4.345	3	1.448	.517	.671
	Intra-grupos	518.396	185	2.802		
	Total	522.741	188			
Grosor endometrio	Inter-grupos	14.812	3	4.937	1.015	.387
	Intra-grupos	900.331	185	4.867		
	Total	915.143	188			

Tabla 20. Test de ANOVA para las variables ecográficas estudiadas por grupo de tratamiento

Así se observó que no existen diferencias significativas en los 4 grupos estudiados.

1.2. DURACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN Y DE LA FASE LÚTEA

Con el objeto de definir, lo más concretamente posible, las características de la estimulación en los distintos grupos de tratamiento se valoró la duración de la estimulación (días), así como los días de fase folicular y los días de fase lútea en los ciclos en que no se produjo una gestación. La descripción de estas variables se expresa en la Tabla 21. Ha sido considerada la totalidad de los casos para el cálculo de la duración de la estimulación y sólo los ciclos no cancelados para el cálculo de la duración de la fase folicular.

Duración de la estimulación y de la fase lútea

Protocolo		Duración estimulación	Duración fase folicular	Días fase lútea
STOP-Combo	N	49	38	29
	Media	10.2857	14.7895	14.3793
	Desv. típ.	2.0917	2.0816	1.8625
	Mínimo	6.00	10.00	12.00
	Máximo	16.00	20.00	16.00
STOP-FSH	N	55	42	31
	Media	10.1455	14.5952	16.3871
	Desv. típ.	2.2146	2.9139	5.7601
	Mínimo	6.00	12.00	12.00
	Máximo	21.00	30.00	45.00
Bajando-Combo	N	68	59	46
	Media	9.9118	14.7797	14.4783
	Desv. típ.	1.9679	2.5056	1.6699
	Mínimo	5.00	9.00	11.00
	Máximo	15.00	24.00	19.00
Bajando-FSH	N	63	50	33
	Media	9.8889	14.5800	14.3333
	Desv. típ.	1.7424	2.8363	2.2454
	Mínimo	5.00	10.00	5.00
	Máximo	13.00	29.00	18.00
Total	N	235	189	139
	Media	10.0383	14.6878	14.8489
	Desv. típ.	1.9921	2.5976	3.1826
	Mínimo	5.00	9.00	5.00
	Máximo	21.00	30.00	45.00

Tabla 21. Descripción de la duración de la estimulación, de la fase folicular y de la fase lútea por grupos de tratamiento.

El análisis estadístico figura en la Tabla 22, y en él se puede apreciar la ausencia de diferencias significativas para las variables consideradas.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Duración estimulación	Inter-grupos	6,126	3	2,042	,511	,675
	Intra-grupos	922,529	231	3,994		
	Total	928,655	234			
Duración fase folicular	Inter-grupos	27806766	3	9268921,8	1,320	,269
	Intra-grupos	1,299E+09	185	7023486,0		
	Total	1,327E+09	188			

Tabla 22. Test de ANOVA para la duración de la estimulación y de la fase folicular

Al considerar la duración de la fase lútea se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que tampoco reflejó significación ($p=0,162$).

1.3. DOSIS DE GONADOTROFINAS

La distribución de la dosis media de gonadotrofinas utilizada en los distintos protocolos de tratamiento está expresada en la Tabla 23.

Conviene recordar que la asignación de tratamiento implica diferencias en las dosis de gonadotrofinas que deben ser consideradas como factor de clasificación y que la dosis total de FSH fue calculada sumando las unidades administradas como tal y las unidades de FSH contenidas en la hMG, cuando ésta fue administrada. Del mismo modo la dosis de LH se obtuvo al considerar las unidades de la misma contenidas en los preparados de hMG.

Dosis de gonadotrofinas

Protocolo		Dosis total FSH	Dosis total hMG (LH)
STOP-Combo	N	49	49
	Media	3630.6122	792.8571
	Desv. tip.	1144.4871	360.6635
	Mínimo	1800.00	300.00
	Máximo	8025.00	2100.00
STOP-FSH	N	55	
	Media	3292.2727	
	Desv. tip.	911.6259	
	Mínimo	1800.00	
	Máximo	5850.00	
Bajando-Combo	N	68	68
	Media	4385.6618	1147.0588
	Desv. tip.	1277.0237	408.9605
	Mínimo	1800.00	300.00
	Máximo	9000.00	1950.00
Bajando-FSH	N	63	
	Media	4101.5873	
	Desv. tip.	1000.7545	
	Mínimo	2200.00	
	Máximo	6800.00	
Total	N	235	117
	Media	3896.1702	998.7179
	Desv. tip.	1172.2787	425.7074
	Mínimo	1800.00	300.00
	Máximo	9000.00	2100.00

Tabla 23. Distribución de la dosis de FSH y LH en cada uno de los grupos de tratamiento

Al analizar la **dosis total de FSH**, tras comprobar la homogeneidad de los grupos, se realizó un test de ANOVA, como se expresa en la tabla 24.

ANOVA

Dosis total FSH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	42464894	3	14154965	11.715	.000
Intra-grupos	279106659	231	1208253,9		
Total	321571553	234			

Tabla 24. Test de ANOVA para la dosis de FSH por grupos de tratamiento

Como se observó significación ($p < 0,01$), se realizó la prueba de Scheffé para comprobar entre que grupos se localizaban las diferencias referidas (Tabla 25).

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Dosis total FSH

Scheffé

(I) Protocolo	(J) Protocolo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
STOP-Combo	STOP-FSH	338.3395	215.9317	.485	-269.7695	946.4485
	Bajando-Combo	-755.0495*	205.9774	.004	-1335.1251	-174.9739
	Bajando-FSH	-470.9751	209.3726	.171	-1060.6122	118.6621
STOP-FSH	STOP-Combo	-338.3395	215.9317	.485	-946.4485	269.7695
	Bajando-Combo	-1093.3890*	199.3406	.000	-1654.7742	-532.0039
	Bajando-FSH	-809.3146*	202.8470	.001	-1380.5742	-238.0549
Bajando-Combo	STOP-Combo	755.0495*	205.9774	.004	174.9739	1335.1251
	STOP-FSH	1093.3890*	199.3406	.000	532.0039	1654.7742
	Bajando-FSH	284.0745	192.2162	.536	-257.2468	825.3957
Bajando-FSH	STOP-Combo	470.9751	209.3726	.171	-118.6621	1060.6122
	STOP-FSH	809.3146*	202.8470	.001	238.0549	1380.5742
	Bajando-Combo	-284.0745	192.2162	.536	-825.3957	257.2468

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tabla 25. Prueba de Scheffé para la dosis total de FSH por grupos de tratamiento.

Como cabría esperar, se observó que la dosis total de FSH fue significativamente mayor en el grupo Bajando-Combo al compararlo con STOP-Combo ($p < 0,01$) y en el grupo Bajando-FSH al compararlo con STOP-FSH ($p < 0,01$).

También se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) al comparar el protocolo Bajando-Combo, en el que la dosis total de FSH utilizada fue mayor, y el protocolo STOP-FSH.

La representación gráfica de la dosis total de FSH según los grupos de tratamiento facilita la visualización de las diferencias referidas (Figura 1)

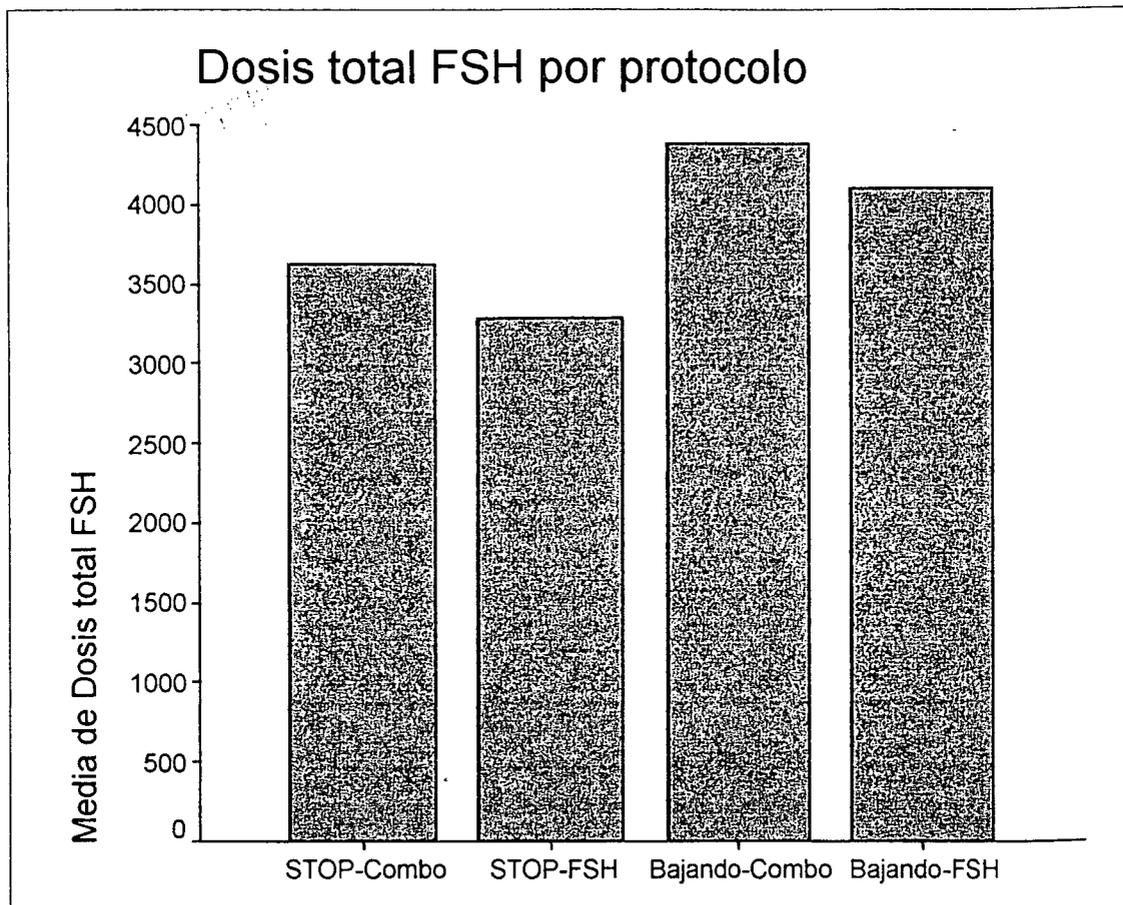


Figura 1. Representación gráfica de la dosis total de FSH en los 4 grupos de tratamiento

Al analizar la **dosis total de LH** se observó la distribución en los dos grupos tratados con hMG como se expresa en la Tabla 26.

Estadísticos de grupo

	Protocolo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Dosis total hMG (LH)	STOP-Combo	49	792.8571	360.6635	51.5234
	Bajando-Combo	68	1147.0588	408.9605	49.5937

Tabla 26. Dosis total de hMG para los grupos con protocolo Combo

Al comparar ambos grupos mediante una prueba de t de student se apreció significación estadística ($p < 0,01$), como cabría esperar, de forma que la dosis total de hMG fue mayor en el protocolo de supresión hipofisaria tipo Bajando que en el tipo STOP.

Por lo tanto, se observó que la dosis necesaria tanto de FSH como de LH para conseguir un desarrollo folicular adecuado fue mayor (con diferencias estadísticamente significativas) en los grupos tratados con protocolo Bajando del agonista al compararlos con los tratados con protocolo STOP.

1.4. DETERMINACIONES HORMONALES

Se han valorado los resultados de la estimulación, según los parámetros analíticos (estradiol -pg/mL- y progesterona -ng/mL- séricos). En la Tabla 27 se presentan los controles de estradiol a partir de la administración de hCG: el día de hCG, el día previo a la punción -día menos 1-, el día de la punción -día 0-, el 2º día de la fase lútea -día +2- y el día 8º días tras la punción -día +8-, para los 4 grupos de tratamiento.

Evolución de los niveles de estradiol

Protocolo		Estradiol día hCG	Estradiol día -1	Estradiol día 0	Estradiol día +2	Estradiol día +8
STOP-Combo	N	38	38	38	38	17
	Media	1052.3947	1269.9211	609.9474	409.6842	529.8824
	Desv. típ.	427.0265	574.6105	322.3589	238.0458	261.2443
	Mínimo	370.00	456.00	161.00	98.00	133.00
	Máximo	2045.00	2654.00	1261.00	1047.00	931.00
STOP-FSH	N	42	42	42	42	14
	Media	1249.7857	1554.9524	746.3571	558.3810	434.6429
	Desv. típ.	508.0508	711.3753	439.0496	391.2273	250.2647
	Mínimo	445.00	245.00	201.00	78.00	113.00
	Máximo	2500.00	3119.00	1954.00	1846.00	840.00
Bajando-Combo	N	59	59	59	59	22
	Media	1336.4068	1603.4915	757.9322	460.8475	425.6818
	Desv. típ.	653.3993	800.9846	393.7037	329.7787	370.9615
	Mínimo	461.00	565.00	113.00	118.00	74.00
	Máximo	3276.00	3953.00	2151.00	1729.00	1456.00
Bajando-FSH	N	50	50	50	49	24
	Media	1377.2400	1594.9200	794.0800	492.7959	462.3125
	Desv. típ.	606.7462	707.8646	520.9665	244.5328	294.7544
	Mínimo	368.00	520.00	196.00	94.00	52.00
	Máximo	3392.00	3562.00	3506.00	1148.00	1072.00
Total	N	189	189	189	188	77
	Media	1270.8571	1523.3704	735.1693	480.6223	461.7338
	Desv. típ.	577.8824	721.4287	430.5024	310.4723	301.5777
	Mínimo	368.00	245.00	113.00	78.00	52.00
	Máximo	3392.00	3953.00	3506.00	1846.00	1456.00

Tabla 27. Descripción de cada uno de los valores de estradiol (pg/mL) a partir de la administración de la β hCG para los 4 grupos de tratamiento

La representación gráfica de la evolución de los niveles de estradiol se puede observar en la Figura 2

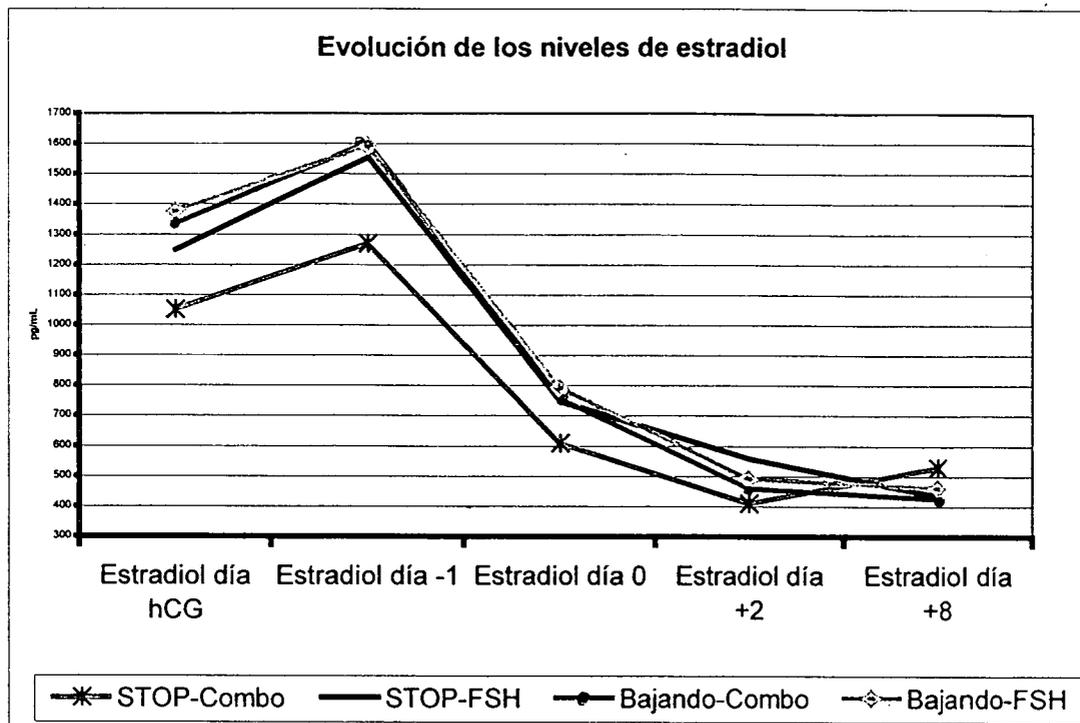


Figura 2. Representación gráfica de la evolución de los niveles de estradiol por grupos de tratamiento.

El test de homogeneidad de las varianzas no reveló diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, por lo que se realizó el test de ANOVA en el que únicamente se apreció significación para el estradiol el día de hCG (Tabla 28)

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Estradiol día hCG	Inter-grupos	2651603,6	3	883867.878	2.719	.046
	Intra-grupos	60130638	185	325030.473		
	Total	62782241	188			
Estradiol día -1	Inter-grupos	3117593,0	3	1039197,7	2.029	.111
	Intra-grupos	94728775	185	512047.433		
	Total	97846368	188			
Estradiol día 0	Inter-grupos	805211.636	3	268403.879	1.459	.227
	Intra-grupos	34037259	185	183985.183		
	Total	34842471	188			
Estradiol día +2	Inter-grupos	475506.485	3	158502.162	1.662	.177
	Intra-grupos	17549998	184	95380.422		
	Total	18025504	187			
Estradiol día +8	Inter-grupos	117829.134	3	39276.378	.422	.738
	Intra-grupos	6794303,7	73	93072.653		
	Total	6912132,8	76			

Tabla 28. Test de ANOVA para la evolución del estradiol.

La significación observada motivó que se realizara (Tabla 29) el estudio comparativo entre los distintos grupos de tratamiento para esta variable con el fin de localizar la significación.

Comparaciones múltiples

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Estradiol día hCG

DMS

(I) Protocolo	(J) Protocolo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
STOP-Combo	STOP-FSH	-197.3910	127.6411	.124	-449.2103	54.4283
	Bajando-Combo	-284.0120*	118.5851	.018	-517.9650	-50.0591
	Bajando-FSH	-324.8453*	122.6949	.009	-566.9064	-82.7841
STOP-FSH	STOP-Combo	197.3910	127.6411	.124	-54.4283	449.2103
	Bajando-Combo	-86.6211	115.0991	.453	-313.6967	140.4546
	Bajando-FSH	-127.4543	119.3291	.287	-362.8750	107.9665
Bajando-Combo	STOP-Combo	284.0120*	118.5851	.018	50.0591	517.9650
	STOP-FSH	86.6211	115.0991	.453	-140.4546	313.6967
	Bajando-FSH	-40.8332	109.5883	.710	-257.0367	175.3703
Bajando-FSH	STOP-Combo	324.8453*	122.6949	.009	82.7841	566.9064
	STOP-FSH	127.4543	119.3291	.287	-107.9665	362.8750
	Bajando-Combo	40.8332	109.5883	.710	-175.3703	257.0367

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tabla 29. Comparación entre los grupos de tratamiento para el estradiol el día hCG

Se observaron diferencias significativas entre el grupo STOP-Combo y los grupos con protocolo Bajando, lo que implica que los niveles de estradiol en el grupo STOP-Combo son menores, con significación estadística, a los de los grupos con protocolo Bajando.

Se ha valorado también los resultados de la estimulación según la evolución de los niveles de **progesterona** tras la administración de hCG. En la Tabla 30 se presentan los controles de progesterona a partir de la administración de hCG: el día previo a la punción -día menos 1-, el día de la punción -día 0-, el 2º día de la fase lútea -día +2- y el día 8º días tras la punción -día +8-, para los 4 grupos de tratamiento.

Evolución de los niveles de progesterona

Protocolo		Progesterona días -1	Progesterona día 0	Progesterona día +2	Progesterona día +8
STOP-Combo	N	38	38	38	17
	Media	3.4047	6.7158	30.8000	34.3853
	Desv. típ.	2.0393	3.8323	20.0509	15.9250
	Mínimo	1.10	2.40	4.70	12.20
	Máximo	11.00	19.30	109.50	61.50
STOP-FSH	N	42	42	41	14
	Media	4.0143	7.7286	36.3585	32.5357
	Desv. típ.	2.3778	4.4301	22.8660	15.4962
	Mínimo	1.10	1.50	3.10	9.50
	Máximo	11.70	21.00	117.20	57.40
Bajando-Combo	N	59	59	59	22
	Media	2.6034	5.2059	25.8237	28.9136
	Desv. típ.	1.3316	2.6214	14.1508	21.6408
	Mínimo	.80	1.80	7.20	.50
	Máximo	7.50	13.70	59.30	79.90
Bajando-FSH	N	50	50	49	23
	Media	3.4040	7.0660	34.5224	31.9630
	Desv. típ.	1.8753	3.5571	16.5925	19.6798
	Mínimo	.90	2.20	6.20	13.30
	Máximo	10.50	17.80	66.30	99.15
Total	N	189	189	187	76
	Media	3.2898	6.5622	31.4241	31.7276
	Desv. típ.	1.9459	3.6800	18.5427	18.5614
	Mínimo	.80	1.50	3.10	.50
	Máximo	11.70	21.00	117.20	99.15

Tabla 30. Evolución de los niveles de progesterona tras la administración de hCG por grupos de tratamiento

La representación gráfica de los niveles de progesterona tras la estimulación se observa en la Figura 3

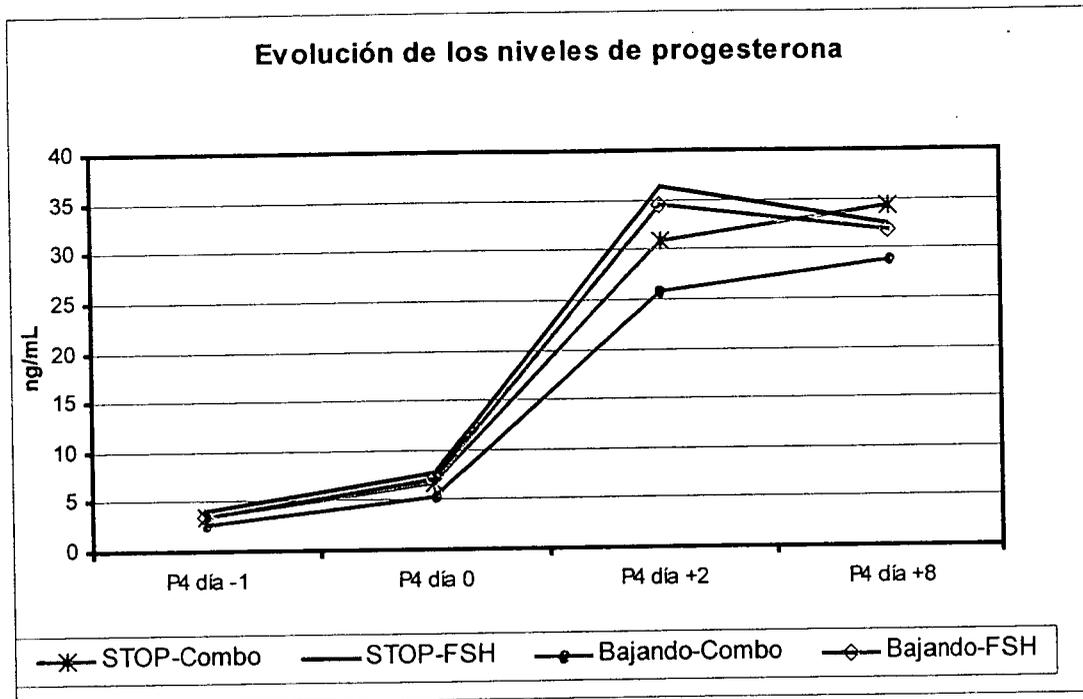


Figura 3. Representación gráfica de la evolución de los niveles de progesterona según los distintos grupos de tratamiento.

El test de homogeneidad de las varianzas reveló significación para la progesterona el día 0, por lo que se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para esta variable y una prueba de ANOVA (Tabla 31) para el resto de valores de progesterona. Los resultados fueron:

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Progesterona días -1	Inter-grupos	50.997	3	16.999	4.759	.003
	Intra-grupos	660.837	185	3.572		
	Total	711.835	188			
Progesterona día 0	Inter-grupos	179.253	3	59.751	4.671	.004
	Intra-grupos	2366.659	185	12.793		
	Total	2545.912	188			
Progesterona día +2	Inter-grupos	3333.970	3	1111.323	3.355	.020
	Intra-grupos	60618.812	183	331.250		
	Total	63952.782	186			
Progesterona día +8	Inter-grupos	304.699	3	101.566	.286	.835
	Intra-grupos	25534.668	72	354.648		
	Total	25839.367	75			

Tabla 31. Prueba de ANOVA para la evolución de la progesterona

Se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la progesterona el día - 1 y el día + 2 (test ANOVA) y en la progesterona el día 0 (test de Kruskal-Wallis).

Para localizar las diferencias entre grupos se realizó la prueba de Scheffé (Tabla 32) cuyos resultados reflejaron que únicamente existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo STOP-FSH y Bajando-Combo tanto en la progesterona el día - 1, como la del día +2, sin apreciarse diferencias entre los valores del resto de protocolos. Esto significó que los niveles de progesterona en el grupo STOP-FSH fueron mayores que los del grupo Bajando-Combo.

Comparaciones múltiples

Scheffé

Variable dependiente	(I) Protocolo	(J) Protocolo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Progesterona días -1	STOP-Combo	STOP-FSH	-.6095	.4231	.558	-1.8034	.5843
		Bajando-Combo	.8013	.3931	.249	-.3078	1.9105
		Bajando-FSH	7.368E-04	.4067	1.000	-1.1469	1.1483
	STOP-FSH	STOP-Combo	.6095	.4231	.558	-.5843	1.8034
		Bajando-Combo	1.4109*	.3816	.004	.3343	2.4874
		Bajando-FSH	.6103	.3956	.499	-.5058	1.7264
	Bajando-Combo	STOP-Combo	-.8013	.3931	.249	-1.9105	.3078
		STOP-FSH	-1.4109*	.3816	.004	-2.4874	-.3343
		Bajando-FSH	-.8006	.3633	.187	-1.8256	.2244
	Bajando-FSH	STOP-Combo	-7.3684E-04	.4067	1.000	-1.1483	1.1469
		STOP-FSH	-.6103	.3956	.499	-1.7264	.5058
		Bajando-Combo	.8006	.3633	.187	-.2244	1.8256
Progesterona día 0	STOP-Combo	STOP-FSH	-1.0128	.8008	.660	-3.2721	1.2465
		Bajando-Combo	1.5099	.7440	.252	-.5892	3.6089
		Bajando-FSH	-.3502	.7697	.976	-2.5220	1.8215
	STOP-FSH	STOP-Combo	1.0128	.8008	.660	-1.2465	3.2721
		Bajando-Combo	2.5226*	.7221	.008	.4853	4.5599
		Bajando-FSH	.6626	.7486	.853	-1.4496	2.7747
	Bajando-Combo	STOP-Combo	-1.5099	.7440	.252	-3.6089	.5892
		STOP-FSH	-2.5226*	.7221	.008	-4.5599	-.4853
		Bajando-FSH	-1.8601	.6875	.066	-3.7998	7.969E-02
	Bajando-FSH	STOP-Combo	.3502	.7697	.976	-1.8215	2.5220
		STOP-FSH	-.6626	.7486	.853	-2.7747	1.4496
		Bajando-Combo	1.8601	.6875	.066	-7.9695E-02	3.7998
Progesterona día +2	STOP-Combo	STOP-FSH	-5.5585	4.0983	.607	-17.1228	6.0057
		Bajando-Combo	4.9763	3.7857	.632	-5.7058	15.6583
		Bajando-FSH	-3.7224	3.9341	.827	-14.8233	7.3784
	STOP-FSH	STOP-Combo	5.5585	4.0983	.607	-6.0057	17.1228
		Bajando-Combo	10.5348*	3.7005	.047	9.317E-02	20.9764
		Bajando-FSH	1.8361	3.8522	.973	-9.0336	12.7058
	Bajando-Combo	STOP-Combo	-4.9763	3.7857	.632	-15.6583	5.7058
		STOP-FSH	-10.5348*	3.7005	.047	-20.9764	-9.32E-02
		Bajando-FSH	-8.6987	3.5178	.110	-18.6247	1.2273
	Bajando-FSH	STOP-Combo	3.7224	3.9341	.827	-7.3784	14.8233
		STOP-FSH	-1.8361	3.8522	.973	-12.7058	9.0336
		Bajando-Combo	8.6987	3.5178	.110	-1.2273	18.6247
Progesterona día +8	STOP-Combo	STOP-FSH	1.8496	6.7966	.995	-17.6075	21.3066
		Bajando-Combo	5.4717	6.0813	.847	-11.9376	22.8809
		Bajando-FSH	2.4223	6.0234	.983	-14.8213	19.6658
	STOP-FSH	STOP-Combo	-1.8496	6.7966	.995	-21.3066	17.6075
		Bajando-Combo	3.6221	6.4384	.957	-14.8094	22.0536
		Bajando-FSH	.5727	6.3837	1.000	-17.7023	18.8477
	Bajando-Combo	STOP-Combo	-5.4717	6.0813	.847	-22.8809	11.9376
		STOP-FSH	-3.6221	6.4384	.957	-22.0536	14.8094
		Bajando-FSH	-3.0494	5.6160	.961	-19.1268	13.0280
	Bajando-FSH	STOP-Combo	-2.4223	6.0234	.983	-19.6658	14.8213
		STOP-FSH	-.5727	6.3837	1.000	-18.8477	17.7023
		Bajando-Combo	3.0494	5.6160	.961	-13.0280	19.1268

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tabla 32. Prueba de Scheffé de la evolución de los niveles de progesterona por grupos de tratamiento.

2. DATOS DE LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

2.1. NÚMERO Y ESTADIO DE MADURACIÓN NUCLEAR DE LOS OVOCITOS

Al estudiar el número de ovocitos obtenidos tras punción folicular y su calidad se analizaron las siguientes variables: número de ovocitos obtenidos tras punción, número de ovocitos en estadio metafase II, en estadio metafase II postmaduros o en estadio metafase I maduros.

En la Tabla 33 se expresa el número de ovocitos en cada grupo de tratamiento y las características morfológicas de los mismos, para las variables que se han considerado más importantes:

Análisis descriptivo de la muestra

Protocolo		novocitos	M2	M2PM	M1M
STOP-Combo	N	38	38	38	38
	Media	8,1316	4,9474	,8158	,5263
	Desv. típ.	4,2118	3,4793	2,3464	1,0587
	Mínimo	2,00	,00	,00	,00
	Máximo	19,00	16,00	11,00	5,00
STOP-FSH	N	42	41	41	41
	Media	9,3095	6,5366	,8537	,3415
	Desv. típ.	6,1703	4,8120	2,0683	1,2769
	Mínimo	,00	,00	,00	,00
	Máximo	31,00	23,00	11,00	8,00
Bajando-Combo	N	59	58	57	57
	Media	6,6102	3,5862	1,1404	,3509
	Desv. típ.	4,4179	3,0952	2,0480	1,1725
	Mínimo	,00	,00	,00	,00
	Máximo	29,00	14,00	7,00	8,00
Bajando-FSH	N	50	49	49	49
	Media	7,9200	5,0612	,8367	,2857
	Desv. típ.	4,1297	3,4605	2,1149	,7360
	Mínimo	,00	,00	,00	,00
	Máximo	21,00	14,00	12,00	4,00
Total	N	189	186	185	185
	Media	7,8624	4,9032	,9297	,3676
	Desv. típ.	4,8204	3,8247	2,1214	1,0709
	Mínimo	,00	,00	,00	,00
	Máximo	31,00	23,00	12,00	8,00

Tabla 33. Descripción del número de ovocitos captados, número de ovocitos en metafase II, en metafase II postmaduros y metafase I maduros por grupos de tratamiento.

Siendo el número de ovocitos obtenidos tras punción: $7,86 \pm 4,82$, al valorar el estadio de maduración encontrado se observó que el número de ovocitos en estadio de metafase II fue de $4,92 \pm 3,82$ y su distribución por grupos de tratamiento fue:

- STOP-Combo: $4,94 \pm 3,47$
- STOP-FSH: $6,53 \pm 4,81$
- Bajando-Combo: $3,58 \pm 3,09$
- Bajando-FSH: $5,06 \pm 3,46$

El análisis estadístico se realizó para las variables número de ovocitos y número de ovocitos en estadio metafase II. El resto de parámetros valorados (ovocitos atrésicos, rotos, metafase I postmaduros, metafase I maduro, metafase I inmaduro, profase I) no se exponen porque no reflejaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento.

La prueba de homogeneidad de las varianzas reveló significación estadística para ambas variables (Tabla 34)

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
novocitos	2.943	3	184	.034
M2	2.785	3	181	.042

Tabla 34. Homogeneidad de las varianzas para las variables número de ovocitos (novocitos) y número de ovocitos en estadio metafase II (M2)

Al realizar el test de Kruskal-Wallis se apreció que los grupos estudiados no eran homogéneos ($p < 0,05$) para ambas variables por lo que se realizó un test de Scheffé (Tabla 35) para localizar las diferencias entre los distintos grupos de tratamiento.

Comparaciones múltiples

Scheffé

Variable dependiente	(I) Protocolo	(J) Protocolo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
novocitos	STOP-Combo	STOP-FSH	-1.1779	1.0674	.749	-4.1897	1.8338
		Bajando-Combo	1.4936	.9950	.523	-1.3139	4.3011
		Bajando-FSH	.2116	1.0260	.998	-2.6835	3.1066
	STOP-FSH	STOP-Combo	1.1779	1.0674	.749	-1.8338	4.1897
		Bajando-Combo	2.6716	.9660	.057	-5.3938E-02	5.3971
		Bajando-FSH	1.3895	.9979	.586	-1.4261	4.2051
	Bajando-Combo	STOP-Combo	-1.4936	.9950	.523	-4.3011	1.3139
		STOP-FSH	-2.6716	.9660	.057	-5.3971	5.394E-02
		Bajando-FSH	-1.2821	.9201	.586	-3.8781	1.3139
	Bajando-FSH	STOP-Combo	-.2116	1.0260	.998	-3.1066	2.6835
		STOP-FSH	-1.3895	.9979	.586	-4.2051	1.4261
		Bajando-Combo	1.2821	.9201	.586	-1.3139	3.8781
M2	STOP-Combo	STOP-FSH	-1.5892	.8338	.307	-3.9423	.7639
		Bajando-Combo	1.2982	.7755	.425	-.8902	3.4867
		Bajando-FSH	-.1139	.8004	.999	-2.3726	2.1449
	STOP-FSH	STOP-Combo	1.5892	.8338	.307	-.7639	3.9423
		Bajando-Combo	2.8875*	.7583	.003	.7476	5.0273
		Bajando-FSH	1.4754	.7838	.318	-.7364	3.6871
	Bajando-Combo	STOP-Combo	-1.2982	.7755	.425	-3.4867	.8902
		STOP-FSH	-2.8875*	.7583	.003	-5.0273	-.7476
		Bajando-FSH	-1.4121	.7214	.284	-3.4478	.6236
	Bajando-FSH	STOP-Combo	.1139	.8004	.999	-2.1449	2.3726
		STOP-FSH	-1.4754	.7838	.318	-3.6871	.7364
		Bajando-Combo	1.4121	.7214	.284	-.6236	3.4478

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tabla 35. Test de Scheffé para las variables número de ovocitos y número de metafase II por grupos de tratamiento.

Se pudo observar que las diferencias significativas se concentraron únicamente entre el grupo STOP-FSH y Bajando-Combo para la variables número de ovocitos ($p=0,05$) y número de ovocitos en metafase II ($p<0,01$), o lo que es lo mismo, el grupo STOP-FSH presentó mayor número de ovocitos y mayor número de metafase II que el grupo Bajando-Combo.

La representación gráfica de los resultados obtenidos se expresa en las Figura 4 y 5

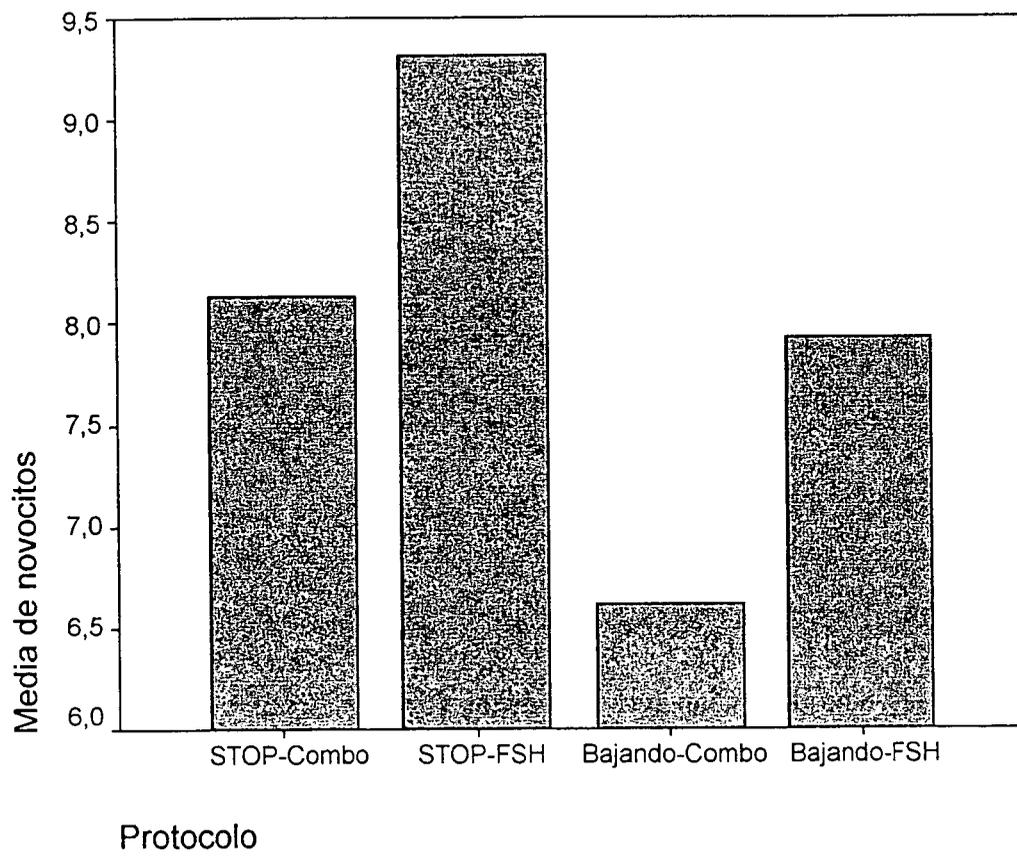
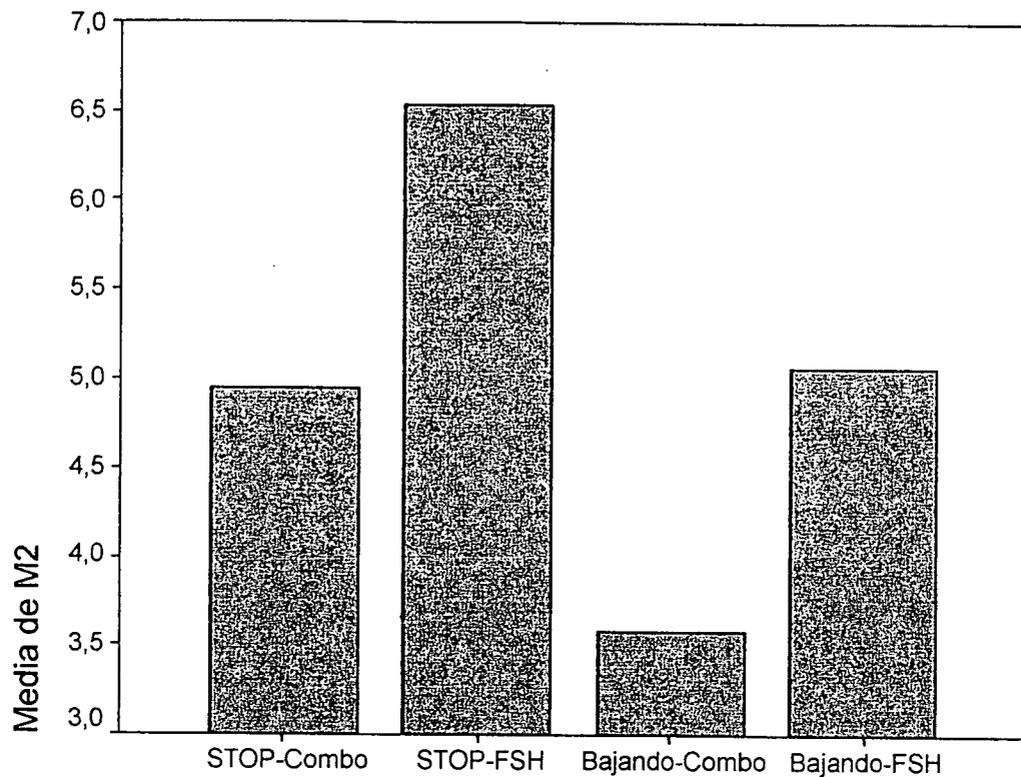


Figura 4. Representación del número de ovocitos obtenidos por protocolo de tratamiento



Protocolo

Figura 5. Representación gráfica del número de ovocitos en estadio metafase II obtenidos tras punción según los grupos de tratamiento

2.2. CALIDAD EMBRIONARIA

Para valorar la calidad de los embriones se determinó que los embriones de **buena calidad** fueron aquellos que presentaban, en día + 2, ≥ 4 células y fueron de *grado 1 ó 2*, según la clasificación referida en el apartado de material y métodos.

La distribución de la media del número de los embriones de buena calidad, por grupos de tratamiento, se puede observar en la Tabla 36 y en la figura 6.

Distribución del número de embriones de buena calidad por protocolo

Número embriones de buena calidad					
Protocolo	N	Media	Desv. típ.	Mínimo	Máximo
STOP-Combo	38	1,8421	1,0533	,00	3,00
STOP-FSH	40	2,1250	,9658	,00	4,00
Bajando-Combo	53	1,6038	1,1324	,00	3,00
Bajando-FSH	47	1,7021	1,1594	,00	3,00
Total	178	1,7978	1,0963	,00	4,00

Tabla 36. Distribución del número de embriones de buena calidad por protocolo de tratamiento (sobre el total de casos en que se realizó transferencia embrionaria)

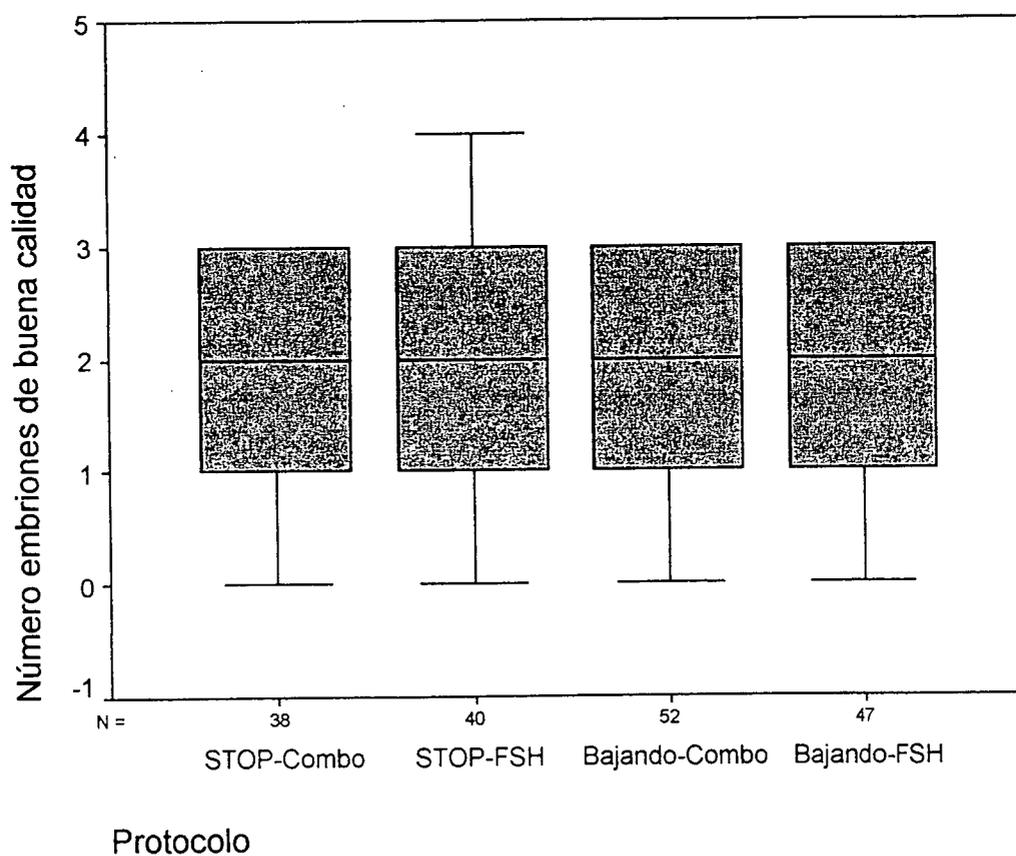


Figura 6. Representación gráfica del número de embriones de buena calidad por protocolo de tratamiento

Tras comprobar la homogeneidad de las varianzas se realizó una prueba de ANOVA y no se obtuvo significación entre los distintos grupos de tratamiento ($p=0,160$) en cuanto al número de embriones de buena calidad obtenidos.

2.3. TASAS DE FECUNDACIÓN EN FIV Y EN ICSI

Se analizó la tasa de fecundación tanto por FIV como por ICSI para cada uno de los protocolos de tratamiento (Tabla 37). Debe señalarse que en 14 casos se practicó FIV e ICSI en el mismo ciclo.

Tasas de fecundación FIV/ICSI por protocolo

Protocolo		Tasa de fecundación FIV	Tasa de fecundación ICSI
STOP-Combo	N	4	36
	Media	51.7675	84.7947
	Desv. tip.	41.6273	19.1965
STOP-FSH	N	8	40
	Media	43.5688	81.5492
	Desv. tip.	42.5586	22.4243
Bajando-Combo	N	6	55
	Media	45.0000	77.6991
	Desv. tip.	43.5890	30.7334
Bajando-FSH	N	9	45
	Media	77.7778	75.5089
	Desv. tip.	34.1971	24.1202
Total	N	27	176
	Media	56.5044	79.4655
	Desv. tip.	40.6809	25.2060

Tabla 37. Tasa fecundación FIV y tasa fecundación ICSI para cada uno de los protocolos de tratamiento

La tasa de fecundación mediante FIV fue del 56% y la tasa de fecundación mediante ICSI fue del 79,46 %.

Al realizar el test de ANOVA no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de fecundación para ninguno de los grupos de tratamiento, independientemente de que la técnica de reproducción asistida utilizada fuera FIV o ICSI.

3. RESULTADOS DEL CICLO DE ESTIMULACIÓN

3.1. TASA DE CANCELACIÓN

El porcentaje global de cancelaciones durante la estimulación y antes de la punción fue de 19,6% (46 casos).

El porcentaje de cancelaciones por no transferencia fue de 4,7% (11 casos). En los casos en los que se llevó a cabo la punción pero no se realizó la transferencia, las causas fueron: ausencia de ovocitos en la punción, fallo de fecundación y detención del desarrollo embrionario.

La causa de cancelación durante la estimulación más frecuente, para cada uno de los grupos, fue la falta de respuesta ovárica. Sólo en un ciclo se produjo un cuadro de hiperestimulación ovárica que motivó la cancelación de la estimulación y en otro ciclo hubo que cancelar el tratamiento por causa ajena al mismo.

La tasa de cancelación durante la estimulación en los distintos grupos se expresa en la Tabla 38.

Tabla de contingencia Ciclo cancelado * Protocolo

			Protocolo				Total
			STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH	
Ciclo cancelado	No	Recuento	38	42	59	50	189
		% de Protocolo	77.6%	76.4%	86.8%	79.4%	80.4%
	Si	Recuento	11	13	9	13	46
		% de Protocolo	22.4%	23.6%	13.2%	20.6%	19.6%
Total		Recuento	49	55	68	63	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 38. Tabla de contingencia para la presencia o no de cancelación en cada uno de los grupos de tratamiento

Al comparar todos los grupos de tratamiento, mediante un test de Chi-cuadrado (Tabla 39) no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,455$).

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.614 ^a	3	.455
Razón de verosimilitud	2.750	3	.432
Asociación lineal por lineal	.435	1	.510
N de casos válidos	235		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 9.59.

Tabla 39. Test de Chi-cuadrado para la variable cancelación en todos los grupos de tratamiento

Al distribuir la **tasa de cancelación según el protocolo de frenado hipofisario** (Tabla 40) se observó:

Tabla de contingencia Ciclo cancelado * Protocolo frenado hipofisario

			Protocolo frenado hipofisario		Total
			STOP	Bajando	
Ciclo cancelado	No	Recuento	80	109	189
		% de Protocolo frenado hipofisario	76.9%	83.2%	80.4%
	Sí	Recuento	24	22	46
		% de Protocolo frenado hipofisario	23.1%	16.8%	19.6%
Total		Recuento	104	131	235
		% de Protocolo frenado hipofisario	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 40. Distribución de ciclos cancelados según el protocolo de frenado hipofisario

Se realizó un test de Chi-cuadrado (Tabla 41) y no se observaron diferencias significativas en la tasa de cancelación de los protocolos de frenado hipofisario ($p=0,228$), o lo que es lo mismo, se canceló similar número de ciclos en ambos protocolos (STOP y Bajando).

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.454 ^a	1	.228		
Corrección por continuidad	1.082	1	.298		
Razón de verosimilitud	1.445	1	.229		
Estadístico exacto de Fisher				.249	.149
Asociación lineal por lineal	1.448	1	.229		
N de casos válidos	235				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 20.36.

Tabla 41. Test de Chi-cuadrado comparando la tasa de cancelación de los protocolos de frenado hipofisario

La valoración de la tasa de cancelación según el protocolo de estimulación ovárica (FSH o Combo), se observa en la Tabla 42.

Tabla de contingencia Ciclo cancelado * Protocolo Combo versus FSH

			Protocolo Combo versus FSH		Total
			FSH	Combo	
Ciclo cancelado	No	Recuento	92	97	189
		% de Protocolo Combo versus FSH	78.0%	82.9%	80.4%
	Sí	Recuento	26	20	46
		% de Protocolo Combo versus FSH	22.0%	17.1%	19.6%
Total		Recuento	118	117	235
		% de Protocolo Combo versus FSH	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 42. Distribución de la cancelación según protocolo de estimulación ovárica

Al realizar el test de Chi-cuadrado no se observó (Tabla 43) diferencias estadísticamente significativas en los protocolos con FSH y los protocolos con FSH y hMG ($p=0,340$)

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.911 ^b	1	.340		
Corrección por continuidad	.624	1	.430		
Razón de verosimilitud	.913	1	.339		
Estadístico exacto de Fisher				.411	.215
Asociación lineal por lineal	.907	1	.341		
N de casos válidos	235				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 22.90.

Tabla 43. Test de Chi-cuadrado para la tasa de cancelación de los protocolos de estimulación ovárica

La tasa de cancelación por no transferencia fue de 4,7% (11 casos). Las causas por las que no hubo transferencia fueron las siguientes: ausencia de ovocitos en la punción (3casos), fallo de fecundación (7 casos) y detención del desarrollo embrionario (1 caso).

La distribución por frecuencias y por grupos de tratamiento se expresa en la Tabla 44.

Tabla de contingencia Transferencia * Protocolo

			Protocolo				Total
			STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH	
Transferencia	Transferidos	Recuento	49	53	62	60	224
		% de Protocolo	100.0%	96.4%	91.2%	95.2%	95.3%
	No transferidos	Recuento		2	6	3	11
		% de Protocolo		3.6%	8.8%	4.8%	4.7%
Total		Recuento	49	55	68	63	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 44. Distribución por frecuencias y por grupos de tratamiento de la tasa de cancelación por no transferencia.

Al realizar un test de Chi-cuadrado de todos los protocolos de tratamiento no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

3.2. TASA DE IMPLANTACIÓN EN LOS CICLOS EN QUE SE REALIZÓ TRANSFERENCIA

La tasa de implantación en los ciclos en que se realizó transferencia, para el conjunto de la muestra valorada, fue 14,68% y la distribución por grupos de tratamiento fue:

- 8,55% para el grupo STOP-Combo
- 12,91% para el grupo STOP-FSH
- 13,62% para el grupo Bajando-Combo
- 22,34% para el grupo Bajando-FSH

Se observó una mayor tasa de implantación en las pacientes del grupo Bajando-FSH, lo que llevó a comparar éste con los otros 3 grupos y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,041$) a favor del primero.

3.3. TASA DE IMPLANTACIÓN EN CICLOS CON GESTACIÓN

En el presente apartado han sido incluidos exclusivamente los datos de los 54 casos que quedaron gestantes.

La distribución de la tasa de implantación (n° sacos en ecografía vaginal/ n° embriones transferidos X 100) por grupo de tratamiento se puede observar en la Tabla 45.

Distribución de la tasa de implantación según protocolo

Tasa de implantación			
Protocolo	N	Media	Desv. típ.
STOP-Combo	9	36.1111	11.7851
STOP-FSH	11	46.9697	26.6856
Bajando-Combo	14	50.5952	25.4163
Bajando-FSH	20	52.5000	26.6420
Total	54	48.1481	24.5327

Tabla 45. Distribución de las medias de tasa de implantación

Se comprobó la homogeneidad de varianzas para la tasa de implantación entre los 4 grupos de tratamiento y, como no se apreciaron diferencias significativas, se realizó un test de ANOVA (Tabla 46) el cual no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

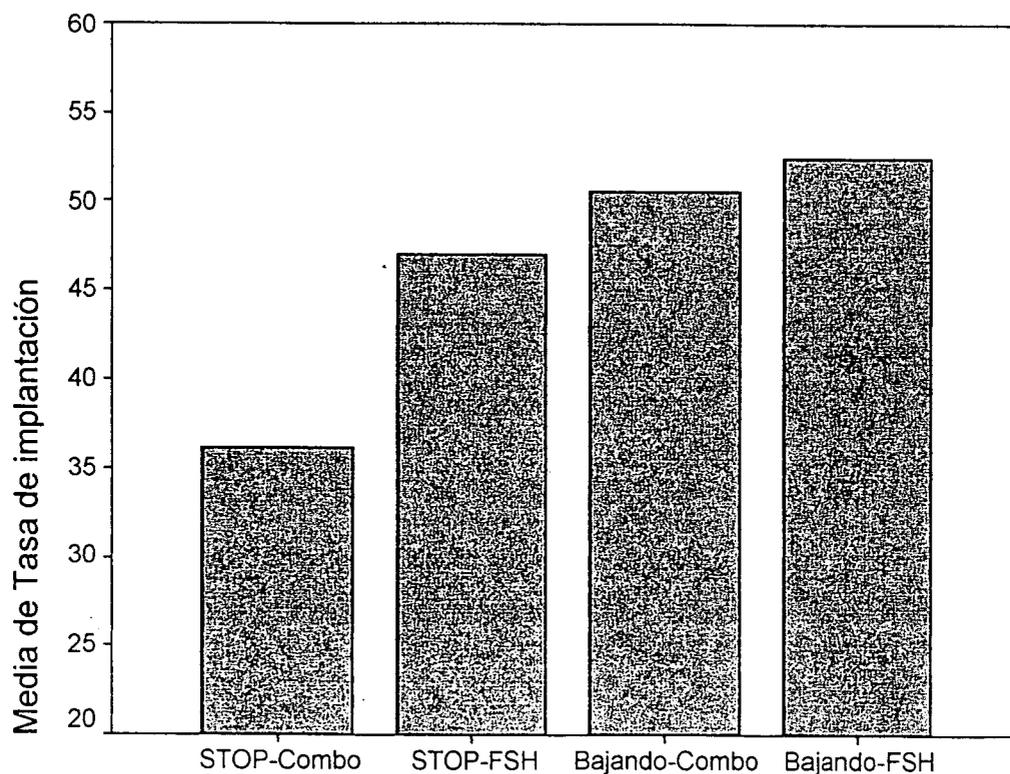
ANOVA

Tasa de implantación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1781.896	3	593.965	.986	.407
Intra-grupos	30116.252	50	602.325		
Total	31898.148	53			

Tabla 46. Test de ANOVA para la tasa de implantación por grupo de tratamiento

La representación gráfica de la tasa de implantación se observa en la Figura 7



Protocolo

Figura 7. Representación gráfica de la tasa de implantación para los distintos grupos de tratamiento.

Se observó que la mayor tasa de implantación correspondió al grupo Bajando-FSH, a pesar de no detectarse diferencias estadísticamente significativas, y la menor tasa de implantación se produjo en el grupo STOP-Combo.

3.4. TASA DE GESTACIÓN

Como fue señalado en material y métodos, la tasa de gestación ha sido valorada de acuerdo con 3 parámetros:

- tasa de gestación por ciclo iniciado (nº gestaciones/nº ciclos iniciados X 100) fue de 23% (54 gestaciones sobre 235 pacientes)
- tasa de gestación por punción (nº gestaciones/nº ciclos con punción folicular X 100) fue de 28,6%
- tasa de gestación por transferencia (nº gestaciones/nº ciclos completados X 100) fue de 30,3%

Al margen de otras consideraciones que serán expuestas para hacer un análisis estadístico detallado, un resumen de las distintas tasas de gestación en función del grupo de tratamiento se recoge en la Tabla 47.

TASA DE GESTACIÓN	STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH	Total	Chi-cuadrado
Por ciclo iniciado	18,4%	20%	20,6%	31,7%		P=0,282
- números de casos	9 sobre 49	11 sobre 55	14 sobre 68	20 sobre 63	54/235	
Por punción	23,7%	26,2%	23,7	49%		P=0,218
- número de casos	9 sobre 38	11 sobre 42	14 sobre 59	20 sobre 50	54/189	
Por transferencia	23,7%	27,5%	26,4%	42,5%		P=0,199
- número de casos	9 sobre 38	11 sobre 40	14 sobre 53	20 sobre 47	54/178	

Tabla 47. Tasa de gestación por ciclo iniciado, por punción y por transferencia en cada uno de los grupos de tratamiento

La distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado en los distintos grupos de tratamiento se expresa en la Tabla 48.

Tabla de contingencia Gestación *Protocolo

			Protocolo				Total
			STOP-Combo	STOP-FSH	Bajando-Combo	Bajando-FSH	
Gestación	No	Recuento	40	44	54	43	181
		% de Protocolo	81.6%	80.0%	79.4%	68.3%	77.0%
	Sí	Recuento	9	11	14	20	54
		% de Protocolo	18.4%	20.0%	20.6%	31.7%	23.0%
Total		Recuento	49	55	68	63	235
		% de Protocolo	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 48. Distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado y por grupo de tratamiento

Al realizar el test de Chi-cuadrado (Tabla 49) comparando todos los grupos de tratamiento para la tasa de gestación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.282$)

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.820 ^a	3	.282
Razón de verosimilitud	3.665	3	.300
Asociación lineal por lineal	2.746	1	.097
N de casos válidos	235		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 11.26.

Tabla 49. Test de Chi-cuadrado para la tasa de gestación por ciclo iniciado y por grupo de tratamiento

En el test de Chi-cuadrado para la tasa de gestación por punción se obtuvo una $p=0,218$ y para la tasa de gestación por transferencia una $p=0,199$ lo cual implica que no se apreciaron diferencias significativas en todos los protocolos de tratamiento.

La distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado según el protocolo de supresión hipofisaria se expresa en la (Tabla 50)

Tabla de contingencia Gestación * Protocolo frenado hipofisario

			Protocolo frenado hipofisario		Total
			STOP	Bajando	
Gestación	No	Recuento	84	97	181
		% de Protocolo frenado hipofisario	80.8%	74.0%	77.0%
	Sí	Recuento	20	34	54
		% de Protocolo frenado hipofisario	19.2%	26.0%	23.0%
Total		Recuento	104	131	235
		% de Protocolo frenado hipofisario	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 50. Distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado según protocolo de frenado hipofisario

Al realizar el test de Chi-cuadrado no se apreciaron diferencias significativas ($p=0.224$) en los protocolos de frenado hipofisario.

La distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado según el protocolo de estimulación ovárica se observa en la Tabla 51.

Tabla de contingencia Gestación * Protocolo Combo versus FSH

			Protocolo Combo versus FSH		Total
			FSH	Combo	
Gestación	No	Recuento	87	94	181
		% de Protocolo Combo versus FSH	73.7%	80.3%	77.0%
	Sí	Recuento	31	23	54
		% de Protocolo Combo versus FSH	26.3%	19.7%	23.0%
Total		Recuento	118	117	235
		% de Protocolo Combo versus FSH	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 51. Distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado según el protocolo de estimulación ovárica

Al realizar un test de Chi-cuadrado en los protocolos de estimulación ovárica, para la tasa de gestación, no se observaron diferencias significativas ($p=0,228$)

Así, se observó que la tasa de gestación por ciclo iniciado no presentaba diferencias estadísticamente significativas en los grupos de tratamiento, pero se ha destacar la tendencia a una mayor tasa de gestación del grupo Bajando-FSH (Figura 8).

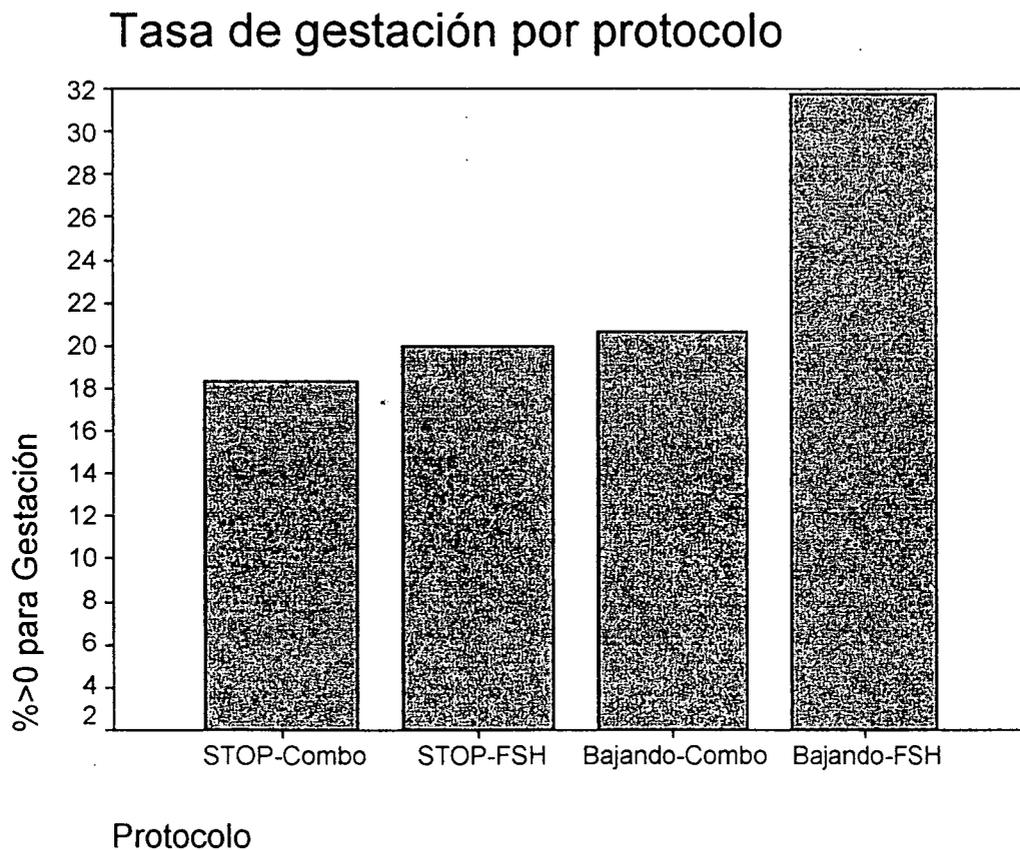


Figura 8. Representación gráfica de la tasa de gestación por ciclo iniciado para los distintos protocolos de tratamiento.

La apreciación de esta diferencia, globalmente, no significativa, (31,7% del grupo Bajando-FSH comparado con un 18,4%, 20% y 20,6% de los grupos STOP-Combo, STOP-FSH y Bajando-Combo respectivamente) ha determinado que se comparara directamente el grupo Bajando-FSH con los otros 3 protocolos de tratamiento agrupados (Tabla 52)

Tabla de contingencia Gestación * Bajando FSH vs otros protocolos

			Bajando FSH vs otros protocolos		Total
			Otros	Bajando-FSH	
Gestación	No	Recuento	138	43	181
		% de Bajando FSH vs otros protocolos	80.2%	68.3%	77.0%
	Sí	Recuento	34	20	54
		% de Bajando FSH vs otros protocolos	19.8%	31.7%	23.0%
Total		Recuento	172	63	235
		% de Bajando FSH vs otros protocolos	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla 52. Distribución de la tasa de gestación por ciclo iniciado del grupo Bajando-FSH y de los demás grupos (estos últimos juntos)

Al realizar un test de Chi-cuadrado (Tabla 53) entre el grupo Bajando-FSH (20 gestaciones, 31,7%) y los demás (34 gestaciones, 19,8%) se apreció un valor de p ($p=0.053$) muy cercano a la significación estadística.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.738 ^b	1	.053		
Corrección por continuidad	3.092	1	.079		
Razón de verosimilitud	3.573	1	.059		
Estadístico exacto de Fisher				.079	.041
Asociación lineal por lineal	3.722	1	.054		
N de casos válidos	235				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 14.48.

Tabla 53. Test de Chi-cuadrado para la tasa de gestación entre el grupo Bajando-FSH y el resto de grupos

Posteriormente se realizará un análisis multivariante para excluir el efecto de factores de confusión y poner de manifiesto la diferencia real, si existe, entre el grupo Bajando-FSH y el resto de protocolos.

4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

4.1 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA TASA DE IMPLANTACIÓN

4.1.1. En ciclos con resultado de gestación

Para el estudio de la tasa de implantación, únicamente en los ciclos cuyo resultado fue la gestación, se planteó un modelo en donde la variable dependiente (número de sacos) se ajustó por las variables de confusión mediante modelos lineales univariantes y multivariantes, dado que otros modelos más complejos (exponencial, y cúbico) que gráficamente parecían modelizar mejor la relación, no mejoraron el ajuste (R^2 y R^2 ajustado) ni la significación del modelo.

La regresión univariante no presentó significación estadística. Los modelos multivariantes incluyeron como variables independientes las variables: edad de la mujer, FSH día 3, ciclo anterior con baja respuesta, número de folículos desarrollados, estradiol el día de hCG, tamaño del tamaño del endometrio el día de hCG, número de ovocitos obtenidos tras punción, metafase II, número de embriones transferidos y calidad de los embriones, junto a la variable protocolo Bajando-FSH.

El modelo no resultó aceptable por su falta de significación global ($p=0,34$) y por la escasa variabilidad predicha (R^2 ajustada 0,03).

4.1.2. En ciclos en los que se realizó transferencia

La regresión multivariante de la tasa de implantación, en ciclos con transferencia, incluyendo como variables independientes: edad de la mujer, FSH día 3, ciclo anterior con baja respuesta, estradiol el día de hCG, tamaño del endometrio el día de hCG, número de ovocitos obtenidos tras punción, número de ovocitos en estadio metafase II, número de embriones transferidos y calidad de los embriones, y como variable dependiente el protocolo Bajando-FSH, mostró significación estadística ($p=0,011$).

La R^2 ajustada fue, sin embargo, de 0,073.

Las variables protocolo Bajando-FSH ($p=0,014$) y número de embriones transferidos ($p=0,043$) influyeron significativamente en la tasa de implantación y ello ajustado por el resto de variables incluidas en el modelo (Tabla 54).

Variables	P	RR	IC 95%
<i>Protocolo Bajando-FSH</i>	0,014	1,39	1,08-1,70
<i>Número embriones transferidos</i>	0,043	1,24	1,01-1,48
Nivel FSH día 3°	0,076	0,97	0,93-1,01
Tamaño endometrio día de hCG	0,441	0,99	0,96-1,09
Edad de la mujer	0,123	0,97	0,93-1,01
Metafase II	0,885	0,99	0,94-1,05
Baja respuesta previa	0,180	0,69	0,24-1,14
Número embriones buena calidad	0,109	1,12	0,97-1,26
Número ovocitos tras punción	0,519	0,99	0,94-1,03
Estradiol día hCG	0,609	1	---

Tabla 54. Variables incluidas en el modelo de regresión lineal múltiple del número de sacos implantados en los ciclos con transferencia. RR: riesgo relativo. IC 95%: intervalo de confianza del 95% del riesgo relativo. P: nivel de significación estadística

El número de sacos implantados fue superior en las pacientes que recibieron el protocolo Bajando-FSH con un RR de 1,39 (IC 95% 1,08-1,70), también fue superior a medida que aumentaba el número de embriones transferidos, con un RR, por cada embrión más, de 1,24 (IC 95% 1,01-1,48).

4.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA TASA DE GESTACIÓN

Durante el desarrollo de los resultados del estudio se ha observado que la tasa de gestación presentaba un mayor porcentaje en el grupo Bajando-FSH respecto a los otros grupos de tratamiento, cercano a la significación estadística. Por esta razón se planteó un análisis multivariante de la misma con respecto a otras variables de confusión.

4.2.1. Tasa de gestación por ciclo iniciado

El efecto del protocolo Bajando-FSH sobre la probabilidad de gestación en el análisis univariante se situó en el límite de la significación (test de Chi-cuadrado). La OR fue de 1,98 (IC95% 0,98 a 3,62) también en el límite de la significación estadística.

Se construyó un modelo de regresión logística para analizar el efecto de pertenecer al grupo Bajando-FSH sobre la probabilidad de gestación considerando el efecto de posibles factores de confusión.

La construcción del modelo de regresión logística se basó en la introducción como variables independientes de aquellas que habían demostrado en el análisis realizado que influían en la tasa de gestación o que se encontraban en el límite de la significación (protocolo Bajando-FSH, metafase II, número de ovocitos tras punción, número de embriones de buena calidad) y aquellas otras sobre las que existen evidencias en la bibliografía de su influencia en la gestación (edad de la mujer, valor FSH el día 3º ciclo, baja respuesta previa, estradiol el día de hCG, tamaño del endometrio el día de hCG y número de folículos) independientemente de nuestros resultados.

El mejor modelo de regresión logística obtenido (Tabla 55) incluyó variables significativas, es decir, aquellas que modificaban la probabilidad de gestación (protocolo Bajando-FSH, número de embriones de buena calidad, edad de la mujer y nivel de FSH día +3) y variables no significativas, es decir, variables que no modificaban la probabilidad de gestación (baja respuesta previa, número de ovocitos en metafase II, número de ovocitos tras punción, estradiol el día de hCG, tamaño del endometrio el día de hCG y número de folículos) pero que habían demostrado un efecto en el análisis univariante, o bien su presencia o ausencia en el modelo modificaba el efecto de las variables significativas o bien eran reconocidas en la bibliografía como variables de confusión.

Variable	P	OR	IC95%	
<i>Protocolo Bajando-FSH</i>	0.025	2.385	5.11 a	1.11
<i>Calidad de los embriones</i>	0.018	1.541	2.20 a	1.08
<i>Edad de la mujer</i>	0.028	0.888	0.99 a	0.80
<i>Niveles de FSH día 3°</i>	0.047	0.888	0.99 a	0.79
Tamaño del endometrio día de hCG	0.137	1.135	1.34 a	0.96
Metafase II	0.262	1.078	1.23 a	0.95
Baja respuesta previa	0.314	0.528	1.83 a	0.15
Número de folículos	0.437	0.935	1.11 a	0.79
Estradiol día de Hcg	0.631	1.000	1.00 a	1.00
Número de ovocitos tras punción	0.656	0.973	1.10 a	0.86

Tabla 55. Variables incluidas en el modelo de regresión logística de la probabilidad de gestación. OR: Odds ratio. IC95%: Intervalo de confianza del 95% de la odds ratio. P: Nivel de significación estadística

Así, el hecho de recibir el **protocolo de tratamiento Bajando-FSH** respecto a recibir cualquiera de los otros, incrementó de forma significativa la probabilidad de embarazo con una OR de 2,38 (IC 95% 5,11 a 1,11), y ello de forma ajustada por todas las variables incluidas en el modelo.

La otra variable que incrementó significativamente la probabilidad de gestación fue el **número de embriones de buena calidad**, con una OR de 1,54 (IC95% 2,20 a 1,08).

Contrariamente, **la edad de la mujer** con una OR de 0,89 (IC95% 0,99 a 0,80) y **el nivel de FSH el día +3** con una OR de 0,89 (IC95% 0,99 a 0,79) redujeron significativamente la probabilidad de gestación.

El resto de las variables incluidas en el modelo de regresión logística (baja respuesta previa, metafase II, número de ovocitos tras punción, estradiol el día de hCG, tamaño del endometrio el día de hCG y número de folículos) no presentaron ningún efecto significativo sobre la tasa de gestación.

4.2.2. Tasa de gestación por punción

Al eliminar los ciclos cancelados y analizar la probabilidad de gestación por punción, se observó una mayor tasa de gestación en las mujeres incluidas en el protocolo Bajando-FSH (40,0%) al compararla con el resto de protocolos agrupados (24,5%), estadísticamente significativa ($p=0,037$; test de Chi-cuadrado). Análogamente

la OR aumentó hasta 2,06 (IC95% 1,04 a 4,09), también significativa. Este efecto no fue atribuible a diferencias en las tasas de cancelación entre los grupos, puesto que la proporción de cancelaciones fue similar entre el grupo Bajando-FSH y el resto de los protocolos.

Se construyó un modelo de regresión logística para analizar el efecto del protocolo Bajando-FSH sobre la probabilidad de gestación por punción con la idea de confirmar este efecto positivo al ajustar por las potenciales variables de confusión.

La construcción del modelo de regresión logística se realizó de forma análoga al modelo descrito para la tasa de gestación por ciclo iniciado.

El mejor modelo de regresión logística obtenido (Tabla 56) incluyó variables significativas, es decir, aquellas que modificaban la probabilidad de gestación (recibir el protocolo Bajando-FSH, número de embriones de buena calidad, edad de la mujer y nivel de FSH día +3) y variables no significativas, (baja respuesta previa, metafase II, número de ovocitos tras punción, estradiol el día de hCG, tamaño del endometrio el día de hCG y número de folículos) que habían mostrado un efecto sobre la gestación en el análisis univariante, o influían en las variables significativas o bien eran reconocidas en la bibliografía como variables de confusión.

Variables	P	OR	IC95%
<i>Protocolo Bajando-FSH</i>	0.025	2.3855	5.11 a 1.11
<i>Calidad de los embriones</i>	0.018	1.5413	2.20 a 1.08
<i>Edad de la mujer</i>	0.028	0.8882	0.99 a 0.80
<i>Niveles de FSH día 3°</i>	0.047	0.8883	0.99 a 0.79
Tamaño del endometrio día de hCG	0.137	1.1345	1.34 a 0.96
Metafase II	0.262	1.0778	1.23 a 0.95
Baja respuesta previa	0.314	0.528	1.83 a 0.15
Número de folículos	0.437	0.9347	1.11 a 0.79
Estradiol día de hCG	0.631	0.9998	1.00 a 1.00
Número de ovocitos tras punción	0.656	0.9734	1.10 a 0.86

Tabla 56. Variables incluidas en el modelo de regresión logística de la probabilidad de gestación por punción. OR: Odds ratio. IC95%: Intervalo de confianza del 95% de la odds ratio. P: Nivel de significación estadística

Por tanto, tras el ajuste realizado con el modelo de regresión logística, el recibir el protocolo Bajando-FSH respecto a recibir cualquiera de los otros incrementó de forma significativa la probabilidad de gestación por punción con una OR de 2,38 (IC 95% 1,11 a 5,11).

La calidad de los embriones, con OR de 1,54 (IC95% 1,08 a 2,20), también aumentó la probabilidad de gestación por punción.

La edad de la mujer con una OR de 0,89 (IC95% 0,79 a 0,99) y el nivel de FSH el día 3º del ciclo con una OR de 0,89 (IC95% 0,79 a 0,99) redujeron significativamente la probabilidad de gestación por punción.

El resto de las variables incluidas en el modelo de regresión logística (baja respuesta previa, metafase II, número de ovocitos tras punción, estradiol el día de hCG, tamaño del endometrio el día de hCG y número de folículos), de la misma forma que ocurría en la tasa de gestación por ciclo iniciado, no presentaron ningún efecto significativo sobre la tasa de gestación por punción.

4.2.3. Tasa de gestación por transferencia

Por último, se modelizó la regresión logística para la tasa de gestación por transferencia, eliminando los ciclos cancelados no puncionados y los ciclos en los que no se realizó transferencia, incluyéndose las mismas variables que en los dos modelos previos.

La OR del protocolo Bajando-FSH fue de 2,11 (IC95% 1,05 a 4,25), estadísticamente significativa ($p=0,035$).

Al ajustar por las mismas variables de confusión que en los modelos referidos anteriormente, (edad de la mujer, FSH día 3º, ciclo anterior con baja respuesta, número de folículos desarrollados, estradiol el día de hCG, tamaño del tamaño del endometrio el día de hCG, número de ovocitos obtenidos tras punción, metafase II y calidad de los embriones), se obtuvieron OR ajustados similares a los comentados para la tasa de gestación por ciclo iniciado y para la tasa de gestación por punción.

Se ha de comentar que la inclusión en el modelo de regresión logística inicialmente planteado, como otra variable de confusión, del número de embriones transferidos (variable que en sí misma no presentó un efecto significativo sobre la tasa de gestación) mejoró el efecto del grupo de tratamiento Bajando-FSH, aumentando la OR a 2,52 e incrementando la significación ($p=0,191$) sobre la tasa de gestación. También supuso la pérdida de significación estadística de la variable calidad de los embriones transferidos (probablemente porque ambas variables aportan información en el mismo sentido). Así únicamente permanecían con significación estadística la variable protocolo Bajando-FSH y la variable edad, en el mismo sentido que el comentado en los distintos modelos de regresión logística planteados.

La variable número de embriones transferidos no presentó relación con el número de sacos implantados en el modelo de regresión realizado para la tasa de implantación en los ciclos con resultado de gestación y tampoco presentó relación con la probabilidad de gestación como se ha comentado en el modelo de regresión para la tasa de gestación

Así se observó que el protocolo Bajando-FSH supuso mejor tasa de implantación global y de gestación que el resto, una vez ajustado por todas las variables de confusión referidas.

5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Los 4 grupos de mujeres fueron similares para las variables que pueden influir en la probabilidad de gestación.

- No se observaron diferencias significativas en las variables epidemiológicas consideradas: edad de la mujer, IMC, edad del hombre, años de esterilidad, menarquia, antecedentes de gestaciones, partos o abortos previos entre las pacientes en función del protocolo de estimulación que habían recibido.
- Tampoco se observaron diferencias significativas en las variables clínicas representadas por los diagnósticos de esterilidad por factor femenino, ni por los diagnósticos de esterilidad por factor masculino entre los 4 grupos de tratamiento.
- No se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos en los valores de FSH el día 3° del ciclo, los valores de LH el día 3° del ciclo ni los antecedentes de baja respuesta previa.

La comparación de los datos de estimulación (parámetros de control ecográfico, días de estimulación, días de fase folicular, días de fase lútea) no reveló diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Se objetivaron diferencias en las dosis de FSH, hMG y en el número de ovocitos tras punción y en metafase II así como entre los niveles de progesterona entre algunos grupos.

- Respecto a la dosis total de FSH se observó que fue necesaria mayor dosis en el grupo Bajando-Combo al compararlo con el grupo STOP-FSH y el grupo STOP-Combo y también, fue necesaria mayor dosis de FSH en el grupo Bajando-FSH al compararlo con el grupo STOP-FSH. No se apreciaron diferencias significativas entre los grupos con supresión hipofisaria modelo STOP ni entre los grupos con supresión hipofisaria modelo Bajando.
- La dosis total de hMG (y, por lo tanto, de LH) fue mayor en las pacientes tratadas bajo el protocolo Bajando-Combo que las tratadas con el protocolo STOP-Combo.
- El número de ovocitos obtenidos tras la punción fue mayor en el grupo STOP-FSH que en el grupo Bajando-Combo, sin encontrar diferencias significativas en el resto de grupos.

- El número de ovocitos en estadio metafase II fue mayor el grupo STOP-FSH que en el grupo Bajando-Combo sin encontrar diferencias significativas en el resto de grupos.
- En los parámetros analíticos de la estimulación se observaron únicamente mayores niveles de progesterona en grupo STOP-FSH frente al grupo Bajando-Combo, sin existir diferencias significativas en el resto de grupos.

En la Tabla 57 se resume el número de casos valorados, en cada protocolo de tratamiento, para cada uno de los apartados estudiados durante el análisis estadístico. (Cancelados en HOC: número de ciclos de cada protocolo cancelados durante la estimulación ovárica. Punciones: número de ciclos en cada protocolo en los que se realiza la punción folicular. Número de embriones buenos: número de ciclos de cada protocolo en los que existía algún embrión de buena calidad. Cancelados no transfer: número de ciclos, en los que tras la punción folicular, han sido cancelados por no poder realizar la transferencia. Gestaciones: número de ciclos con resultado de gestación en cada protocolo de tratamiento).

Protocolo	Casos	Cancelados en HOC	Punciones	Ciclos embriones "buena calidad"	Cancelados no transfer	Gestacion
STOP-Combo	49	11	38	38	0	9
STOP-FSH	55	13	42	40	2	11
Bajando-Combo	68	9	59	53	6	14
Bajando-FSH	63	13	50	47	3	20
Total		46	189	178	11	54

Tabla 57. Representación del número de casos valorados en cada uno de los distintos apartados del análisis estadístico realizado.

En el análisis univariante las tasas de fecundación, cancelación, implantación y gestación no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, aunque el protocolo Bajando-FSH presentó mejores resultados en la tasa de implantación y en la tasa de gestación por ciclo iniciado, por punción y por transferencia.

- La tasa de fecundación mediante FIV y mediante ICSI no reveló diferencias significativas entre los grupos analizados.

- La tasa de cancelación no ofreció diferencias significativas en todos los grupos ni en los grupos tratados con protocolo STOP frente a los tratados con protocolo Bajando, ni en los grupos tratados con FSH frente a los tratados con FSH más hMG.
- La tasa de cancelación por no transferencia fue similar en todos los grupos.
- En la tasa de implantación no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos valorados.
- El protocolo Bajando-FSH presentó una tasa de gestación superior, aunque en el límite de la significación, respecto a los demás protocolos
- El protocolo Bajando-FSH presentó tasas de gestación por punción y por transferencia superiores significativamente al resto de protocolos agrupados.

Los modelos de regresión logística ajustados por variables de confusión seleccionadas en función de los resultados univariantes o según la bibliografía confirmaron los mejores resultados del protocolo Bajando-FSH.

En el modelo de regresión lineal, para la tasa de implantación en los ciclos estimulados cuyo resultado fue la gestación, no se observó una relación significativa entre el número de embriones transferidos y el número de sacos implantados y tampoco se apreció relación significativa entre el protocolo de tratamiento y la tasa de implantación.

Tras el análisis de regresión lineal múltiple para la tasa de implantación en todos los ciclos en que se realizó transferencia se observó que la variable protocolo Bajando-FSH y la variable número de embriones transferidos influyeron significativamente, favoreciendo la misma.

Tras el análisis de regresión logística para la tasa de gestación se comprobó que:

- La probabilidad de gestación por ciclo iniciado y la probabilidad de gestación por punción fueron 2,38 veces superiores en el grupo Bajando-FSH respecto a todos los demás.
- La probabilidad de gestación por transferencia fue entre 2,38 y 2,52 veces mayor (en función de las variables de confusión que intervinieron en el ajuste) en el grupo Bajando-FSH respecto a todos los demás
 - La calidad embrionaria aumentó la probabilidad de gestación 1,54 veces.
 - La edad de la mujer y el nivel de FSH el día +3 redujeron la probabilidad de gestación 1,12 veces (OR de 0,89).

DISCUSIÓN

El éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) depende, sobre todo, de la cuidadosa selección de las pacientes, el buen manejo y la individualización de la hiperestimulación ovárica controlada [128].

Cuando se plantea un tratamiento de reproducción asistida a una pareja con problemas de esterilidad, el objetivo fundamental es conseguir el nacimiento de un niño sano con la máxima eficiencia y con los mínimos riesgos y efectos secundarios. Este objetivo lleva implícito conseguir un adecuado desarrollo folicular, que garantice una punción folicular con obtención de un número adecuado de ovocitos que puedan ser fecundados, obteniéndose, a su vez, un número de embriones para una transferencia adecuada.

Seleccionar correctamente a las pacientes tributarias de fecundación in vitro e individualizar la hiperestimulación ovárica controlada implica detectar a las mujeres susceptibles de desarrollar una baja respuesta para poder aplicarles un protocolo de estimulación adecuado, es decir, aquél capaz de maximizar el desarrollo folicular. Por otra parte, sería necesario identificar a aquellas mujeres para las que ningún tratamiento va a ser efectivo, con el fin de recomendarles la donación de ovocitos (si es posible) o la adopción; conviene señalar que, en algunos medios, la donación de ovocitos no es factible (carencia de la prestación en hospitales públicos o falta de los medios económicos necesarios).

Por estas razones, no sólo establecer el pronóstico de baja respuesta se hace imperativo sino que desarrollar protocolos que permitan estimular suficientemente al mayor número posible de este tipo de mujeres es otra necesidad prioritaria en un programa de reproducción asistida.

La presente memoria es el resultado de un proyecto de trabajo que surgió en el contexto de un centro clínico público, básicamente asistencial, dedicado a la reproducción asistida. Se trata de un estudio, sobre la respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada en técnicas de reproducción asistida, de 4 protocolos de tratamiento, que se han realizado en pacientes estériles en las que se estableció el pronóstico de baja respuesta.

El objetivo del estudio prospectivo planteado fue comprobar si el pronóstico de baja respuesta, establecido de acuerdo con criterios de edad, nivel basal de FSH y baja

respuesta previa es correcto y determinar cuál de los protocolos de estimulación utilizados resulta más efectivo en estas pacientes.

Todavía en la actualidad, a pesar de los avances farmacológicos y las mejoras que éstos han supuesto para la estimulación multifolicular del ovario, la baja respuesta es un resultado indeseable que condiciona gravemente el resultado del tratamiento, obligando con frecuencia a la cancelación del mismo. Por otra parte, se trata de una situación de difícil solución, puesto que, la mayor parte de veces, traduce una incapacidad funcional del ovario, al menos, para que un tratamiento de este tipo pueda ser aplicado.

El análisis de la baja respuesta ovárica a la estimulación multifolicular, ha supuesto el planteamiento básico del presente estudio. Se trata de pronosticar la posible baja respuesta en pacientes que se van a someter a un ciclo de estimulación ovárica, para orientar el mismo, con las medidas terapéuticas disponibles (tanto agonistas de la GnRH como gonadotrofinas), de forma individualizada y conseguir una respuesta folicular adecuada y, por supuesto, como objetivo final, una gestación.

Es obvio que los distintos programas, en función de las circunstancias en que se desarrollan, establecen diferentes criterios de cancelación, pero la cancelación del tratamiento por ausencia de respuesta ovárica a las gonadotrofinas puede alcanzar tasas no despreciables y ello siempre supone una desagradable situación, tanto para las pacientes como para los equipos clínicos.

Un estudio llevado a cabo en nuestro centro [20] en que fue incluida la totalidad de ciclos estimulados para FIV entre enero de 1996 y diciembre de 1998 puso de manifiesto que el 14,6% de ciclos fue cancelado por baja respuesta considerando como tal el desarrollo de menos de 4 folículos preovulatorios. Esta tasa de cancelación es concordante con la observada por otros autores:

- Rosenwaks y cols [22], analizando ciclos de estimulación ovárica con gonadotrofinas, sin supresión hipofisaria con agonistas, refirieron una tasa de cancelación que alcanzó el 16% durante 1984.

- Cameron y cols [1] estimaron la prevalencia de baja respuesta entre el 3 y el 29% de las mujeres tributarias de FIV.

- Mettler y cols [15] observaron la baja respuesta en un 19% de casos

- Para Ben-Rafael y cols [23] supuso un 12%
- Para Scott y cols supuso un 30 % [16].

En nuestro centro la tasa de cancelación en los ciclos de tratamiento mediante técnicas de reproducción asistida en los 3 últimos años fue 11,89% en el año 1999, 13,87% en el año 2000 y 13,30% en el año 2001. La tasa de cancelación por baja respuesta fue: 8,59% en el año 1999, 7,78% en el año 2000 y 6,20% en el año 2001, apreciándose una disminución de la misma a lo largo del tiempo.

En el presente estudio, realizado sobre pacientes diagnosticadas de baja respuesta en un ciclo previo o con el pronóstico de desarrollar la misma, se observó que la tasa de cancelación media fue del 19,6% (46 pacientes), mayor que la tasa de cancelación por baja respuesta observada en el global de los tratamientos de reproducción asistida valorados entre el año 1999 y el año 2001. No obstante, durante el período comprendido entre los años 1996 y el año 1998 la tasa de cancelación en pacientes con FSH el día 3° del ciclo $>8,5$ UI/L, que constituiría uno de los factores pronóstico de baja respuesta en el estudio actual, fue de 33,3%. Aunque se insistirá posteriormente, este dato permite afirmar que el manejo individualizado que se ha realizado en este grupo seleccionado de pacientes ha permitido disminuir sensiblemente la tasa de cancelación.

Entre los objetivos del clínico que desarrolla su labor en reproducción asistida está el disminuir todo lo posible la tasa de cancelación por baja respuesta. La baja respuesta a la estimulación ovárica es considerada como uno de los desafíos más importantes para el ginecólogo que dirige las estimulaciones, de ahí que sea fundamental definir adecuadamente lo que se considera baja respuesta con el fin de valorar y comparar con el máximo rigor los resultados de los distintos estudios sobre el tema.

A lo largo de los años, los avances en el conocimiento de la fisiología y la fisiopatología ovárica han permitido que distintos autores valoraran los distintos factores –edad de la mujer, hormonas hipofisarias, esteroides sexuales,...– que podrían servir para predecir la reserva ovárica a lo largo de la edad reproductiva. La valoración de estos factores ha permitido establecer, con mayor o menor sensibilidad y especificidad, el pronóstico de baja respuesta. El manejo terapéutico de estas pacientes debe estar basado en el pronóstico establecido y en la experiencia de tratamiento conseguida durante la práctica clínica diaria.

No resulta fácil determinar los elementos que permiten establecer un pronóstico de baja respuesta, porque no existe acuerdo unánime respecto a este concepto.

Revisada la bibliografía sobre el tema se observó que, en dependencia del autor, eran incluidos unos parámetros u otros en la definición de este concepto. Así: según el número de folículos maduros (preovulatorios) detectados por ecografía se define la baja respuesta como menos de 3 folículos [11], menos de 2 folículos [12], menos de 4 folículos [14]. Tradicionalmente (hasta el año en curso), nuestro grupo canceló la estimulación ante el desarrollo de menos de 4 folículos preovulatorios.

Según los niveles de E₂ el día de hCG serían pacientes con baja respuesta las que tuvieran un estradiol menor de 400 pg/mL [11], o menor de 300 pg/mL [12], o menor de 501 pg/mL [14], o menor de 600 pg/mL [16, 17], o menor de 1000 pg/mL [18].

Según el número de ovocitos maduros obtenidos tras punción folicular sería baja respuesta la obtención de menos de 3 ovocitos maduros [14, 18], o menos de 4 ovocitos [19] Dirnfeld 1999.

Según los niveles de FSH el día 3 del ciclo de fase folicular del estímulo sería baja respuesta una FSH ≥ 9 UI/L [17]. Según Evers y cols 1998 [72] las pacientes con niveles de FSH >17 mUI/mL debe ser advertidas que presentan un riesgo 4.1 veces mayor de tener baja respuesta que pacientes con niveles de FSH < 17 mUI/mL.

En un estudio previo en nuestro centro se observó que puede considerarse elevada y, en consecuencia, elemento diagnóstico para el fallo ovárico oculto, una FSH circulante mayor de 8,5 UI/L en el día 3 del ciclo. Aunque aparentemente bajo, este valor límite o punto de corte parece adecuado ya que la tasa de cancelación en mujeres con FSH basal mayor de 8,5 UI/L fue de 39,3% y la tasa de cancelación por BR en este grupo de pacientes fue de 33,3% frente a la tasa de cancelación por baja respuesta en mujeres cuyo nivel de FSH fue normal que correspondió a un 10,73%. Se ha de recordar que la tasa de cancelación por baja respuesta en la muestra estudiada fue del 19,6%, como ha sido expuesto.

Otros autores como Muasher y cols [85] y Droesch y cols [96] establecieron las siguientes categorías en función del cociente FSH/LH:

- pacientes hiper-respondedoras: aquéllas con un cociente LH/FSH $\geq 1,5$

- pacientes normo-respondedoras con un cociente FSH/LH de 1 (ambos valores por debajo de 10 UI/L)
- pacientes pobres respondedoras con una FSH basal >15 UI/L y un cociente FSH/LH >1,5; estas últimas presentaron tasas de gestación muy bajas.

En un intento de mejorar la precisión en el diagnóstico de baja respuesta en función de la determinación de la FSH, se han establecido distintas pruebas diagnósticas cuyos resultados orientan tanto sobre el diagnóstico como sobre el pronóstico de la paciente baja respondedora:

- Scott y cols [21], refiriéndose al test de clomifeno, descrito por Navot y cols [97] concluyeron que un test es anómalo (reserva ovárica disminuida) siempre que el nivel de FSH es >10 UI/L el día 10° del ciclo.
- Fanchin y cols [101] desarrollaron el test EFORT (Exogenous Follicle stimulating hormone Ovarian Reserve Test). Consistía en, administrando 300 UI de FSH el día 3° del ciclo, realizar determinaciones de FSH y E₂ antes y a las 24 h de la administración de FSH. Valoraron la FSH basal y el incremento de E₂ tras el estímulo. Se consideró anormal tanto un valor basal de FSH superior a 11 UI/L como un incremento de E₂ inferior a 30 pg/mL, ya que, en un estudio previo de los mismos autores, 30 pg/mL fue el incremento más bajo a las 24 h en pacientes con respuesta adecuada a la estimulación ovárica.

1. CRITERIOS PRONÓSTICOS DE BAJA RESPUESTA

Para este estudio se pretendía cubrir el espectro de los criterios pronósticos de baja respuesta de la forma más eficaz posible aunque sin recurrir a pruebas complementarias complicadas o caras. Para ello, se decidió incluir la **baja respuesta previa** (criterio que no parecía discutible), la **edad reproductiva avanzada**, puesto que la baja respuesta es un fenómeno vinculado a la edad [21] y el nivel de **FSH basal** que, en la experiencia del centro, es indicativo de fallo ovárico oculto. Con la presencia de uno de ellos se estableció el pronóstico ante un ciclo de tratamiento para FIV. La distribución de cada uno de ellos en los grupos de tratamiento planteados fue homogénea.

1.1. Edad

Existen evidencias de que los cambios en el potencial reproductivo relacionados con la edad están relacionados con la capacidad funcional del ovario y con la calidad de los ovocitos y embriones [58]. Así, en programas de donación de ovocitos la tasa de gestación es independiente de la edad [58].

La disminución de la fertilidad relacionada con la edad sugiere una disminución de la reserva ovárica [56]. La menor reserva de folículos, en ciclos de tratamiento para FIV aumenta la tasa de cancelación; además, la calidad biológica de los ovocitos y de los embriones es menor y se produce una disminución en las tasas de fecundación, de implantación y de gestación [59-61].

Levi y cols [62], tras definir la reserva ovárica disminuida como la de aquellas pacientes con FSH ≥ 14 UI/L y valorando 9800 ciclos de tratamiento, observaron que entre las pacientes afectas sólo concebía el 2,7% y, de las que lo hacían, el 71,4% abortaba. Los abortos en el 1º trimestre de gestación fueron del 57,1% en pacientes menores de 35 años, del 63,5% en pacientes entre 35 y 40 años y del 90% en pacientes mayores de 40 años. Concluyeron que la disminución de la reserva ovárica implica dificultad en la concepción y supone un aumento en el número de abortos.

Otros autores habían reflejado que el empeoramiento con la edad del factor endometrial contribuye de manera decisiva a la disminución de la tasa de gestación [63], refiriendo entre otras causas: alteraciones en la perfusión vascular del endometrio por arteriosclerosis, variaciones en el colágeno endometrial,...

En su día se produjo un intenso debate sobre si la disminución de la fertilidad femenina relacionada con la edad, es debida, fundamentalmente, a la escasa calidad de los ovocitos y embriones o a la disminución de la capacidad del útero para sostener una adecuada implantación embrionaria. Navot y cols [58]⁹⁴ desarrollaron un estudio con donación de ovocitos de pacientes jóvenes (30 ± 4 años) a pacientes menores de 40 años y a pacientes mayores de 40 años, todas ellas diagnosticadas de fallo ovárico (FSH >25 UI/L). Se controlaron las variaciones posibles en la calidad de los ovocitos transfiriendo ovocitos del mismo ciclo de estimulación a una donante a una receptora <40 años y a otra receptora >40 años. No observaron diferencias en la tasa de gestación en ambos grupos, obteniendo una menor tasa de abortos que en pacientes de la misma edad en las que se utilizan sus propios ovocitos. Concluyeron que la capacidad para concebir y

llevar una gestación a término, cuando la calidad de los ovocitos está controlada, es independiente de la edad del útero en pacientes en la 5ª década de vida.

1.2. FSH basal

Al referirnos a la determinación de la FSH basal se ha de reflejar que ésta se analizó el día 3º del ciclo, pero no en todas las pacientes se consiguió que la determinación coincidiera con el ciclo previo al estímulo con gonadotrofinas. Sí que se realizó, en todas las pacientes, una valoración de la FSH basal en los 6 meses previos al estímulo. Scott y cols [93] observaron que las pacientes con niveles de FSH <15 mUI/mL presentaban escasas variaciones ciclo a ciclo ($\pm 2,6$ UI/L), pero las pacientes con niveles más altos de FSH (≥ 15 UI/L) tenían un grado mayor de variación (± 7 UI/L), por lo que concluyeron que la variación ciclo a ciclo no predecía los cambios en la respuesta ovárica pero las pacientes con variaciones importantes respondían peor a la estimulación. Con el paso del tiempo, la mujer desarrolla variaciones en los niveles de FSH, que pueden ser indicativas de la disminución de la reserva ovárica. Por estas razones, Scott y cols [93] recomendaron hacer dos determinaciones de FSH en ciclos distintos, para corregir las variaciones entre los distintos ciclos y estimar más correctamente la reserva ovárica.

Las circunstancias de recepción y tratamiento de las pacientes valoradas en el presente estudio impidieron que se pudieran realizar dos determinaciones basales de FSH con la cadencia adecuada.

Otros autores han reflejado en sus publicaciones la posibilidad de mejorar el pronóstico considerando otros parámetros, como son los que se enumeran a continuación.

1.3. La inhibina B

Balash y cols [80] la consideraron como mejor predictor de la respuesta a las gonadotrofinas exógenas que la edad y, equivalente al valor de la FSH el día 3º del ciclo; Peñarrubia y cols [81] concluyeron que es un buen factor predictivo de la respuesta ovárica. En cambio, Creus y cols [204] refirieron que la única variable asociada con la tasa de gestación fue la edad y la FSH fue el mejor predictor de la tasa de cancelación, y por lo tanto, mejor que la inhibina B; otros autores afirmaron que la variabilidad en la determinación de los niveles basales [78] la relegan a un segundo

plano. En nuestro estudio no se realizó la determinación de inhibina B porque la revisión de la bibliografía publicada al respecto no lo justificaba plenamente y porque los estudios previos realizados en nuestro centro apoyaban suficientemente el valor pronóstico de la determinación de FSH. En otras palabras, se consideró que la determinación de inhibina B no aportaba nada concluyente al estudio proyectado, que pretendía, entre otras cosas, simplificar el manejo clínico.

1.4. El estradiol

Como Lashen y cols [71] señalaron que la FSH normal el día 3° del ciclo no siempre implica una reserva ovárica normal, establecieron que la FSH basal sola no era un factor lo suficientemente predictivo de la respuesta ovárica. De acuerdo con otros autores, [18, 70] postularon el valor del estradiol inicial el día 3° del ciclo. El nivel circulante de estradiol puede ser elevado como consecuencia de la elevación de FSH, debido a un reclutamiento folicular aumentado pero, a su vez, puede contribuir a normalizar el nivel de FSH causante del anormal reclutamiento señalado. Scott y cols [74] señalaron que los niveles de E₂ elevados al inicio de la fase folicular podrían indicar que la paciente se encuentra en una fase más avanzada de reclutamiento y desarrollo folicular. Esto supondría una disminución en los niveles de gonadotrofinas circulantes lo que proporcionaría una alteración en la estimación adecuada de esos valores y, al mismo tiempo, un acortamiento de la fase folicular similar al del estado perimenopáusico. Existiría un reclutamiento de menos cantidad de folículos con la administración exógena de gonadotrofinas con el consiguiente peor pronóstico para la estimulación. Parece haberse confirmado que el nivel de E₂ en el día 3 del ciclo predice el número de ovocitos que se obtienen en la captación. Licciardi y cols [69] obtuvieron menos ovocitos en pacientes cuyo nivel de E₂ fue mayor de 60 pg/mL y Evers y cols [72] reflejaron que este valor de estradiol, junto con una FSH normal supone un riesgo 4,3 veces mayor de baja respuesta que en las pacientes con FSH y estradiol normales.

Smotrich y cols [70] definieron como límite superior del E₂ basal 80 pg/mL, nivel a partir del cual obtuvo peor respuesta y una mayor tasa de cancelación; por encima de 100 pg/mL no obtuvieron ninguna gestación.

En el presente estudio no se ha considerado el nivel de estradiol.

-- Así, en nuestro estudio se han concretado, en tres, los criterios utilizados para definir la baja respuesta: **FSH basal >8,5 UI/L, edad ≥40 años o antecedente de baja**

respuesta previa. Fue considerado que la aplicación de estos criterios debe incluir a la gran mayoría de pacientes con riesgo de desarrollar una baja respuesta en un programa de FIV. Por otra parte, uno de los objetivos del estudio fue comprobar la realidad de esta afirmación.

2. DISCUSIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE LA MUESTRA ESTUDIADA

La distribución de los parámetros que han determinado el *pronóstico de baja respuesta* en nuestra población fue como sigue:

- **la edad** media de las pacientes fue de 35 años cumplidos (rango de 26 a 40 años) (Tabla 2), coincidiendo con las observaciones de Virro y cols [7] que refirieron que el porcentaje de mujeres incapaces de concebir aumentaba de un 6% en menores de 25 años a un 43 % entre los 36 y 40 años y las de Sherman y cols [49, 205] que demostraron un aumento en los niveles de FSH en mujeres de 35 años con ciclos menstruales normales.
- los niveles medios de **FSH el día 3º del ciclo** fueron 10,67 UI/L (rango 2,10 a 38,30) (Tabla 2) y distintos autores han referido baja respuesta en valores de FSH superiores a 9-10 UI/L [17], 15 UI/L [87]y hasta 25 UI/L [74, 93].
- las pacientes con **antecedentes de baja respuesta previa** fueron un total de 40 (17% de la muestra) (Tabla 6). A este respecto, es razonable esperar una baja respuesta en la paciente que previamente la hizo, si no se modifica su estimulación.

Los tres parámetros estudiados presentaron una distribución homogénea en los distintos protocolos de tratamiento establecidos, sin apreciarse diferencias significativas entre ellos.

Han sido definidos diversos *factores de riesgo de baja respuesta* ante la estimulación ovárica controlada para desarrollo multifolicular que son clínicamente útiles para pronosticar la misma. Barri y cols [18] y Ben-Rafael y cols[23] reflejaron los siguientes: edad de la paciente, historia familiar de fallo ovárico prematuro, historia de

cirugía pélvica sobre los anejos, endometriosis, obesidad, infertilidad idiopática y tabaco.

En el estudio realizado no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento para las siguientes variables: IMC (Tabla 4), menarquia (Tabla 4), años de evolución de la esterilidad (Tabla 4), historia obstétrica previa (Tablas 8, 9 y 10)

Han sido publicadas multitud de exploraciones para determinar la reserva ovárica; unas, de carácter basal o estático: edad, determinaciones hormonales a lo largo del ciclo menstrual (sobre todo el 3º día de ciclo), ecografía vaginal, y otras, de carácter funcional o dinámico. Las pruebas basales o estáticas, que constituyen la base del presente estudio, han sido comentadas anteriormente. *Las pruebas funcionales o dinámicas*, definidas en el apartado de introducción, han supuesto cierta mejora en el diagnóstico de la baja respuesta y en el establecimiento del pronóstico de la misma sobre pacientes subsidiarias de técnicas de reproducción asistida. El objetivo del presente estudio ha sido, fundamentalmente, valorar los resultados del tratamiento de estimulación ovárica en pacientes diagnosticadas de baja respuesta en función de los parámetros basales de diagnóstico, por lo que no se han considerado las pruebas funcionales o dinámicas.

Como fue expuesta en el apartado de resultados, al valorar la situación reproductiva de la mujer, la distribución de los *diagnósticos de esterilidad* (Tabla 11), dentro del factor femenino, fue homogénea en cada uno de los grupos de tratamiento. Así mismo, valorado el factor masculino (Tabla 12), se comprobó que la distribución de las alteraciones seminales era homogénea en los distintos grupos de tratamiento.

La *homogeneidad* demostrada, tras la realización del test de homogeneidad de las varianzas y las correspondientes prueba paramétricas o no paramétricas, en cuanto a las pruebas basales valoradas: *edad de la mujer, IMC, edad del hombre, años de esterilidad, FSH día 3º del ciclo, LH día 3º del ciclo, antecedentes de baja respuesta previa, antecedentes de gestaciones (partos y abortos) previos, diagnóstico de esterilidad por factor femenino y diagnóstico de esterilidad por factor masculino*, determinó que no se encontraran diferencias significativas entre los distintos grupos, lo cual permitió que se completara el estudio.

3. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

Una vez definido, lo más concretamente posible, el concepto de baja respuesta, habiendo establecido la homogeneidad de los distintos grupos de tratamiento para los parámetros definidos, conviene justificar los protocolos de tratamiento utilizados para mejorar la respuesta ovárica, disminuyendo el porcentaje de cancelación y aumentando el porcentaje de gestación.

El análisis de la evolución de los distintos protocolos de tratamiento usados en reproducción asistida a lo largo de los años ha permitido diferenciar distintas modificaciones: aumento de las dosis de gonadotrofinas, regulación de la estimulación con agonistas de la GnRH y tratamiento coadyuvantes de las gonadotrofinas.

La evolución del uso de las gonadotrofinas en reproducción asistida se resume en el siguiente apartado: con la **hMG** se obtenía una mayor respuesta folicular que con el citrato de clomifeno, pero se ha observado que pequeñas cantidades de LH son necesarias para la maduración folicular [206] y cantidades mayores pueden determinar un efecto deletéreo en el proceso reproductivo (fertilización, calidad embrionaria, incluso mayor tasa de abortos)[115].

Posteriormente la eliminación del efecto no deseable de la LH (incluido en la hMG) supuso la aparición de la **FSH pura** (FSHp) que tiene una actividad FSH del 99% y una actividad LH del 1%. Jones y cols [207] concluyeron que la FSH sola, sin la acción de la LH es capaz de iniciar y mantener los niveles de E₂ adecuados para una correcta maduración folicular. En un metanálisis realizado por Daya y cols [114] mediante la valoración de 8 estudios randomizados comparando FSHp con hMG, con protocolos de agonista (corto o largo) se concluyó que la tasa de gestación, fue significativamente mayor con el uso de FSHp y con los protocolos largos de agonista.

Con el desarrollo tecnológico, la FSHp, cuya vía de administración es intramuscular, ha dejado el paso a la **FSH ultrapura** (FSH-HP) que permite la administración subcutánea ya que le han sido eliminadas las proteínas urinarias contaminantes, sin modificar su farmacocinética ni su farmacodinamia, por lo tanto las dosis son equivalentes [118].

El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ha permitido la producción de una FSH altamente purificada sin actividad LH, la **FSH recombinante**, (FSHr). La introducción de este fármaco ha dado lugar a que se cuestione si la ausencia de

actividad LH permite el mismo efecto en el crecimiento folicular y la esteroidogénesis que las preparaciones de FSH urinaria.

Devroey y cols [121], sobre 51 pacientes tratadas con distintas pautas, sólo FSHr, FSHr con agonista en protocolo corto y FSHr con protocolo largo, observaron que la FSHr fue capaz de inducir crecimiento multifolicular y esteroidogénesis ovárica adecuadamente. Aunque no hay una evidencia clara en la mejoría de la FSHr sobre la tasa de gestación, los resultados de la estimulación son equiparables a la FSH urinaria [121], [122] se ha afirmado que la FSHr es más eficiente que la ultrapura y, además, la FSHr se puede usar por vía subcutánea, lo cual siempre es una ventaja para la paciente [124].

Muy recientemente se ha producido la **LH recombinante (LHr)**. Balasch y cols [125] concluyeron que la adición de LHr a la FSHr no mejora la respuesta ovárica y puede tener un efecto negativo en la maduración ovocitaria y en la tasa de fertilización.

El período de tiempo valorado en el estudio ha impedido desarrollar la experiencia adecuada en el manejo de la LHr, por lo que su utilización no ha sido incluida en el presente trabajo.

Tras el desarrollo de las gonadotrofinas se fueron probando **distintas dosis** de las mismas según las características de las pacientes, pero Hofmann y cols [11] y Surrey y cols [128] refirieron que, en bajas respondedoras, dosis por encima de 450 UI/día no mejoran el reclutamiento folicular ni la tasa de gestación. Land y cols [84] aumentando la dosis de gonadotrofinas en pobres respondedoras observaron que, a pesar de mejorar los resultados de la estimulación, no se mejoró la tasa de gestación, aludiendo a una alteración en la calidad de los ovocitos de estas pacientes.

Con la introducción de los **análogos agonistas de la GnRH**, que son modificaciones en el decapeptido de la GnRH con efecto agonista de duración y potencia variable, se mejoraron los resultados de la estimulación ovárica. Cuando se administra el agonista se produce una estimulación a nivel hipofisario con liberación de FSH y LH; si el agonista sigue actuando, se produce una regulación a la baja ("down-regulation") resultando un estado de hipogonadismo hipogonadotropo [133].

La utilización de los agonistas supuso una serie de ventajas:

- se evitan los picos endógenos de LH durante la fase folicular y la luteinización del ovocito, mejorando la respuesta al estímulo [12, 135, 136]

– se aumenta el reclutamiento folicular y se produce una maduración folicular sincrónica con la administración de las gonadotrofinas [139, 140]

– se disminuye el porcentaje de cancelación y se aumenta el porcentaje de gestación por ciclo y por transferencia [96, 140, 141] [142] en comparación con el uso de gonadotrofinas únicamente

– se mejora la calidad de los ovocitos y, por lo tanto de los embriones, por la disminución en los niveles de LH en el folículo y la disminución de los andrógenos intraováricos [140][141].

Hughes y cols [140] en su metanálisis de 1992, observaron que el uso de agonistas evitó los picos endógenos de LH y, aunque fueron necesarias mayores dosis de gonadotrofinas, se consiguió reclutar mayor número de ovocitos. Obtuvieron mejor tasa de gestación por ciclo iniciado y por transferencia en los ciclos tratados con análogos que en ciclos sin análogos y no observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de gestación en el grupo de análogos en protocolo corto al comparar con el uso de protocolo largo.

Los agonistas pueden ser iniciados en el ciclo anterior al estímulo (en distintos momentos durante la fase lútea) consiguiendo una supresión hipofisaria para posteriormente comenzar la administración de gonadotrofinas (“protocolo largo”) o pueden administrarse en la fase folicular (en distintos momentos de la misma) del ciclo de tratamiento (“protocolo corto”) aprovechando el efecto estimulante de los mismos. Distintos grupos de trabajo han utilizado otras posologías, como se comentó en la introducción. En el presente estudio se ha utilizado el “protocolo largo” de manejo de agonista.

Múltiples autores coinciden en los beneficios del protocolo largo de agonista frente al protocolo corto: Daya y cols [114] refirieron mayor tasa de gestación en protocolos largos que en los protocolos cortos. Biljan y cols [165], en un estudio prospectivo randomizado incluyendo 91 pacientes, compararon los resultados del uso de agonistas según protocolo largo en la estimulación con el uso de agonistas según protocolo corto. Obtuvieron mejor reclutamiento folicular, mejor captación ovocitaria y mejor tasa de fertilización y de gestación con el protocolo largo que con el protocolo corto. Concluyeron que la mayor supresión hipofisaria obtenida con el protocolo largo

consiguió unos niveles más bajos de LH durante la fase folicular que repercutieron en la mejor respuesta a la estimulación gonadotropa.

Además de los distintos protocolos de utilización del agonista, se han desarrollado múltiples posibilidades de tratamiento coadyuvante para mejorar los resultados de la estimulación ovárica controlada en las pacientes diagnosticadas de baja respuesta.

Así, a la **hormona de crecimiento** se le ha atribuido un papel en la regulación del crecimiento folicular y ha sido investigado su uso en la mejora de la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas. Adashi y cols[185] señalaron que el insulin growth-factor (IGF-I) tiene una acción, en el desarrollo folicular [187], sinérgica con la FSH sobre la granulosa a través de la estimulación de la actividad aromatasas, inducción de receptores de LH, síntesis de prostaglandinas y acumulación de AMP cíclico. La producción de IGF-1 es dependiente de la hormona de crecimiento (GH)

Cuando se ha querido analizar el efecto de la GH en la estimulación ovárica de las pacientes diagnosticadas de bajas respondedoras los resultados también han sido poco concluyentes. La producción hipofisaria de GH está controlada por el GH-RH el cual puede tener también un efecto directo sobre el ovario. Para valorar la respuesta a la estimulación ovárica asociando el GH-RH Howless y cols[195] llevaron a cabo un estudio multicéntrico, randomizado, doble ciego incluyendo 196 pacientes diagnosticadas de baja respuesta. Las pacientes fueron tratadas con protocolo largo de agonista y FSH asociando GH-RH (500 µg/dos veces al día, sc). No encontraron mejoría en la respuesta ovárica a la FSH con la asociación de GH-RH (en términos de número de folículos desarrollados, número de ampollas de FSH necesarias y tasa de gestación)

La conclusión de los distintos estudios valorados fue que, si se administra GH durante la estimulación, se potenciará el efecto de la FSH, pero como recientes estudios fueron incapaces de demostrar este beneficio en todas las pacientes [14, 193, 194] y no se conoce la dosis mínima eficaz, se desaconseja el uso de la GH [23, 128] junto al excesivo precio del producto. Únicamente se mantiene la indicación referida por Owen y cols [191] que consiguieron mejorar la respuesta ovárica al asociar GH a las gonadotrofinas en pacientes diagnosticadas de ovario poliquístico.

Se ha de hacer referencia al uso de **anticonceptivos orales** en el ciclo previo a la estimulación. Dentro del protocolo de hiperestimulación ovárica controlada la supresión hipofisaria previa se ha considerado fundamental para establecer un crecimiento folicular sincrónico y mejorar los niveles séricos de E₂. Con ella se evitan los picos endógenos de LH. Gonen y cols [208] plantearon un estudio para valorar si la supresión hipofisaria conseguida con la administración de anticonceptivos orales mejoraba los resultados de la estimulación ovárica. Observaron que las pacientes estimuladas con gonadotrofinas tras la administración de anticonceptivos orales presentaban mayor número de ovocitos captados, tenían menos picos endógenos de LH y mejoraban la tasa de fecundación y la tasa de gestación. Con el uso de los agonistas en protocolo largo se ha observado el desarrollo de quistes foliculares cuando se debía de comenzar la administración de gonadotrofinas. Biljan y cols [199] realizaron un estudio utilizando anticonceptivos orales junto al protocolo largo de agonista y observaron que en estas pacientes no se desarrollaron quistes de ovario durante la estimulación y se disminuyó el tiempo requerido para obtener la supresión hipofisaria adecuada, con lo cual, al recibir menor dosis de agonista se apreció una respuesta ovárica más rápida. También se obtuvo una tasa de gestación mayor en las pacientes pretratadas con anticonceptivos orales, por todo esto concluye que el tratamiento con anticonceptivos orales previo al ciclo de estímulo es una alternativa a valorar en pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida.

Así la administración de anticonceptivos orales en el ciclo previo al de hiperestimulación ovárica controlada favorecería la abolición del crecimiento del cuerpo lúteo, eliminando los picos de LH, disminuyendo las necesidades de Gn y la formación de quistes [199, 208].

Durante nuestro estudio no se realizó ningún tratamiento coadyuvante en la estimulación ovárica. Las modificaciones introducidas para el manejo de las pacientes en las que se ha establecido el pronóstico de baja respuesta se centraron en dos puntos:

- aumentar la dosis de gonadotrofinas (manejo de FSH y/o hMG)
- modificar la pauta de supresión hipofisaria mediante variaciones en la dosis de agonista

Se decidió disminuir o suprimir la dosis de agonista, con el fin de evitar su efecto antigonadotropo y aumentar las dosis de gonadotrofinas, puesto que éstas son el único

fármaco que, indiscutiblemente y de forma controlada, en términos de relación dosis-respuesta, estimula el desarrollo folicular. Por otra parte, se decidió comparar el uso de FSHr sola con el uso de una asociación FSHr-hMG, con el fin de determinar si la asociación de actividad LH es o no beneficiosa.

El manejo del **protocolo largo de agonista** consistió en la administración del agonista el día 22° (la mitad de la fase lútea) del ciclo anterior a la estimulación ovárica, manteniéndolo, a la misma dosis establecida, durante la estimulación con gonadotrofinas, hasta la administración de la hCG. Las variaciones introducidas en el mismo han derivado de la bibliografía publicada al respecto, ya que muchos autores coinciden en que la mejor forma de administración del agonista es el protocolo largo [161, 165].

Dentro del protocolo largo, se presentan **dos variedades** que vienen precedidas por distintas publicaciones sobre sus ventajas e inconvenientes; se trata de los que se han denominado en el presente estudio como: "**protocolo largo Bajando**" y "**protocolo largo STOP**". Es preciso hacer las siguientes consideraciones respecto a la evolución que han experimentado las distintas dosis de agonista utilizadas durante la estimulación:

– se ha observado un efecto directo de los agonistas en el ovario modulando la esteroidogénesis y la maduración ovocitaria [134, 136, 143, 144]. La primera referencia a la existencia de receptores de GnRH en las células de la granulosa humana fue hecha por Latouche [146]. Parinaud y cols [144] sugirieron que los agonistas de la LH-RH (buserelina) modulaban la esteroidogénesis en la granulosa de los folículos preovulatorios mediante una acción estimulante a dosis bajas (sobre receptores de alta afinidad) y una acción inhibitoria a dosis altas (sobre receptores de baja afinidad) dependiendo del grado de maduración folicular. Yoshimura y cols [136], estudiando el efecto de los agonistas en el folículo y ovocito de conejo, observaron que los agonistas tenían efecto directo sobre el folículo y, por lo tanto, podían desencadenar la maduración meiótica prematura del ovocito, sobre todo cuando se utilizaban a dosis altas. Esto implicó la valoración adecuada del uso de agonistas en dosis altas, ya que podría resultar perjudicial en ciclos de estimulación ovárica controlada sobre la calidad de los ovocitos obtenidos.

Estas observaciones permitieron concluir que la respuesta ovárica a la

estimulación con gonadotrofinas puede mejorar si el efecto del agonista se reduce durante la estimulación [209], por lo que el efecto del agonista en la esteroidogénesis ovárica es especialmente importante en el contexto de un paciente con diagnóstico de baja respuesta. A pesar de la justificación fisiopatológica de la acción de bajas dosis de agonistas sobre los folículos comentada, algunos autores como Dirnfeld y cols [161] refirieron que el cese de análogos en el comienzo del estímulo no ofreció mejores resultados que el protocolo largo convencional

Así, en un intento de mejorar los resultados de la estimulación, en el presente estudio, se desarrollaron los protocolos de agonista como se refiere a continuación: el **protocolo largo “bajando”** en donde la dosis de agonista se disminuyó a la mitad el 3° día de la fase folicular del ciclo de estimulación o, lo que es lo mismo, el 1° día de la administración de gonadotrofinas [91] y **protocolo largo “STOP”** en donde la dosis de agonista se suprimió el día de comienzo de la administración de las gonadotrofinas [167, 170].

En todas las pacientes se ha utilizado el mismo agonista y a las mismas dosis iniciales: 0,1 mg/día de acetato de triptorelina.

Se establecieron 4 grupos de tratamiento sobre la base de la distinta supresión hipofisaria a la utilización de FSHr sola o asociada con hMG:

- protocolo “STOP-Combo”: supresión del agonista más FSHr y hMG
- protocolo “STOP-FSH”: supresión del agonista más FSHr
- protocolo “Bajando-Combo”: disminución de la dosis del agonista a la mitad más FSHr y hMG
- protocolo “Bajando-FSH” disminución de la dosis del agonista a la mitad más FSHr.

En resumen: se trabajó sobre 2 grupos de protocolo con supresión hipofisaria mediante la disminución del agonista a la mitad al comienzo de la administración de las gonadotrofinas y 2 grupos de protocolo con supresión hipofisaria mediante el cese de administración del agonista y, cada uno de ellos, se trató con dos modalidades de estimulación ovárica: dosis altas de FSHr (450 UI/día) y dosis de 300 UI/día de FSHr más 2 ampollas de hMG.

4. RESULTADOS DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Los resultados de la estimulación ovárica han sido valorados según parámetros determinados por ecografía y según parámetros analíticos (estradiol y progesterona) como luego se comentarán.

4.1. Variables ecográficas

Las variables ecográficas consideradas fueron: tamaño ovárico, número de folículos preovulatorios, diámetro del folículo mayor y grosor del endometrio. En ninguna de ellas se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos protocolos. Conviene destacar que el número medio de folículos preovulatorios, en las pacientes en que se consiguió un desarrollo folicular adecuado y no tuvieron que ser canceladas fue de 5,94 (rango 3-16). La distribución por grupos fue de 5,8 folículos en el grupo STOP-Combo, 6,5 folículos en el grupo STOP-FSH, 5,28 folículos en el grupo Bajando-Combo y 6,32 folículos en el grupo Bajando-FSH, observando que el menor número de folículos correspondió a los protocolos Combo. Así se puede concluir [114] que la FSH sola es suficiente para desarrollar un número adecuado de folículos.

4.2. Determinaciones analíticas

Los resultados de las determinaciones analíticas (estradiol y progesterona) a lo largo de la fase folicular revelaron que las únicas diferencias estadísticamente significativas se encontraron en los niveles séricos de progesterona el día previo a la punción, el día de la punción y el día 2° tras la punción, siendo más elevadas en el grupo con protocolo STOP-FSH comparado con el grupo Bajando-Combo. Beckers y cols obtuvieron resultados semejantes [168] al comparar un protocolo STOP con un protocolo largo convencional. Este hallazgo podría estar relacionado con picos endógenos de LH en el protocolo STOP.

En general, los niveles de progesterona fueron mayores en los grupos con supresión hipofisaria tipo STOP al compararlos con los grupos Bajando, quizás explicado por que la menor supresión hipofisaria favorecería los picos endógenos de LH.

4.3. Duración de la estimulación

Respecto a la duración de la estimulación no se observaron diferencias significativas entre grupos; tampoco se encontraron diferencias en los días de la fase folicular y en los días de la fase lútea en el ciclo de estimulación.

4.4. Dosis de gonadotrofinas

Para la variable **dosis total de FSHr** en los 4 grupos (en los grupos en que se utilizó hMG se sumó la dosis de FSHr más la dosis de FSH presente en la hMG) se concluyó que la dosis necesaria de FSH para conseguir un desarrollo folicular adecuado fue mayor, con diferencias estadísticamente significativas, en los grupos tratados con el protocolo Bajando de agonista. Esto puede ser debido al mayor estado de hipogonadismo encontrado en estas pacientes, también aducido por Dirnfeld [161] o al hecho de que en los grupos tratados con protocolo Bajando se mantenga una cierta acción antigonadotropa del GnRHa administrado.

Analizando la **dosis de "LH"** utilizada en los grupos Combo, se observó que fue administrada mayor dosis, con diferencias estadísticamente significativas, en el grupo Bajando-Combo que en el grupo STOP-Combo, igualmente explicable por el estado de hipogonadismo que condiciona el uso prolongado de agonistas durante la estimulación o simplemente, porque, siendo necesaria más FSH, la administración de ésta arrastró a la de "LH".

* En este momento del análisis de los resultados, se puede concluir que el protocolo Bajando desarrolla el mismo número de folículos que el protocolo STOP pero a expensas de aumentar la dosis de FSH, como observaron otros autores [134, 152, 155] y hMG [167], quizás por el papel supresor de los GnRHa en la esteroidogénesis ovárica [149] o por la excesiva supresión hipofisaria [150], sin aumentar la duración media de la estimulación (10 días) ni la duración media de la fase folicular (14 días). A este respecto, Parinaud y cols [144] sugirieron que los agonistas de la LH-RH (buserelina) modulan la esteroidogénesis en la granulosa de los folículos preovulatorios mediante una acción estimulante a dosis bajas (sobre receptores de alta afinidad) y una acción inhibitoria a dosis altas (sobre receptores de baja afinidad) dependiendo del grado de maduración folicular, por lo que, en los protocolos de tratamiento de las pacientes con baja respuesta, se ha de intentar ajustar la dosis de agonista para conseguir la supresión hipofisaria sin afectar al desarrollo folicular.

4.5. Número y clasificación de los ovocitos

Tras valorar el número de ovocitos obtenidos en la punción folicular y la calidad de los mismos, se observó:

- el **número de ovocitos** fue mayor y la calidad de los mismos (número de ovocitos en estadio metafase II) también en el grupo STOP-FSH comparado con el grupo Bajando-Combo, sin existir diferencias significativas entre los demás grupos. Es necesario hacer constar que el número de ovocitos y el número de los mismos en estadio metafase II fue mayor en los protocolos con FSH que en los protocolos con FSH y hMG, como han observado otros autores [125]. Algunos autores han referido que el uso de hMG durante la estimulación podría tener un efecto deletéreo sobre el número de ovocitos y la calidad de los mismos [114]. Daya y cols [114] realizaron un estudio randomizado incluyendo 172 pacientes que recibieron FSHp y 171 pacientes que recibieron hMG; todas ellas fueron estimuladas junto a agonistas en protocolo corto (iniciado el día 1º del ciclo). Concluyeron que, aunque la media de número de ovocitos fertilizados fue similar, la proporción de pacientes con fallo completo en la fertilización fue significativamente más alta en las pacientes tratadas con hMG, y se obtuvo mayor tasa de gestación en pacientes tratadas con FSHp. Lobb y cols [117] comparando FSHp con hMG observaron que la producción esteroideogénica, sobre todo de progesterona, por las células luteinizadas de la granulosa en pacientes tratadas con FSHp era el doble del valor de la obtenida en el grupo de hMG.

- la **calidad de los embriones** para transferir fue determinada sobre la base del número de células en el momento de la transferencia y el grado embrionario. Como embriones "buenos" o de "buena calidad" se consideraron aquellos con 4 o más células que fueron clasificados dentro del grado 1 ó 2. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Esto significó que, aunque se utilizó mayor dosis de gonadotrofinas en los protocolos Bajando que en los protocolos STOP y, aunque el número de ovocitos y estadios metafase II fue mayor en los protocolos con FSH sola, cuando se consiguió la fecundación, el desarrollo de los mismos fue similar en los distintos grupos de tratamiento.

Así, el protocolo STOP-FSH a pesar de presentar mayor número de folículos desarrollados y obtener mayor número de ovocitos en estadio metafase II, no supuso el desarrollo de mayor número de embriones de buena calidad que el resto de grupos, por

lo que están influyendo otras variables en el mismo, quizás sean los niveles más altos de progesterona que el resto de grupos y por ende niveles endógenos de LH mayores.

Balasz y cols [125] concluyeron que la adición de LHr a la FSHr no mejora la respuesta ovárica y puede tener un efecto negativo en la maduración ovocitaria y en la tasa de fertilización.

4.6. Tasa de fecundación

Al valorar la tasa de fecundación, tanto mediante FIV como mediante ICSI, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, siendo la tasa media de fecundación mediante FIV de 56% (rango 40-72) y la tasa media de fecundación mediante ICSI de 79% (rango 75-83). Siendo distribución homogénea en todos los grupos, debe concluirse que todos los tratamientos utilizados ofrecen similares resultados en cuanto a tasa de fecundación.

4.7. Tasa de cancelación

La tasa de cancelación antes de la punción, valorando la muestra del estudio en conjunto, fue de 19,6% (46 casos). El grupo STOP-Combo presentó una tasa de cancelación del 22,4% (11 casos), el grupo STOP-FSH 23,6% (13 casos), el grupo Bajando-Combo 13,2% (9 casos) y el grupo Bajando-FSH 20,6% (13 casos), no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. La tasa de cancelación en el mismo período (año 2001) en el computo global de ciclos tratados para FIV, incluidas las pacientes del presente estudio, en nuestro centro (n= 1353 ciclos), fue del 13,30%, siendo la tasa de cancelación por baja respuesta del 6,20%.

Conviene señalar, aunque no se trate de pacientes incluidas en el presente estudio, que la tasa de cancelación por baja respuesta antes de que se siguiera en el centro la conducta que aquí se ha expuesto con las pacientes susceptibles de desarrollar una baja respuesta era de 33,3%.

Las pacientes incluidas en este estudio fueron seleccionadas de un total de 1353 ciclos, de los que han sido cancelados por baja respuesta 84, es decir, un 6,20%. De las 84 cancelaciones por baja respuesta, 46 corresponden a la población aquí estudiada y las 38 restantes a los 1118 ciclos de los que no se sospechó la posibilidad de baja respuesta.

Esto quiere decir que para un 19,6% de las pacientes tratadas específicamente como posibles bajas respondedoras no se ha encontrado una solución con los

tratamientos aplicados. Esta tasa de cancelación es sensiblemente inferior a la previa de nuestro propio grupo. No obstante, una buena parte de las pacientes correctamente catalogadas como bajas respondedoras siguen necesitando una solución que dependerá o no del protocolo de estimulación utilizado y que, quizá, deberá derivarse a tratamientos como la donación de ovocitos.

Por otra parte, un 3,4% de las pacientes no sospechosas de ser bajas respondedoras se comportaron como tales, lo que significa que, aunque los criterios utilizados para el pronóstico pueden calificarse de adecuados, otros deberán ser investigados para detectar a esta pequeña proporción de pacientes.

Estas diferencias marcan un claro beneficio derivado de la utilización de protocolos de estímulo específicos para la posible baja respuesta.

En otro orden de cosas, es necesario señalar que, de los 235 ciclos realizados a pacientes tratadas con altas dosis de gonadotrofinas al ser consideradas bajas respondedoras, sólo una tuvo que ser cancelada por riesgo de hiperestimulación, pudiendo ser considerada como un falso positivo lo que evidencia que el pronóstico establecido, sobre la base de los criterios diagnósticos referidos, fue correcto.

No se apreciaron diferencias entre la tasa de cancelación en los grupos de protocolo Bajando frente a los de protocolo STOP, ni tampoco entre los grupos tratados con FSH frente a los tratados con FSH más hMG. García-Velasco y cols [167] tampoco refirieron diferencias en la tasa de cancelación entre el grupo protocolo STOP y el protocolo largo convencional, concluyendo que la tasa de cancelación en el protocolo STOP no se debió a picos endógenos de LH ya que se ha visto que la supresión del agonista realizada en la fase folicular es efectiva de 16 a 22 días después de su cese [168]. Schachter y cols [147] en una variante del protocolo largo STOP, suprimieron el agonista cuando llevaban 5 días de administración de hMG y no apreciaron una mayor tasa de cancelación por los picos endógenos de LH ya que prácticamente, la ausencia de agonista hasta la punción no fue mayor de 7 días, y si apreciaron un mayor número de embriones transferidos con una mejor morfología de los mismos.

4.7.1. Tasa de cancelación por ausencia de transferencia

La tasa de cancelación por ausencia de transferencia, en donde se incluyen como causas principales ausencia de ovocitos en la punción (3 casos), fallo de fecundación (7

casos) y detención del desarrollo embrionario (1 caso), no reveló diferencias entre los distintos grupos de tratamiento.

Destacar que 6 casos cancelados por fallo de fecundación se concentraron en el grupo Bajando-Combo, pero el escaso número de la muestra no permitió establecer conclusiones.

4.8. Tasa de implantación

La tasa de implantación en las pacientes en que se realizó transferencia, para el conjunto de la muestra valorada, fue 14,68%.

La tasa de implantación media de las pacientes que quedaron gestantes fue de 48,14%.

Mediante un modelo de regresión lineal se analizó la tasa de implantación. La variable dependiente fue el número de sacos observados en la ecografía vaginal y se incluyeron las mismas variables de confusión que en el modelo de regresión logística realizado para la variable gestación.

Al analizar la tasa de implantación, según el modelo planteado, en ciclos cuyo resultado fue la gestación no se obtuvo significación estadística en ninguna de las variables del modelo.

Estos resultados obtenidos de ausencia de relación entre el número de embriones transferidos y los sacos implantados, en las pacientes cuyo resultado fue la gestación, son coherentes con la ausencia de relación entre el número de embriones transferidos y la probabilidad de gestación observada en la regresión logística para la tasa de gestación.

Al estudiar la tasa de implantación en todos los ciclos en los que se realizó transferencia se observó que las variables protocolo Bajando-FSH y número de embriones transferidos influyeron significativamente en la tasa de implantación y, todo ello, ajustado por el resto de variables incluidas en el modelo. Así, se puede concluir que, valorando la muestra en conjunto, un mayor número de embriones transferidos supuso un mayor número de sacos implantados y, por lo tanto, aumentó la tasa de implantación y, que el protocolo Bajando-FSH presenta una mayor tasa de implantación que el resto de protocolos valorados.

4.9. Tasa de gestación

Valorando todas las pacientes de la muestra, la tasa de gestación por ciclo iniciado fue del 23% (54 casos), la tasa de gestación por punción fue de 28,6% y la tasa de gestación por transferencia fue de 30,3%. Las tasas de gestación por ciclo iniciado, de los distintos grupos, se distribuyeron de la siguiente forma:

- 18,4% (9 casos) en el grupo STOP-Combo
- 20% (11 casos) en el grupo STOP-FSH
- 20,6% (14 casos) en el grupo Bajando-Combo
- 31,7% (20 casos) en el grupo Bajando-FSH

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de tratamiento. La tasa de gestación de las pacientes tratadas mediante técnicas de reproducción asistida (FIV, ICSI) en nuestro centro, en los años 1999, 2000 y 2001 fue de 23,45%, 30,90% y 31,92% respectivamente.

Al apreciarse una mayor tasa de gestación en el protocolo Bajando-FSH, aunque sin significación estadística, se hizo un análisis de este protocolo comparándolo con la unión de los 3 restantes. Así, se comparó la tasa de gestación del protocolo Bajando-FSH (31,7%) con la tasa de gestación de los otros 3 (19,8%) obteniendo un resultado cercano a la significación ($p=0,053$) a favor del grupo Bajando-FSH.

Muchos autores han reflejado la mejora en la tasa de gestación del tratamiento mediante protocolo largo de supresión hipofisaria bajando a la mitad de la dosis al inicio de la estimulación. Feldberg y cols [91] obtuvieron mejor respuesta, en tasa de gestación, utilizando protocolo de minidosis con disminución a la mitad del agonista (equivalente a nuestro protocolo Bajando) al compararlo con las pacientes estimuladas según el protocolo largo habitual y con el protocolo depot. Con ello consiguieron evitar los picos endógenos de LH y la excesiva supresión hipofisaria de las dosis altas de agonistas. Olivennes y cols [149] obtuvieron mejor respuesta en la estimulación ovárica en el protocolo largo "bajando" respecto al protocolo de supresión con agonista depot (acetato de triptorelina).

Sin embargo, García-Velasco y cols [167] comparando el protocolo largo convencional con el protocolo STOP, observaron que con este último se redujo el número de ampollas de gonadotrofinas requeridas y se obtuvo mayor número de

ovocitos maduros (coincidiendo con los resultados aquí observados), pero no observaron diferencias en las tasas de cancelación, gestación e implantación.

Pinkas y cols [170] concluyeron que el protocolo de agonista suprimiéndolo previamente a la administración de gonadotrofinas, comparándolo con el protocolo largo convencional, constituía una buena alternativa de tratamiento en pacientes con baja respuesta, ya que consiguió beneficios en la estimulación, aumentó la tasa de gestación y no produjo un aumento en la tasa de cancelación por picos prematuros endógenos de LH.

Con los resultados en tasa de gestación obtenidos a favor del grupo Bajando-FSH se planteó un modelo de regresión logística sobre la probabilidad de gestación para este grupo, en el que, teniendo en cuenta únicamente la pertenencia al grupo referido, se obtuvo una Odds ratio de 1.88, lo que significa que la pertenencia al grupo Bajando-FSH aumentó 1.88 veces la probabilidad de gestación.

Posteriormente, se incluyó una serie de variables de confusión (edad de la mujer, FSH el día 3°, antecedente de baja respuesta previa, número de folículos desarrollados, estradiol el día de hCG, grosor de endometrio, número de ovocitos obtenidos, número de metafase II, número de embriones de buena calidad) de acuerdo con la importancia que a las mismas concede la bibliografía consultada. Se apreció un efecto estadísticamente significativo sobre la probabilidad de gestación en las variables: edad de la mujer, que presentó una OR 0,89 (a mayor edad menos probabilidad de gestación), FSH el día 3° del ciclo que reflejó una OR 0,89 (a mayor nivel de FSH menos probabilidad de gestación).

Estos resultados concuerdan con lo observado por Seeman y cols [210]: en 758 ciclos de estimulación ovárica la tasa de gestación disminuía de forma inversamente proporcional al aumento de la FSH basal el día 3° del ciclo.

La calidad embrionaria presentó una OR 1,54 (a mayor número de embriones de buena calidad mayor probabilidad de gestación).

Al incluir estas variables, se potenció la OR de la variable pertenencia al grupo Bajando-FSH que pasó a ser OR 2,38, lo cual tradujo que pertenecer al grupo de tratamiento referido, presentar una FSH más baja y disponer de embriones de buena calidad presentó una probabilidad de gestación 2,38 veces superior que pertenecer a los otros grupos de tratamiento.

Posteriormente, en el modelo planteado se incluyó la variable número de embriones transferidos (que en sí mismo no fue significativa) dentro de las variables de confusión y se observó un cambio en las significaciones de las otras variables; así: la variable FSH el día 3° del ciclo dejó de presentar significación al igual que la variable número de embriones buenos transferidos, que reflejada la calidad de los embriones. Sólo permanecieron con significación en el modelo creado las variables edad de la mujer y la pertenencia al grupo de tratamiento Bajando-FSH, concretamente la variable grupo de tratamiento pasó a ser más significativa y su OR aumentó a 2,52. O sea la probabilidad de quedar gestante quedó distribuida, sobre todo, con significación estadística, entre la asignación al grupo de tratamiento y la edad de la mujer, siendo la distribución de probabilidades para las otras variables incluidas no significativas.

Así, tras analizar la tasa de gestación se observó que la probabilidad de gestación aumentó con la pertenencia al grupo Bajando-FSH, y disminuyó con el aumento de la edad, de forma significativa.

Ya Creus y cols [204] habían referido que la única variable relacionada con la tasa de gestación era la edad. También distintos autores han reflejado que el potencial reproductivo de una mujer, definido como la capacidad para concebir en ausencia de alteraciones en su sistema reproductor [67], disminuye con la edad y, por lo tanto, el aumento de ésta favorece el aumento de la infertilidad [5, 10, 211]. Daya y cols [114] también obtuvieron una mayor tasa de gestación en pacientes tratadas con FSHp, comparándolas a aquellas que trataron con hMG, a pesar que utilizaron el protocolo corto de agonista y, por lo tanto, la consecución de la supresión hipofisaria fue distinta a la utilizada en nuestro estudio.

Los datos referidos no variaron en cuanto a significación al realizar la regresión logística para la variable gestación, sobre los ciclos estimulados tras eliminar los ciclos que fueron cancelados antes de la punción y, tampoco variaron, en un modelo posterior, al eliminar también los ciclos en los que no se realizó transferencia.

CONCLUSIONES

1. Establecer un pronóstico de baja respuesta en función de la edad de la mujer, el nivel circulante de FSH en el día 3 del ciclo y el antecedente de baja respuesta resulta aceptablemente válido desde el punto de vista clínico

2. Incrementar la dosis de FSH y reducir la dosis de GnRH α proporciona los mejores resultados en FIV, en términos de tasa de gestación y tasa de implantación

3. Asociar hMG no aporta beneficio alguno al resultado final de los tratamientos mediante FIV cuando se realiza la supresión hipofisaria con análogos agonistas de GnRH.

4. La edad de la mujer y el nivel basal de FSH siguen siendo los datos más adecuados para establecer un pronóstico sobre la probabilidad de embarazo en fecundación in vitro.

BIBLIOGRAFIA

1. Cameron, I., et al., *Occult ovarian failure: a syndrome of infertility, regular menses and elevated follicle stimulating hormone concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. 67: p. 1190 - 1194.
2. Botella, J., et al., *Esterilidad e infertilidad conyugal*, in *Esterilidad e infertilidad humanas*, J. Botella, et al., Editors. 1967, Editorial Científico-Médica: Barcelona. p. 1 - 12.
3. Tietze, C., *Statistical contributions to the study of human fertility*. Fertil Steril, 1958. 7: p. 88 -.
4. Balin, H., *Esterilidad. Consideraciones generales*, in *Trastornos menstruales y esterilidad*, L. Israel, Editor. 1969, Editorial Bernades: Buenos Aires. p. 445 - 452.
5. Mosher, W. and W. Pratt, *Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends*. Fertil Steril, 1991. 56: p. 192 - 193.
6. CECOS, F., D. Schwartz, and B. Mayaux, *Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands*. N Engl J Med, 1982. 306: p. 404 - 406.
7. Virro, M. and A. Shewuck, *Pregnancy outcome in 242 conceptions after artificial insemination with donor sperm and effects of maternal age on the prognosis for successful pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1984. 148: p. 518 - 524.
8. Tietze, C., *Reproductive span and rate of reproduction among Hutterite women*. Fertil Steril, 1957. 8: p. 89 - 97.
9. Weinstein, M. and J. Wood. *Age patterns of fecundability: at age 35 biology is 49 percent of destiny*. IUSSP-UIESP. in *Seminar on biomedical and demographic determinants of human reproduction*. 1988. Baltimore.
10. Greenhall, E. and M. Vessey, *The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies*. Fertil Steril, 1990. 54: p. 978 - 983.
11. Hofmann, G., et al., *High-dose follicle-stimulating hormone (FSH) ovarian stimulation in low-responder patients for in vitro fertilization*. J In Vitro Fert Embryo Transfer, 1989. 6: p. 285 - 289.
12. Ben-Rafael, Z., et al., *Limitations in the use of combined gonadotropin-releasing hormone analog and human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization*, in *Advances in assisted reproductive technologies*, S. Mashiach, et al., Editors. 1990, Plenum Press: New York. p. 17 - 29.
13. Dor, J., et al., *The prognostic importance of the number of oocytes retrieved and estradiol levels in poor and normal responders in in vitro fertilization (IVF) treatment*. J Assisted Reprod Genet, 1992. 9: p. 228 - 232.
14. Dor, J., et al., *Adjuvant Growth hormone therapy in poor responders to in vitro fertilization: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study*. Human Reprod, 1995. 10: p. 40 - 43.
15. Mettler, L., et al., *Non-responsive patients: characteristics of patients*, in *Fertility and Sterility. A current overview*, B. Hedon, J. Bringer, and P. Mares, Editors. 1995, The Parthenon Publishing Group: New York. p. 361 - 367.
16. Scott, R.J., *Evaluation and treatment of low responders*. Semin Reprod Endocrinol, 1996. 14: p. 317 - 337.

17. Faber, B., et al., *Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders*. Fertil Steril, 1998. **69**: p. 826 - 830.
18. Barri, P., et al., *Managing nonresponders*, in *Fertility and reproductive medicine*, R. Kempers, et al., Editors. 1998, Elsevier Science BV: Amsterdam. p. 127 - 137.
19. Dirnfeld, M., et al., *Cessation of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-a) upon down-regulation versus conventional long GnRH-a protocol in poor responders undergoing in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1999. **72**: p. 406 - 411.
20. Romeu, M., *El fallo ovárico oculto y su importancia en reproducción asistida*, in *Pediatría, Obstetricia y Ginecología*. 2000, Valencia: Valencia. p. 134.
21. Scott, R., et al., *A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population*. Obstet Gynecol, 1993. **82**: p. 539 - 544.
22. Rosenwaks, Z. and S. Muasher, *Recruitment of fertilizable eggs*, in *In vitro fertilization: Norfolk*, H.J. Jones, et al., Editors. 1986, Williams and Wilkins: Baltimore. p. 30 - 52.
23. Ben-Rafael, Z., R. Orvieto, and D. Feldberg, *The poor responder patient in an in vitro fertilization-embryo transfer program*. Gynecol Endocrinol, 1994. **8**: p. 277 - 286.
24. Van Hoof, M., et al., *Doubling the human menopausal gonadotropin dose in the course of an IVF treatment cycle in low-responders: a randomized study*. Hum Reprod, 1993. **8**.
25. Baird, D., *The ovarian cycle*, in *Ovarian Endocrinology*, S. Hillier, Editor. 1991, Blackwell Sci Pub: London. p. 1 - 24.
26. Baker, T. and J. Scrimgeour, *Development of the gonads in anencephalic human fetuses*, in *Functional morphology of the human ovary*, J. Coutts, Editor. 1981, MTP Press: Lancaster. p. 13 - 25.
27. Oktay, K., D. Briggs, and R. Gosden, *Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**: p. 3748 - 3751.
28. Li, R., et al., *Follicle-stimulating hormone induces terminal differentiation in a predifferentiated rat granulosa cell line (ROG)*. Endocrinology, 1997. **138**: p. 2648 - 2657.
29. Erickson, G., S. Kokka, and C. Rivier, *Activin causes premature superovulation*. Endocrinology, 1995. **136**: p. 4804 - 4813.
30. Hillier, S., *Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries*. J Endocrinol, 1991. **131**: p. 171 - 175.
31. Liu, X., et al., *Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice*. Endocrinology, 1998. **139**: p. 2342 - 2347.
32. Smitz, J., et al., *Effects of recombinant activin-A on in vitro culture of mouse preantral follicles*. Mol Reprod Dev, 1998. **50**: p. 294 - 304.
33. McGee, E., et al., *Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles*. Fertil Steril, 1999. **71**: p. 732 - 738.
34. Dong, J., et al., *Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis*. Nature, 1996. **383**: p. 531 - 535.

35. Carabatsos, M., et al., *Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice*. Dev Biol, 1998. **204**: p. 373 - 384.
36. Laitinen, M., et al., *A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis*. Mech Dev, 1998. **78**: p. 135 - 140.
37. Hayashi, M., et al., *Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles*. Endocrinology, 1999. **140**: p. 1236 - 1244.
38. Bodensteiner, K., et al., *Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries*. Biol Reprod, 1999. **60**: p. 381 - 386.
39. Ratts, V., et al., *Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad*. Endocrinology, 1998. **136**: p. 3665 - 3668.
40. Perez, G., et al., *Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency*. Nat Genet, 1999. **21**: p. 200 - 203.
41. Zeleznik, A., L. Ihrig, and S. Bassett, *Developmental expression of Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells*. Endocrinology, 1989. **125**: p. 2218 - 2220.
42. Lacks, S., *Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin*. J Biol Chem, 1981. **256**: p. 2644 - 2648.
43. Jacobson, M., J. Burne, and M. Raff, *Programmed cell death and bcl-2 protection in the absence of a nucleus*. EMBO J, 1994. **13**: p. 1899 - 1910.
44. Chun, S.-Y., et al., *Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I*. Endocrinology, 1994. **135**: p. 1845 - 1853.
45. Chun, S.-S., et al., *Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor*. Endocrinology, 1996. **137**: p. 1447 - 1456.
46. Hillier, S., et al., *Cellular aspects of pre-ovulatory folliculogenesis in primate ovaries*. Hum Reprod, 1988. **3**: p. 507 - 511.
47. Hillier, S., *Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary*. Oxf Rev Reprod Biol, 1985. **7**: p. 168 - 222.
48. Sherman, B. and S. Korenman, *Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life*. J Clin Invest, 1975. **55**: p. 699 - 706.
49. Sherman, B., J. West, and S. Korenman, *The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women*. J Clin Endocrinol Metab, 1976. **42**: p. 629 - 636.
50. Klein, N., et al., *Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic FSH rise in normal older women*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**: p. 1038 - 1045.
51. Klein, N., et al., *Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**: p. 2742 - 2745.
52. Chritin-Maitre, S. and P. Bouchard, *Physiopathologie des anomalies de la réceptivité ovarienne*. Contr Fertil Sex, 1996. **24**: p. 105 - 110.

53. Burger, H., et al., *Early follicular phase serum FSH as a function of age. The roles of Inhibin A, Inhibin B and estradiol*. *Climacteric*, 2000. **3**: p. 17 – 24.
54. Peters, H., et al., *Follicular growth: the basic event of the mouse and human ovary*. *J Reprod Fertil*, 1975. **45**: p. 559 - 566.
55. Tanbo, T., et al., *Ovarian stimulation in previous failures from in vitro fertilization: distinction of two groups of poor responders*. *Hum Reprod*, 1990. **5**: p. 811 – 815.
56. Penzia, A., et al., *Successful use of gamete intrafallopian transfer does not reverse the decline in fertility in women over 40 years of age*. *Obstet Gynecol*, 1991. **77**: p. 37 – 39.
57. Navot, D., et al., *Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age related decline in female fertility*. *Lancet*, 1991. **337**: p. 1375 – 1377.
58. Navot, D., et al., *Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation*. *Fertil Steril*, 1994. **61**: p. 97 – 101.
59. Hull, M., et al., *The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after IVF*. *Fertil Steril*, 1996. **65**: p. 783 – 790.
60. Templeton, A., J. Morris, and W. Parslow, *Factors that affect outcome of IVF treatment*. *Lancet*, 1996. **348**: p. 1402 – 1406.
61. Spandorfer, S., et al., *An analysis of the effect of age on implantation rates*. *J Assist Reprod Genet*, 2000. **17**: p. 303 – 306.
62. Levi, A., et al., *Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve*. *Fertil Steril*, 2001. **76**: p. 666 – 669.
63. Feldberg, D., et al., *The impact of embryo quality on pregnancy outcome in elderly women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer (IVF_ET)*. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1990. **7**: p. 257 – 261.
64. Keefe, D., et al., *Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women*. *Fertil Steril*, 1995. **66**: p. 577 – 583.
65. Tim, A. and M. Tsakok, *Age-related decline in infertility: a link to degenerative oocytes*. *Fertil Steril*, 1997. **68**: p. 265 – 271.
66. Volaricik, K., et al., *The meiotic competence of in vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary*. *Hum Reprod*, 1998. **13**: p. 150 – 160.
67. Scott, R.J. and G. Hofmann, *Prognostic assessment of ovarian reserve*. *Fertil Steril*, 1995. **63**: p. 1 - 11.
68. Lee, S., et al., *The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles*. *Hum Reprod*, 1988. **7**: p. 851 – 855.
69. Licciardi, F., H. Liu, and Z. Rosenwaks, *Day 3 estradiol serum concentrations as pronosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1995. **64**: p. 991 – 994.
70. Smotrich, D., et al., *Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome*. *Fertil Steril*, 1995. **64**: p. 1136 – 1140.
71. Lashen, H., et al., *Poor responders to ovulation induction: is proceeding to in-vitro fertilization worthwhile?* *Hum Reprod*, 1999. **14**: p. 964 – 969.
72. Evers, J., et al., *Elevated levels of basal estradiol 17 β predict poor response in patients normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1998. **69**: p. 1010 - 1014.

73. Hughes, J., et al., *Interest of growth hormone-releasing hormone administration for improvement of ovarian responsiveness to gonadotropins in poor responder women*. Fertil Steril, 1991. **55**: p. 945 – 951.
74. Scott, R.J., et al., *Follicle stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril, 1989. **51**: p. 651 – 654.
75. DeMura, R., et al., *Human plasma free activin and inhibin levels during the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**: p. 1080 – 1082.
76. Khouri, R., et al., *Serum follistatin levels in women: evidence against an endocrine function of ovarian follistatin*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**: p. 1361 – 1368.
77. Seifer, D., et al., *Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome*. Fertil Steril, 1997. **67**: p. 110 – 114.
78. Hall, J., C. Welt, and D. Cramer, *Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome*. Hum Reprod, 1999. **14**: p. 409 - 405.
79. Hofmann, G., D. Danforth, and D. Seifer, *Inhibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening*. Fertil Steril, 1998. **69**: p. 474 – 477.
80. Balasch, J., et al., *Inhibin, follicle-stimulating hormones and age as predictors of ovarian response in in vitro fertilization cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist gonadotropin treatment*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **127**: p. 1226 – 1230.
81. Peñarrubia, J., et al., *Day 5 inhibin B serum concentrations as predictors of assisted reproductive technology outcome in cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment*. Hum Reprod, 2000. **15**: p. 1499 – 1504.
82. Creus, M., et al., *Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome*. Hum Reprod, 2000. **15**: p. 2341 – 2346.
83. Lenton, E., et al., *Inhibin concentrations throughout the menstrual cycle of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**: p. 1180 – 1190.
84. Land, J., et al., *High dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril, 1996. **65**: p. 961 – 965.
85. Muasher, S., et al., *The value of basal and/or stimulated gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril, 1988. **50**: p. 298 – 307.
86. Toner, J., et al., *Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age*. Fertil Steril, 1991. **55**: p. 784 - 791.
87. Martinez, F., et al., *Valor predictivo de los niveles de FSH en día 3 del ciclo para la respuesta a estimulación ovárica en ciclos de FIV*. Prog Obstet Ginecol, 1992. **35**: p. 502 - 506.
88. Gürkan, T., et al., *Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 to predict ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization using a flare-up protocol*. Fertil Steril, 1997. **68**: p. 483 – 487.
89. Brown, J., et al., *Variability of day 3 FSH levels in eumenorrheic women*. J Reprod Med, 1995. **40**: p. 620 - 624.

90. Olivennes, F., et al., "Poor responders": screening and treatment possibilities. *J Assist Reprod Genet*, 1993. 10: p. 115 – 117.
91. Feldberg, D., et al., Minidose gonadotropin releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril*, 1994. 62: p. 343 – 346.
92. Padilla, S, R. Smith, and J. García, *The lupron screening test: tailoring the use of leuprolide acetate in ovarian stimulation for in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1991. 56: p. 79 – 83.
93. Scott, R.J., et al., *Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in invitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1990. 54: p. 297 – 302.
94. Khalifa, E., et al., *Significance of basal follicle-stimulating hormone levels in women with one ovary in a program of in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1992. 57: p. 835 – 839.
95. Mukherjee, T., et al., *An elevated day three follicle-stimulating hormone:luteinizing hormone ratio (FSH:LH) in the presence of a normal day 3 FSH predicts a poor response to controlled ovarian hyperstimulation*. *Fertil Steril*, 1996. 65: p. 588 – 593.
96. Droesch, K., et al., *Value of suppression with a gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1998. 51: p. 292 – 297.
97. Navot, D., Z. Rosenwaks, and E. Margalioth, *Prognostic assessment of female fecundity*. *Lancet*, 1987. 2/8560: p. 645 - 647.
98. Loumaye, E., et al., *Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test*. *Fertil Steril*, 1990. 53: p. 295 – 301.
99. Anserini, P., et al., *Comparison of a blocking vs a flare-up protocol in poor responders with a normal and abnormal clomiphene citrate challenge test*. *Gynecol Endocrinol*, 1997. 11: p. 321 – 326.
100. Scott, R.J., *Evaluation and treatment of the low responder patient*, in *Text book of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives*, D. Gardner, et al., Editors. 2001, Marin Dunitz Ltd: London. p. 527 – 542.
101. Fanchin, R., et al., *Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting "poor responders" in in vitro fertilization*. *Hum Reprod*, 1994. 9: p. 1607 - 1611.
102. Padilla, S., J. Bayati, and J. García, *Prognostic value of the early serum estradiol response to leuprolide acetate in in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1990. 53: p. 288 – 294.
103. Winslow, K., et al., *The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test – a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle*. *Fertil Steril*, 1991. 56: p. 711 – 717.
104. Richardson, S., V. Senikas, and J. Nelson, *Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987. 65: p. 1231 – 1237.
105. Pache, T., et al., *Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle*. *Fertil Steril*, 1990. 54: p. 638 – 642.
106. Lass, A., et al., *Mesearument of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilization can predict poor response*. *Hum Reprod*, 1997. 12: p. 294 - 297.

107. Pellicer, A., et al., *Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal basal levels of follicle-stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography*. *Fertil Steril*, 1998. **70**: p. 671 - 675.
108. Chang, M., et al., *The antral follicle count predicts the outcome of pregnancy in a COH/UII programme*. *J Assist Reprod Genet*, 1998. **15**: p. 12 - 17.
109. Onagbesan, O., et al., *Differential effects of amount of feeding on cell proliferation and progesterone production in response to gonadotrophins and insulin-like growth factor I by ovarian granulosa cells of broiler breeder chickens selected for fatness or leanness*. *J Reprod Fertil*, 1999. **116**: p. 73 - 85.
110. Baird, D., *A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation*. *J Steroid Biochem*, 1987. **27**: p. 15 - 23.
111. Hillier, S., *Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis*. *Hum Reprod*, 1994. **9**: p. 188 - 191.
112. Ben-Rafael, Z., T. Levy, and J. Schoemaker, *Pharmacokinetics of follicle-stimulating hormone: clinical significance*. *Fertil Steril*, 1998. **69 (suppl 2)**: p. 40S - 49S.
113. Shipper, I., W. Hop, and B. Fauser, *The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**: p. 1292 - 1298.
114. Daya, S., et al., *Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization cycles: a meta-analysis*. *Fertil Steril*, 1995. **64**: p. 347 - 354.
115. Chappel, S. and C. Howles, *Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process*. *Hum Reprod*, 1991. **6**: p. 1206 - 1212.
116. Muasher, S., J. Garcia, and Z. Rosenwaks, *The combination of follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropin for the induction of multiple follicular maturation for in vitro fertilization*. *Fertil Steril*, 1985. **44**: p. 62 - 69.
117. Lobb, K., et al., *Steroidogenesis in luteinized granulosa cell cultures varies with follicular priming regimen*. *Hum Reprod*, 1997.
118. Söderstroöm-Antilla, V., *Clinical outcome of ovulation induction: highly purified FSH versus hMG*, in *Ovulation induction update '98*, M. Filicori and C. Flamigni, Editors. 1998: Bologna. p. 193 - 200.
119. Westergaard, L., et al., *The effect of human menopausal gonadotropin and highly purified, urine-derived follicle stimulating hormone on the outcome of in vitro fertilization in down-regulated normo-gonadotropic women*. *Hum Reprod*, 1996. **11**: p. 1209 - 1213.
120. Fleming, R., et al., *Purified urinary follicle stimulating hormone induces different hormone profiles compared with menotrophins, dependent upon the route of administration and endogenous luteinizing hormone activity*. *Hum Reprod*, 1996. **11**: p. 1854 - 1858.
121. Devroey, P., et al., *Clinical outcome of a pilot efficacy study on recombinant human follicle-stimulating hormone (Orgb 32489) combined with various gonadotrophin-releasing hormone agonist regimens*. *Hum Reprod*, 1994. **9**: p. 1064 - 1069.
122. Out, H., et al., *A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre study comparing recombinant and urinary follicle-stimulating hormone (Puregon®)*

- versus Metrodin®) in in vitro fertilization. Hum Reprod, 1995. 10: p. 2534 – 2540.*
123. Berg, C., et al., *Recombinant human FSH (Gonal F®) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP®): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. Hum Reprod, 1997. 12: p. 52.*
 124. Vandervost, M. and P. Devroey, *Recombinant FSH: results in assisted reproduction, in Ovulation induction update '98, M. Filicori and C. Flamigni, Editors. 1998, The Partenon Publishing Group: Bologna. p. 137 – 146.*
 125. Balasch, J., et al., *The effect of exogenous luteinizing hormone (LH) on oocyte viability: evidence from a comparative study using recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH) alone or in combination with recombinant LH for ovarian stimulation in pituitary-suppressed women undergoing assisted reproduction. J Assist Reprod Genet, 2001. 18: p. 250 – 256.*
 126. Crosignani, P., et al., *IVF: induction of ovulation in poor responders. J Steroid Biochem, 1989. 32: p. 171 - 173.*
 127. Karande, V., et al., *High-dose follicle-stimulating hormone stimulation at the onset of the menstrual cycle does not improve the in vitro fertilization outcome in low responder patients. Fertil Steril, 1990. 53: p. 486 – 489.*
 128. Surrey, E. and B. Schoolcraft, *Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. Fertil Steril, 2000. 73: p. 667-676.*
 129. Edwards, R., P. Steptoe, and J. Purdy, *Stablishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynaecol, 1980. 87: p. 757 – 768.*
 130. Marrs, R., et al., *The effect of the time of initiation of clomiphene citrate on multiple follicular development for human in vitro fertilization and embryo replacement procedures. Fertil Steril, 1984. 41: p. 682 –*
 131. Ferrier, A., et al., *Evaluation of leuprolide acetate and gonadotropins versus clomiphene citrate and gonadotropins for in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. Fertil Steril, 1990. 54: p. 90 – 95.*
 132. Prak, F., et al. *Clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin in routine in vitro fertilization: still a cost-effective treatment in 1992. in 8th Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology. 1992. The Hague, The Netherlands.*
 133. McKenna, K., et al., *Combined treatment with gonadotrophin releasing hormone agonist and gonadotrophins in poor responders to hyperstimulation for in vitro fertilization (IVF): clinical and endocrine results. Aust New Zealand J Obstet Gynaecol, 1989. 29: p. 428 - 432.*
 134. Horvat, P., et al., *Exogenous gonadotropin requirements are increased in leuprolide suppressed women undergoing ovarian stimulation. Fertil Steril, 1988. 49: p. 159 – 162.*
 135. Porter, R., et al., *Induction of ovulation for in vitro fertilization using buserelin and gonadotropins. Lancet, 1984. 2: p. 1284 –*
 136. Yoshimura, Y., et al., *Direct effect of gonadotropin-releasing hormone agonists on the rabbit ovarian follicle. Fertil Steril, 1992. 57: p. 1091 – 1097.*
 137. Polan, M., D. Sev, and B. Tarlatzis, *Human chorionic gonadotropin stimulation of estradiol production and androgen antagonism of gonadotropin stimulated responses in cultured human granulosa-luteal cells. J Clin Endocrinol Metab, 1986. 62: p. 628 –*

138. Fleming, R., W. Black, and J. Coutts, *Effects of LH suppression in polycystic ovary syndrome*. Clin Endocrinol, 1985. **23**: p. 683 –.
139. Sathanandan, M., et al., *Adjuvant leuprolide in normal, abnormal and poor responders to controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization/gamete intrafallopian transfer*. Fertil Steril, 1989. **51**: p. 998 – 1006.
140. Hughes, E., et al., *The routine use of gonadotropin releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Fertil Steril, 1992. **58**: p. 888 –896.
141. Meldrum, D., et al., *Routine pituitary suppression with leuprolide before ovarian stimulation for oocyte retrieval*. Fertil Steril, 1989. **51**: p. 455 – 459.
142. Liu, H., et al., *Improved pregnancy outcome with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) stimulation is due to the improvement in oocyte quantity rather than quality*. J Assist Reprod Genet, 1992. **9**: p. 338 – 342.
143. Barnes, R., A. Scomegna, and J. Schreiber, *Decreased ovarian response to human menopausal gonadotropin caused by subcutaneously administered gonadotropin-releasing hormone agonist*. Fertil Steril, 1987. **47**: p. 512 –.
144. Parinaud, J., et al., *Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Busereline) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells*. Fertil Steril, 1988. **50**: p. 597 – 602.
145. Loumaye, E., et al., *Use of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation leads to significant concentrations of peptide in follicular fluid*. Fertil Steril, 1989. **52**: p. 256 – 263.
146. Latouche, J., M. Crumeyrolle-Arias, and D. Jordan, *GnRH receptor in human granulosa cells: anatomical localization and characterization by autoradiographic study*. Endocrinology, 1989. **125**: p. 1739 - 1741.
147. Schachter, M., et al., *Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase—a function of improved embryo quality*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**: p. 197 – 204.
148. Homburg, R., et al., *In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 1993. **80**: p. 858 - 863.
149. Olivennes, F., et al., *A protocol using a low dose of gonadotropin-releasing hormone agonist might be the best protocol for patients with high follicle stimulating hormone concentrations on day 3*. Hum Reprod, 1996. **11**: p. 1169 – 1172.
150. Ben-Rafael, S., et al., *Ovarian hyporesponsiveness in combined gonadotropin-releasing hormones-agonist and menotropin therapy is associated with low serum follicle-stimulating hormone levels*. Fertil Steril, 1991. **55**: p. 272 – 275.
151. Kovalik, A., et al., *Ovarian estradiol production in vivo: inhibitory effect of leuprolide acetate*. J Reprod Med, 1998. **43**: p. 413 – 417.
152. Rón-El, R., et al., *The comparison of early follicular and midluteal administration of long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist*. Fertil Steril, 1990. **54**: p. 233 – 237.
153. Chang, S. and Y. Soong, *Unexpected pregnancies exposed to leuprolide acetate administered after the mid-luteal phase for ovarian stimulation*. Hum Reprod, 1995. **10**: p. 204 – 206.
154. Gonen, Y., W. Jacobson, and R. Casper, *Gonadotropin suppression with oral contraceptives before in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1995. **64**: p. 791 – 795.

155. Daya, S. *Optimal protocol for gonadotropin releasing hormone agonist use in ovarian stimulation.* in *10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Conception.* 1997. Vancouver.
156. Parinaud, J., et al., *Randomized trial of three luteinizing-hormone releasing hormone analogues used for ovarian stimulation in an in vitro fertilization program.* *Fertil Steril*, 1992. **57**: p. 1265 – 1268.
157. Benadiva, C., et al., *Comparison of different regimens of a gonadotropin-releasing hormone analog during ovarian stimulation for in vitro fertilization.* *Fertil Steril*, 1990. **53**: p. 479 – 485.
158. Senoz, S., et al., *Do the suppression criteria in GnRH-a cycles predict in vitro fertilization outcome?* *Gynecol Endocrinol*, 1995. **9**: p. 91 – 96.
159. Neveu, S., et al., *Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization.* *Fertil Steril*, 1987. **47**: p. 639 – .
160. Serafini, P., et al., *An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responders": pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog.* *Fertil Steril*, 1988. **49**: p. 90 - 95.
161. Dirnfeld, M., et al., *A randomized prospective study on the effect of short and long buserelin treatment in women with repeated unsuccessful in vitro fertilization cycles due to inadequate ovarian response.* *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1991. **8**: p. 339 – 343.
162. Gelety, T., A. Pearlstone, and E. Surrey, *Short-term endocrine response to gonadotropin-releasing hormone agonist initiated in the early follicular, mid luteal or late luteal phase in normally cycling women.* *Fertil Steril*, 1999. **64**: p. 1074 – 1080.
163. McNatty, K., et al., *The production of progesterone, androgens and estrogens by granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro.* *J Clin Endocrinol Metab*, 1979. **49**: p. 687.
164. Battacharya, S. and A. Templeton, *A systematic review of the long protocol versus the short protocol of GnRH administration for in-vitro fertilization cycles,* in *Ovulation induction update*, M. Filicori and C. Flamigni, Editors. 1998, The Parthenon Publishing Group.
165. Biljan, M. and S. Tan, *GnRH agonistg in gonadotropin ovulation induction: characteristics of long regimens,* in *Ovulation induction update*, M. Filicori and C. Flamigni, Editors. 1998, The Parthenon Publishing Group.
166. Yang, B., T. Uemura, and H. Minaguchi, *Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on oocyte maturation, fertilization and embryonal development in mice.* *J. Assisted Reprod Genet*, 1995. **12**: p. 728 – 732.
167. García-Velasco, J., et al., *High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients. A prospective randomized controlled trial.* *Hum Reprod*, 2000. **15**: p. 2292 – 2296.
168. Beckers, N., et al., *Follicularf and luteal phase characteristics following early cessation of gonadotropin-releasing hormone agonistg during ovarian stimulation for in vitro fertilization.* *Hum Reprod*, 2000. **15**: p. 43 – 49.
169. Zeleznick, A., H. Schuler, and L. Reichert, *Gonadotrophin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionich gonadotropin to the preovulatory follicle.* *Endocrinology*, 1981. **109**: p. 356 – 362.

170. Pinkas, H., et al., *Gonadotropin stimulation following GnRH-a priming for poor responders in in vitro fertilization-embryo transfer programs*. Gynecol Endocrinol, 2000. **14**: p. 11 – 14.
171. Padilla, S., et al., *Use of the flare-up protocol with high dose human follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for in vitro fertilization in poor responders*. Fertil Steril, 1996. **65**(4): p. 796-799.
172. Bider, D., et al., *Pituitary and ovarian suppression rate after high dosage of gonadotropin-releasing hormone agonist*. Fertil Steril, 1989. **51**: p. 578 – 581.
173. Toth, T., et al., *Suppression and flare regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist: use in women with different basal gonadotropin values in an in vitro fertilization program*. J Reprod Med, 1996. **41**: p. 321 – 326.
174. Katayama, K., et al., *Short-term use of gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide) for in vitro fertilization*. J In Vitro Fert Embryo Transf, 1988. **5**: p. 332 – 337.
175. Ron-El, R., et al., *Characteristics of very short regimens*, in *Ovulation induction update*, M. Filicori and C. Flamigni, Editors. 1998, The Parthenon Publishing Group.
176. San Roman, G., et al., *A prospective randomized comparison of luteal phase versus concurrent follicular phase initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist for in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1992. **58**: p. 744 – 749.
177. Brzyski, R., et al., *Follicular atresia associated with concurrent initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist and follicle-stimulating hormone for oocyte recruitment*. Fertil Steril, 1998. **50**: p. 917 – 921.
178. Spandorfer, S., et al., *"Co-flare" stimulation in the poor responder patient: predictive value of the flare response*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**: p. 629 – 633.
179. Karacan, M., et al., *Clinical pregnancy rates in an IVF program. Use of the flare-up protocol after failure with long regimens of GnRH-a*. J Reprod Med, 2001. **46**: p. 485 – 489.
180. Scott, R. and D. Navot, *Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonists during ovulation induction for in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1994. **55**: p. 945 – 951.
181. Schoolcraft, W., et al., *Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responders in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare growth hormone protocol*. Fertil Steril, 1997. **67**: p. 93 – 97.
182. Surrey, E., et al., *Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1998. **55**: p. 272 – 275.
183. Leondires, M., et al., *Microdose follicular phase gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) compared with luteal phase GnRH-a for ovarian stimulation at in vitro fertilization*. Fertil Steril, 1999. **72**: p. 1018 – 1023.
184. Cohen, a., et al., *Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis*. Hum Reprod, 1992. **5**: p. 485 –
185. Adashi, E., et al., *Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function*. Endocr Rev, 1985. **6**: p. 400 - 420.
186. Hsu, C. and J. Hammond, *Concomitant effects of growth hormone on secretion of insulin-like growth factor I and progesterone by cultured porcine granulosa cells in vitro*. Endocrinology, 1988. **120**: p. 198 – 207.

187. Homburg, R., et al., *Cotreatment with human growth hormone and gonadotropins for induction of ovulation: a controlled clinical trial*. Fertil Steril, 1990. 53: p. 254 – 260.
188. Barreca, A., et al., *In vivo and in vitro effect of growth hormone on estradiol secretion by granulosa cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 77: p. 61 – 67.
189. Menashe, Y., et al., *Can growth hormone increase, after clonidine administration, predict the dose of human menopausal hormone needed for induction of ovulation?* Fertil Steril, 1990. 53: p. 432 - 435.
190. Salat-Baroux, J., et al., *Comparison of growth hormone responses to growth hormone-releasing factor and clonidine in women with normal or poor ovarian response*. Fertil Steril, 1993. 60: p. 791 – 799.
191. Owen, E., et al., *Co-treatment with growth hormone of sub-optimal responders in IVF-ET*. Hum Reprod, 1991. 6: p. 524 – 528.
192. *European and Australian Multicenter Study. Cotreatment with growth hormone and gonadotropins for ovulation induction in hypogonadotropic patients: a prospective randomized, placebo-controlled, dose-response study*. Fertil Steril, 1995. 64: p. 917 – 923.
193. Levy, T., et al., *Another look at co-treatment with growth hormone and human menopausal gonadotrophins in poor ovarian responders*. Hum Reprod, 1993. 8: p. 834 -839.
194. Suikkari, A., et al., *Double-blind placebo controlled study: human biosynthetic growth hormone for assisted reproductive technology*. Fertil Steril, 1996. 65: p. 800 – 805.
195. Howles, C., et al., *Does growth hormone-releasing factor assist follicular development in poor responder patients undergoing ovarian stimulation for in-vitro fertilization?* Hum Reprod, 1999. 14: p. 1939 – 1043.
196. Mashiach, S., et al., *Protocols for induction of ovulation. The concept of programmed cycles*. Ann NY Acad Sci, 1998. 541: p. 37 – 41.
197. Benadiva, C., et al., *Ovarian response to human menopausal gonadotropin following suppression with oral contraceptives*. Fertil Steril, 1988. 50: p. 516 –
198. Lindheim, S., et al., *Short-term gonadotropin suppression with oral contraceptives benefits poor responders prior to controlled ovarian hyperstimulation*. J Assist Reprod Genet, 1996. 16: p. 745 – 747.
199. Biljan, M., et al., *Effects of pretreatment with an oral contraceptive on the time required to achieve pituitary suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues and on subsequent pregnancy rates*. Fertil Steril, 1998. 70: p. 1063 – 1069.
200. Weiner, Z., et al., *Assesment of ovarian and uterine blood flow by transvaginal color Doppler in ovarian-stimulated women: correlation with the number of follicles and steroid hormone levels*. Fertil Steril, 1993. 59: p. 743 - 749.
201. Ben-Shlomo, I., E. Adashi, and D. Payne, *The morphogenic/cytotoxic and prostaglandin stimulating activities of interleukin-1b in the rat ovary are NO-dependent*. J Clin Invest, 1994. 49: p. 1463 – 1464.
202. Battaglia, C., et al., *Adjuvant L-arginine treatment for in vitro fertilization in poor reponder patients*. Hum Reprod, 1999. 14: p. 1690 – 1697.
203. Veeck, L., *Atlas of the human oocyte and early conceptus*. 1986, Baltimore, London. Los Angeles, Sydney: Williams and Wilkins.
204. Creus, M., et al., *Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome*. Hum Reprod, 2000. 15: p. 2341 – 2346.

205. Sherman, B. and S. Korenman, *Characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life*. J Clin Invest, 1975. **55**: p. 699 – 706.
206. Daya, S., *HMG versus FSH: is there any difference?*, in *Ovulation induction update '98*, M. Filicori and C. Flamigni, Editors. 1998, The Parthenon Publishing Group: Bologna. p. 183 – 192.
207. Jones, G., et al., *The effect of follicle-stimulating hormone without additional luteinizing hormone on follicular stimulation and oocyte development in normal ovulatory women*. Fertil Steril, 1985. **43**(696–702).
208. Gonen, Y., et al., *Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **71**: p. 918 - 922.
209. Schachter, M., et al., *Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase – a function of improved embryo quality*. J Assist Reprod genet, 2001. **18**: p. 197 – 204.
210. Seeman, E., et al., *Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis*. N. Engl. J. Med., 1989. **320**: p. 554 - 558.
211. Spira, A., *The decline of fecundity with age*. Maturitas, 1988: p. 15S – 22S.