

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA,
OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA: UN MARCADOR PREDICTIVO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Trabajo de Tesis Doctoral
Presentado por D. JOSEP SANCHIS PLA

Director:
Prof. Dr. D. F. BONILLA-MUSOLES

Coodirectores:
PROF. DR. D. F. RAGA BAIXAULI
PROF. DR. D. OSCAR CABALLERO LUNA

UNIDAD DOCENTE DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA
DEPARTAMENTO POG, FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA

Prof. D. FERNANDO BONILLA MUSOLES. Doctor en Medicina y Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado **“LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA: UN MARCADOR PREDICTIVO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA”** ha sido realizado íntegramente, bajo mi dirección, y coodirigida con el Prof. Dr. D. FRANCISCO RAGA BAIXAULÍ y Prof. Dr. D. OSCAR CABALLERO LUNA en este departamento por D. JOSEP SANCHIS PLA, y reúne las condiciones necesarias, para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de Doctor en Medicina.

DR FERNANDO BONILLA MUSOLES
VALENCIA, SEPTIEMBRE 2013

Prof. D. FRANCISCO RAFA BAIXAULI. Doctor en Medicina y Profesor Asociado Médico del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado **“LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA: UN MARCADOR PREDICTIVO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA”** ha sido realizado íntegramente, bajo mi dirección, y coodirigida con el Prof. Dr. D. FERNANDO BONILLA-MUSOLES y Prof. Dr. D. OSCAR CABALLERO LUNA en este departamento por D. JOSEP SANCHIS PLA, y reúne las condiciones necesarias, para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de Doctor en Medicina.

DR FRANCISCO RAGA BAIXAULÍ
VALENCIA, SEPTIEMBRE 2013

Prof. D. OSCAR CABALLERO LUNA. Doctor en Bioquímica, por la Universidad de Valencia y Profesor Asociado de la Facultad de Enfermería de Valencia.

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado **“LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA: UN MARCADOR PREDICTIVO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA”** ha sido realizado íntegramente, bajo mi dirección, y co-dirigida con el Prof. Dr. D. FRANCISCO RAGA BAIXAULÍ y Prof. Dr. D. FERNANDO BONILLA-MUSOLES en este departamento por D. JOSEP SANCHIS PLA, y reúne las condiciones necesarias, para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de Doctor en Medicina.

**DR OSCAR CABALLERO LUNA
VALENCIA, SEPTIEMBRE 2013**

AGRADECIMIENTOS

A Don Fernando Bonilla, por ser el mejor jefe del mundo.

Al Dr Raga, por sus enseñanzas.

A Oscar, por las muchas tardes que le he robado.

A Salva, por su inestimable ayuda.

Dedicada a mi familia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 EL ENVEJECIMIENTO DEL ÚTERO Y LA MENOPAUSIA	22
1.2 ENVEJECIMIENTO OVÁRICO.....	23
1.3 ETIOLOGIA DEL FALLO OVÁRICO PRECOZ	30
1.4 VALORACIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA.....	34
1.4.1 TESTS PASIVOS DE RESERVA OVÁRICA	36
1.4.2 TESTS DINÁMICOS DE RESERVA OVÁRICA.....	48
1.4.3 BIOPSIA OVÁRICA	52
1.5 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE LA HAM	53
1.5.1 EL CONCEPTO DE EDAD REPRODUCTIVA AVANZADA Y DETERIORO DE LA RESERVA OVÁRICA	54
1.5.2 PLANTEAMIENTO ACTUAL EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA	56
1.5.3 LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA; SU EXPRESIÓN Y FACTORES QUE LA MODULAN	57
1.5.4 LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA. SUS RECEPTORES.	61
1.5.5 EL PAPEL DE LA HAM EN LA FISILOGIA DEL OVARIO.....	62
1.5.6 CRITERIOS DE BAJA RESPUESTA:	63
1.5.7 EFICACIA EN LA PREDICCIÓN DE LA BAJA RESPUESTA	64
1.5.8 LA HAM COMO MARCADOR DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA MUJER DE EDAD AVANZADA	76
1.5.9 IMPORTANCIA DE LA HAM EN DISFUNCIONES OVARICAS	77
1.5.10 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA CUANTITATIVA OVÁRICA EN RA	78
1.5.11 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA CUALITATIVA OVÁRICA EN RA ...	80
1.5.12 FACTORES A TENER EN CUENTA EN EL MANEJO DE LA HAM.....	82
2. MATERIAL Y MÉTODO	87
2.1 OBJETIVOS	87
2.2 MATERIAL Y MÉTODO	87
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	95

3.- RESULTADOS	99
3.1. DESCRIPTIVO	99
3.2 ANÁLISIS DE LA EDAD, RFA Y HAM SEGÚN LOS GRUPOS DE RESPUESTA OVÁRICA.	106
3.2.1 EDAD	106
3.2.2. HAM.....	107
3.2.3. RFA.....	112
3.3. ANÁLISIS DEL VALOR PREDICTIVO PARA BAJA RESPUESTA.....	117
3.3.1. FSH VS RES1	117
3.3.2. LH VS RES1	122
3.3.3. 17 – ESTRADIOL VS RES1	123
3.3.4 RELACIÓN RFA VS RESPUESTA.....	127
3.3.5 RELACIÓN HAM VS RESPUESTA.....	133
3.3.6 RECUENTO FOLÍCULOS ANTRALES VERSUS HAM	139
3.3.7 RELACIÓN RFA+HAM VERSUS RESPUESTA	141
3.4 RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES RFA Y HAM CON LOS OVOCITOS EN METAFASE 2	143
3.4.1. RECUENTO FOLÍCULOS ANTRALES VERSUS OVOCITOS EN METAFASE 2 OBTENIDOS.....	143
3.4.2. HAM VERSUS OVOCITOS EN METAFASE 2 OBTENIDOS	145
3.4.3 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE HAM, RFA Y EDAD CON LOS OVOCITOS EN METAFASE 2 MEDIANTE REGRESIÓN DE POISSON	146
3.5 RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES RFA Y HAM CON LA CALIDAD EMBRIONARIA.....	151
3.5.1. RFA VERSUS CALIDAD EMBRIONARIA OBTENIDA	151
3.5.2. HAM VERSUS CALIDAD EMBRIONARIA OBTENIDA	153
3.6. RESULTADOS GESTACIONALES Y OBSTÉTRICOS FINALES.....	155
4. DISCUSIÓN.....	161
5. CONCLUSIONES	179
6. BIBLIOGRAFÍA.....	185

TRA: técnicas de reproducción asistida.

TRO: test de reserva ovárica.

UI: unidades internacionales.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

VO: volumen ovárico.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

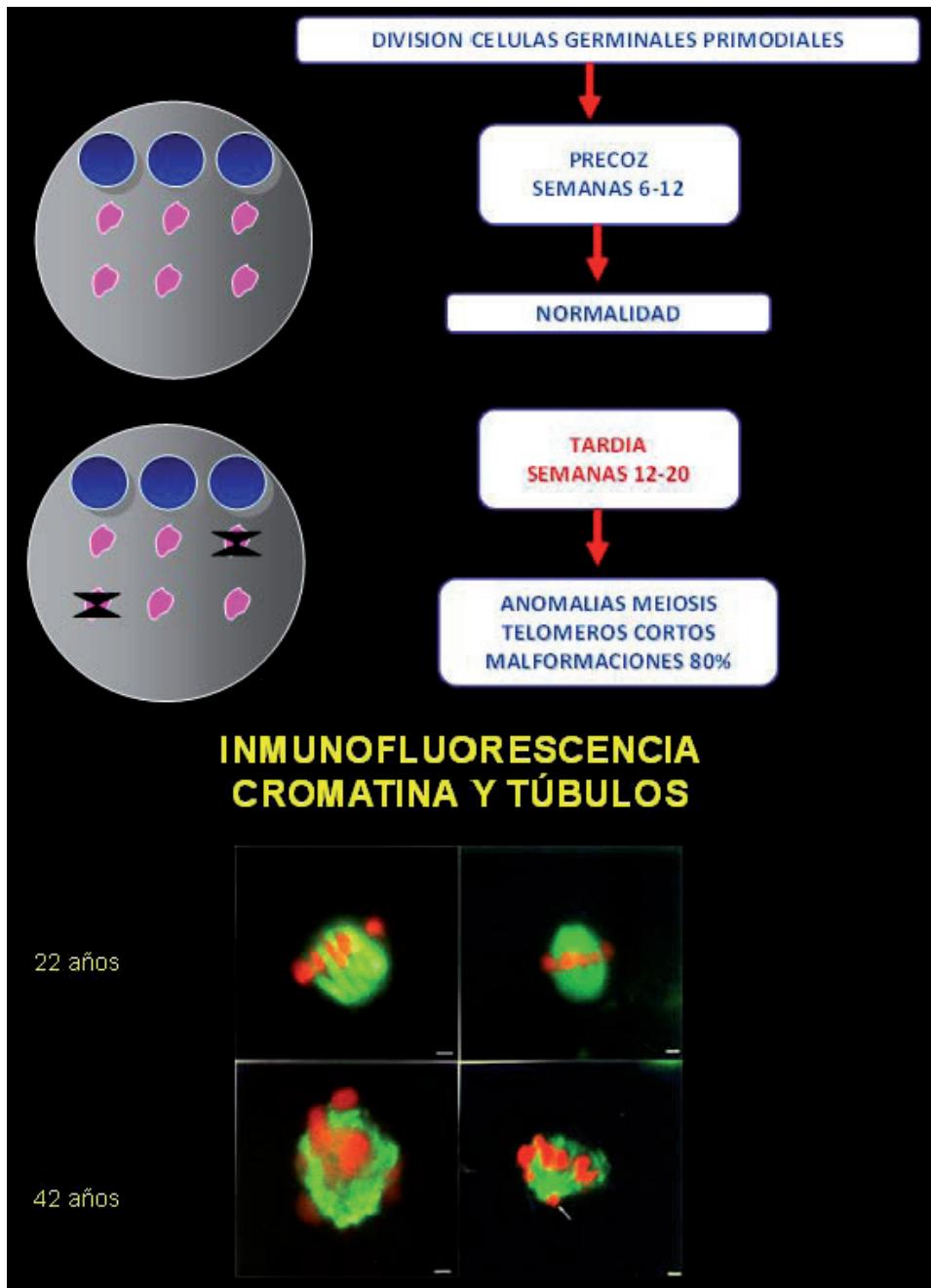
En los últimos decenios España se ha convertido, con 1,36 hijos por familia, en el país con el más bajo índice de natalidad (Bukman y Heineman, 2001). La participación de la mujer en el mundo laboral y el deseo de procreación a edades cada vez más avanzadas, son las causas que la han llevado a esta grave situación.

Cada año aumenta el número de ciclos de FIV-TE en pacientes con edades superiores a 37 años y con índices de éxito bajos, por lo que se recurre a la donación de ovocitos, prohibida en muchos países europeos.

La caída de la fecundidad con la edad antes de la menopausia, es un fenómeno bien conocido en Reproducción Asistida (RA). Las causas son, básicamente, la escasa reserva ovárica y la mala calidad de los ovocitos restantes. Se estima que entre el 70 a 80% de estos son portadores de defectos cromosómicos o genéticos, (Tarin *et al.*, 1991; Pellicer *et al.*, 1999b; Ebner *et al.*, 2006).

Tanto la cantidad como la calidad de los ovocitos restantes están estrechamente relacionadas entre sí y con la edad. Los mejores ovocitos son reclutados en los primeros años reproductivos.

Esta calidad se evalúa con el porcentaje de ovocitos metafase II obtenidos y mediante su observación morfológica. Pero se sabe que ovocitos morfológicamente normales no lo son cuando se estudian con microscopía electrónica (Ebner *et al.*, 2006). Se ha observado un descenso en la fracción mitocondrial encargada de los procesos oxidativos con un incremento tanto de la dilatación del aparato de Golgi como del retículo endoplasmático que se corresponden con un descenso de la actividad metabólica que acompañará no solo a los ovocitos sino a los embriones de ellos derivados. (Esquema 1)



Esquema 1

Durante la vida intrauterina existen dos fases de división de las células germinales (arriba). La segunda o tardía da lugar a numerosos folículos primordiales anormales. Estos son los últimos que se ovulan en la vida reproductiva (abajo).

Se explica así que se logren menos tasas de gestación independientemente de la edad y sin que la morfología ovocitaria parezca estar alterada. La tasa de aneuploidías aumenta considerablemente con la edad, siendo la principal causa en reducir la fertilidad. Las principales son las anomalías en la segregación de los cromosomas en la primera meiosis. Se produce así un declive con la edad de la competencia meiótica y del desarrollo ovocitario.

La depleción folicular más que la edad afecta a la capacidad del ovocito para controlar su propia segregación de los cromosomas, por lo que existe un mayor riesgo de síndrome de Down. Se asocian pues riesgos de trisomía y errores en la segregación.

El medio ambiente alterado a estas edades o con esta reserva ovárica disminuida puede influir y afectar en las interacciones entre folículo y ovocito modificando la expresión y concentración de factores como el meiosis-activating sterol (MAS) (Cukurcam *et al.*, 2007). De esta forma podrían lesionarse los procesos que desencadenan la maduración nuclear y citoplasmática.

Se ha visto, por ejemplo, un aumento del VEGF (vascular endotelial growth factor) relacionado con anomalías en el huso meiótico que alteraría el aporte de oxígeno. Esta hipoxia sería causa primaria de la maduración alterada (Van Blerkom, 1997). Los ovocitos hipóxicos van dotados de anomalías en la organización de los cromosomas asociados a defectos del huso acromático durante la metafase. Estos disturbios llevarían a desórdenes de segregación y mosaicismos.

Si en las fases finales de maduración *in vitro* de ovocitos de ratón se suprime el suplemento de oxígeno, ésta se frena y aumenta la incidencia de cromosomas no alineados. El estrés oxidativo en ovocitos como respuesta al envejecimiento es capaz de inducir las anomalías del huso acromático y la aparición de aneuploidías.

1.1 EL ENVEJECIMIENTO DEL ÚTERO Y LA MENOPAUSIA

El envejecimiento uterino no es la causa, muestra de ello son los altos índices de gestaciones que se logran por donación de ovocitos entre los 45 y 50 años (60-70%). O el parto a edades muy avanzadas.

La aparición de la menopausia ocurre cuando solo restan unos mil folículos, sin embargo, la infertilidad precede en muchos años y está estimada, más o menos, en unos 13,5. (Fig 1)

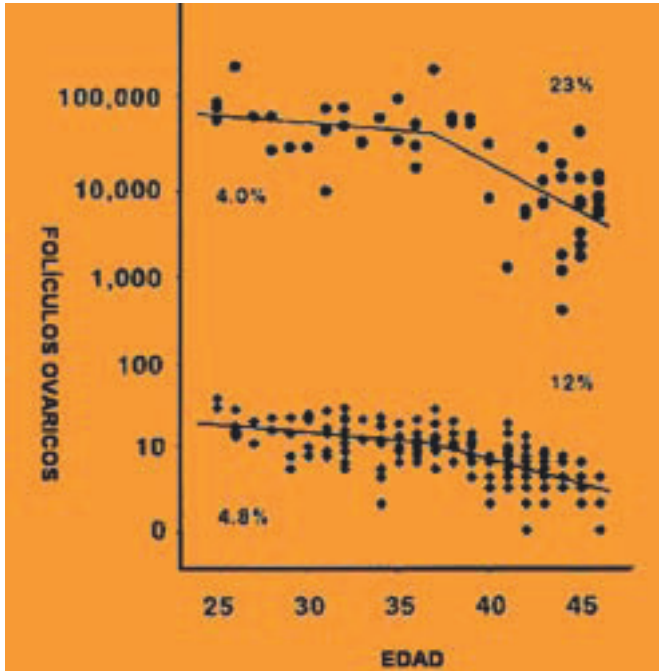


Figura 1

*La **curva superior** muestra la relación entre la cuantía de folículos primordiales con la edad y ha sido obtenida de cortes histológicos ováricos. La **parte inferior** muestra el número de folículos según la edad. Se observa como a partir de cierta edad (35-37años) el declive es mayor. El declinar relativo del número de folículos se evidencia en ambas curvas (modificado de Scheffer et al., 1999).*

La menopausia de origen ovárico disfuncional también está determinada por el pool de células germinales almacenado y por el índice de depleción durante la vida (Navot *et al.*, 1994).

1.2 ENVEJECIMIENTO OVÁRICO

El fenómeno de la depleción folicular se inicia con el comienzo del desarrollo ovárico y finaliza casi cinco años después de instaurarse la menopausia (Bonilla-Musoles *et al.*, 2010b).

La concentración de folículos primordiales sufre una depleción permanente en la vida intrauterina, iniciándose ya en el comienzo del desarrollo, cuando las células germinales están emigrando hacia la cresta genital. Este fenómeno es evidente, bastante antes de la semana 12 (Bonilla- Musoles, 1974a).

Las células germinales primitivas proceden de una porción específica del botón embrionario, y desde el saco vitelino (día 24) en el techo del intestino primitivo, descienden por el ángulo celómico (día 28) a través de la vía germinal (o Keimbahn) hasta alcanzar el día 31 la cresta genital, un engrosamiento del epitelio celómico llamado epitelio germinal en un área específica situada junto a lo que serán los esbozos de los conductos de Wolff, de Müller y al lado de donde se desarrollarán los riñones y las glándulas suprarrenales (Bonillas-Musoles *et al.*, 2010b).

El mecanismo de esta emigración obedece a tres causas: movimientos ameboideos, un quimiotactismo recíproco de éstas hacia la cresta germinal y viceversa y por la presión sanguínea vascular que lo facilita. A mayor presión mayor rapidez en alcanzar la cresta.

Durante esta emigración muchas de ellas no alcanzan la cresta genital, degeneran y desaparecen o cesan en su progresión e implantándose dan lugar a los quistes pilonidales o a teratomas.

Una vez en el estroma de la cresta genital sufren un fenómeno lujurioso de multiplicación celular hasta la fase de dictiotene de la segunda división meiótica. En esta fase permanecen hasta momentos antes de la ovulación, en la vida reproductiva, cuando reiniciarán el proceso de meiosis fundamental para la fertilización.

Finalizada la división (entre las semanas 12, la mayoría, y 20 muchas menos) se rodean de unas células procedentes de los conductos de Pflüger, origen de la granulosa (Fig. 2). Este es un proceso fundamental de defensa inmunológica y genética, pues de no acontecer, las células germinales son consideradas como un aloinjerto y destruidas.

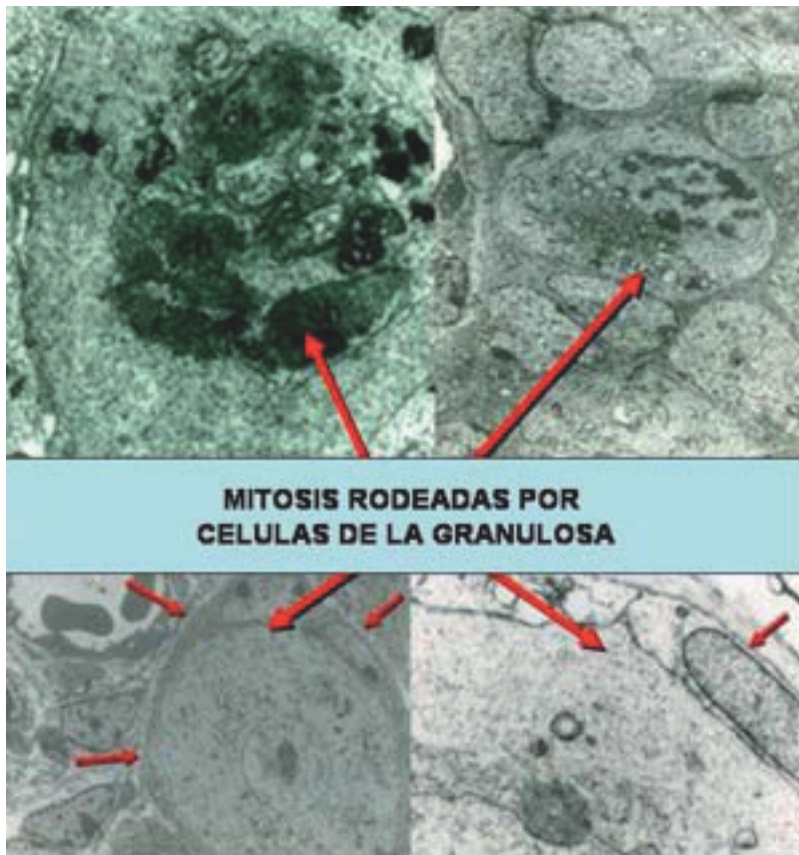


Figura 2

Arriba microscopía electrónica de transmisión de dos células germinales embrionarias en fase de división. Los cromosomas se observan en negro. *Abajo*, finalizada la división, las células germinales se rodean de una fina capa de células de la granulosa que las protege (flechas rojas) (Bonilla-Musoles, 1974a).

Este proceso de división es tan brutal, que el embrión de 8 semanas ya tiene almacenadas 600.000 células primordiales germinales que alcanzan en el séptimo mes los 7 millones, (Bonilla-Musoles 1974 a y b; Block 1952; Baker 1963).

Pero a partir de ahí, el fenómeno de la depleción se acentúa de forma que al nacimiento, están presentes 1 millón de folículos primordiales, 600.000 a la edad de 6 meses y en la pubertad ya solo persisten 300.000 (Bonilla-Musoles, 1974 b).

Aunque, el fenómeno de la depleción continúa a lo largo de toda la vida reproductiva, aproximadamente hacia los 37 años se acelera y disminuye rápidamente

la capacidad reproductiva (Menken, 1986; Faddy *et al.*, 1992). A ello se añade que los folículos de mejor calidad son los primeros a ser reclutados durante los años iniciales.

Así pues, el declive es exponencial y se dobla cuando la dotación cae por bajo de un nivel crítico establecido en 25.000 folículos primordiales y primarios, con una edad de 37,5 años.

La menopausia se instaura cuando no restan más que 1.000-5.000 folículos. Se ha sugerido que estos folículos restantes serían de muy baja calidad y/o menos sensibles a los niveles elevados de gonadotropinas (Blumenfeld y Haim, 1997). Un 10% de las mujeres ya presentan la menopausia a los 45 años.

Las recién nacidas poseen la cortical del ovario engrosada pues está dotada de cientos de miles de folículos primordiales y primarios. Pueden verse muchos de ellos degenerados.

Una vez se establecen los ciclos menstruales, y unos 80 días antes de la ovulación, se inicia *el reclutamiento* de unos 450 a 500 folículos primordiales y primarios. Este fenómeno es independiente de la FSH y la LH y acontece gracias a factores de crecimiento y vasculares locales (Insulin growth factor, interleukin 1,6, vascular endothelial growth factor, etc.) (Kaipia 1997; Pellicer *et al.*, 1999a; Casañ *et al.*, 2000).

De ellos solo 20 a 25 llegan al pico de la FSH inter-cíclica. El resto degeneran y desaparecen. De los que llegan, *son seleccionados* unos pocos (1 a 3) que *maduran* y alcanzan la fase de folículo pre-ovulatorio. Sin embargo son suficientes, pues una mujer llegará a ovular a lo largo de la vida entre 400 y 450 veces.

Los principales mecanismos y el momento en que tantos millones de células germinales degeneran a lo largo de toda la vida, especialmente al comienzo, y el por qué de que algunas mujeres vean acelerado este proceso en el tiempo son (Bonilla-Musoles, 1974b):

- ***La necrosis.*** En general de origen vascular, por pérdida o disminución de la red vascular peri folicular (Fig. 3) (Pellicer *et al.*, 1994). Este es importante durante la vida intrauterina pero también, y mucho más, durante la época reproductiva. Una vez necrosados desaparecen. El proceso se ve acelerado por fallo vascular primario, infecciones, inflamaciones, endometriosis, etc. De ahí la importancia del estudio de los flujos vasculares en la medular del ovario en la mujer adulta.

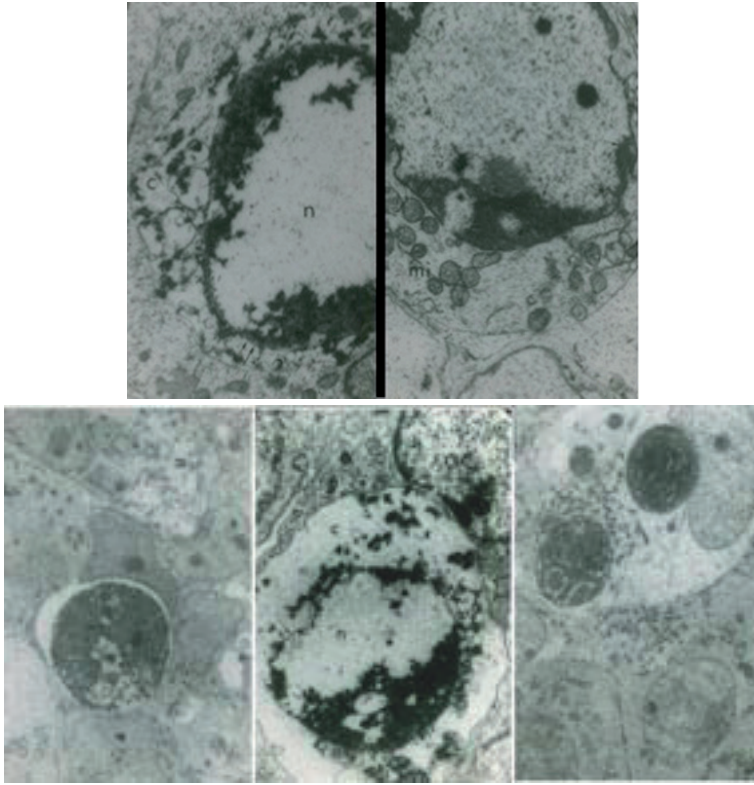


Figura 3

Arriba, microscopía electrónica de dos folículos primordiales fetales humanos necróticos. El ovocito muestra la cromatina concentrada e irregular en la periferia del núcleo, existe ya vacuolización intranuclear. *Abajo*, tres ovocitos fetales humanos ya degenerados. Los dos de los lados ya han sido fagocitados y el central ya necrosado lo está siendo. Ninguno muestra células de la granulosa rodeándolos (Bonilla-Musoles, 1974 a)

- ***La autolisis y fagocitación.*** Acontece cuando no existe una capa de células de la granulosa que los rodea completamente. De alterarse ésta, el ovocito degenera y es fagocitado. Este fenómeno se exagera en casos de patologías de causa inmunológica o genética. Es el caso de las disgenesias gonadales (Fig. 3)

- ***La Migración de los ovocitos a la superficie ovárica donde saltan y desaparecen.*** Es el más importante en la vida intra uterina y continua sólo hasta pocos meses después del nacimiento.

La confirmación ha venido de la mano de la microscopía electrónica de barrido de ovarios fetales. La superficie del ovario fetal en semana 28 es lisa y muestra entrantes (ovario girato) donde persisten, tras el nacimiento, restos del epitelio celómico. Sin embargo, cuando se amplía la imagen, se observa que muestra innumerables ovocitos que hacen resalte y que saltan a cavidad abdominal. Lo hacen de dos formas:

- Bien en grandes grupos a modo de racimos, que se asemejan a fresas o moras, más típico de las semanas 24 a 32 (fig. 4).

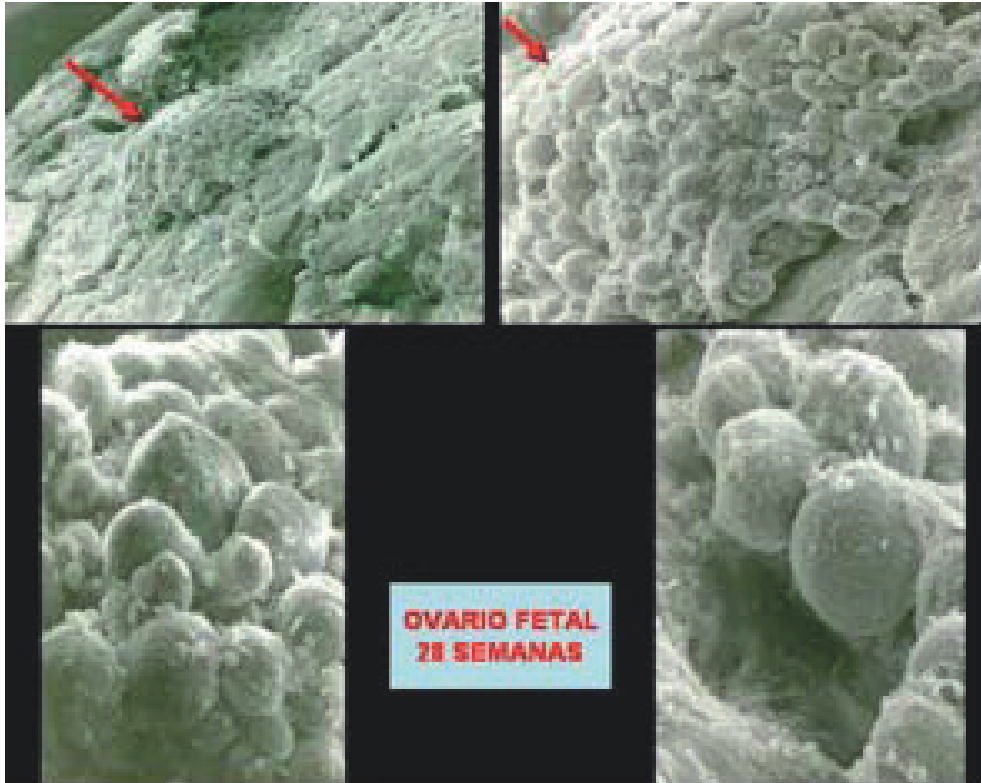


Figura 4

Microscopía electrónica de barrido de la superficie de un ovario fetal en semana 28. Se observan numerosos grupos de folículos primordiales saliendo de la superficie en grupos. Algunos de estos grupos (arriba e izquierda) semejan fresas o moras. (Bonilla-Musoles, 1974a)

- Bien de forma aislada, pero ocupando grandes áreas y siendo, igualmente, numerosísimos los que saltan (Fig. 5)

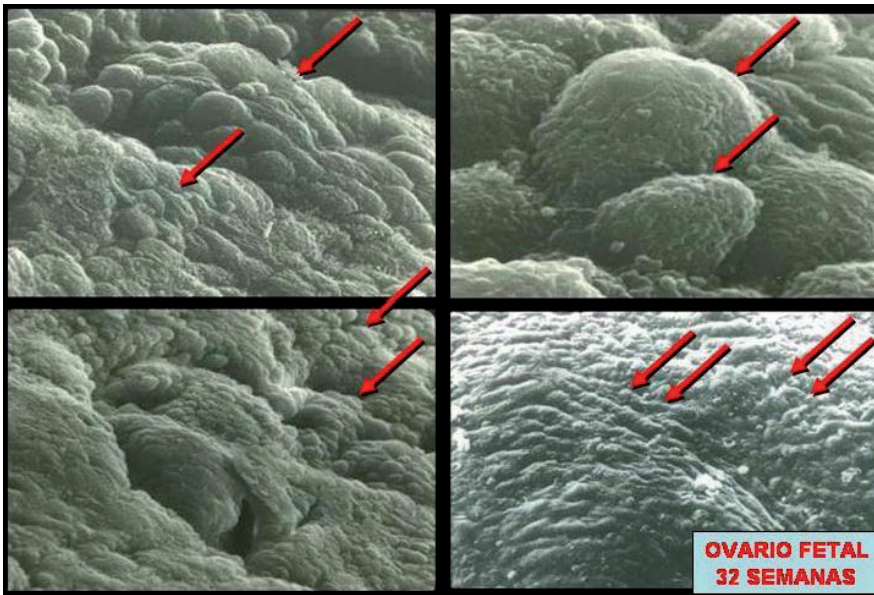


Figura 5

Microscopia electrónica de barrido de la superficie de un ovario fetal en semana 32. Se observan numerosos folículos primordiales saliendo de la superficie en forma aislada (Flechas) (Bonilla-Musoles, 1974a).

El fenómeno se mantiene tras el nacimiento (Fig. 6) aunque ya de forma más selectiva y más comunmente de manera aislada. Finalmente, y en las zonas donde emergieron los folículos quedan lesiones en la superficie que semejan cráteres.

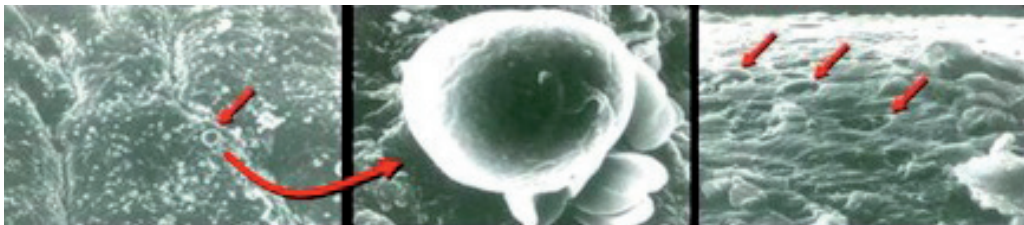


Figura 6

Microscopia electrónica de barrido de la superficie de un ovario a los tres meses del nacimiento. Se siguen observando folículos primordiales saliendo de la superficie de forma aislada (izquierda), pero en menor cuantía. En las zonas donde se ha producido la emigración quedan agujeros en la superficie que semejan cráteres (derecha, flechas) (Bonilla-Musoles, 1974a).

En resumen, el declive es permanente, más acentuado en la vida intrauterina y muchísimo más en la época premenopáusica, pero persiste hasta cinco años después de la menopausia. Estos ovocitos restantes tienen unas características morfológicas y de calidad diferentes, especialmente desde unos trece años antes de que la menopausia se instaure (Bonilla-Musoles *et al.*, 2010d).

Queda claro que la importancia de estos procesos (y situaciones que los agraven) tanto en la vida pre como postnatal, en la determinación del pool folicular serán esenciales y que tienen lugar mediante una muerte celular programada o apoptosis. Pero se conoce que, las gonadotropinas, los estrógenos, los factores de crecimiento, las citoquinas, la reorganización de la actina del citoesqueleto y el óxido nítrico protegen frente a ésta. Al mismo tiempo, el factor de necrosis tumoral alfa, los andrógenos, las familias de los genes BCL2 e ICE la promueven (Kaipia y Hsueh, 1997).

Un pool inicial folicular disminuido o una tasa de atresia folicular aumentada darán lugar a un agotamiento folicular prematuro.

1.3 ETIOLOGIA DEL FALLO OVÁRICO PRECOZ

Este fue definido por De Moraes-Ruehsen en 1967 como el cese no fisiológico de la menstruación antes de los 40 años y después de la menarquia (Sherman, 1979; Castelo-Branco, 2003).

Los factores etiológicos han sido clasificados en (Castelo-Branco, 2003):

DEPLECION FOLICULAR

Pool folicular inicial deficiente:

- Disgenesia gonadal pura
- Aplasia o hipoplasia tímica. La timectomía intraútero produce una dotación anormal de folículos primordiales
- Idiopática

Atresia folicular acelerada:

- Alteraciones cromosómicas
 - Numéricas
 - Síndrome de Turner
 - Mosaicismos
 - Estructurales
 - Delecciones del cromosoma X

Galactosemia

Agentes externos

Iatrogénicos (cirugía de trompas, ovario, embolizaciones que reducirían el volumen ovárico y/o su vascularización, quimioterapia dependiente de fármaco dosis y edad de la mujer, radioterapia pélvica superior a 600 cGrays)

Otros (tabaco, de enorme importancia, endometriosis, infecciones como la parotiditis, metales pesados, disolventes, pesticidas, plásticos y químicos industriales o la propia epilepsia)

Alteraciones inmunológicas. Se asocia a enfermedades autoinmunes tanto endocrinas (hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, Addison, Diabetes) como no endocrinas (candidiasis crónica, púrpura trombocitopénica, vitíligo, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, lupus, artritis reumatoide,

Chron, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria y hepatitis crónica activa autoinmune).

Idiopáticas

DISFUNCION FOLICULAR

Alteraciones inmunológicas (autoinmunidad, ooforitis linfocítica).

Déficits enzimáticos

- De 17 α hidrolasa
- De 17-20 desmolasa
- De colesterol desmolasa
- De galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa

Anomalías gonadotrópicas

Síndrome del ovario resistente

IDIOPÁTICO

Su incidencia se estima inferior al 1% de las mujeres menores de 40 años (Ebner *et al.*, 2006; Bonilla-Musoles, 2009).

Desde el punto de vista anatómico y funcional se han descrito dos variedades de fallo ovárico precoz:

La **afolicular**, propia de las disgenesias gonadales, gonadoblastomas y hermafroditismos, donde existe una depleción total de los folículos, y

La **folicular**, donde pueden detectarse algunas estructuras foliculares y en las que, teóricamente, puede reaparecer, en algunas ocasiones, cierta función ovárica. Dentro de esta se distinguen la ooforitis (a nivel folicular), los ovarios con pocos folículos y los ovarios con numerosos folículos (síndrome de ovarios resistentes o refractarios).

Es evidente que este puede ser producido por múltiples causas responsables de la progresiva, y a veces muy rápida, disminución y desaparición de los folículos o de la falta de respuesta de estos a los estímulos hormonales habituales.

En algunos casos existe historia familiar (Coulam 1983 y 1986) de aquí la importancia del conocimiento de los antecedentes al investigar la anamnesis.

Entre los factores etiológicos mencionados la **disminución en el pool original en la fase embrionaria**, no es bien conocido. Se habla tanto de una dotación inicial

deficiente de folículos primordiales, lo mas común, como de una tasa acelerada de atresia folicular. Se implican factores cromosómicos (disgenesias gonadales, etc.), enzimáticos e inmunológicos (hipoplasia o aplasia tímica).

Los mecanismos reguladores de la migración de las células germinales faltan por estar perfilados y una alteración en cualquiera de ellos puede resultar en una reducción de la población inicial o incluso en su ausencia total (disgenesias).

Es importante saber que estas pacientes no tienen porqué presentar necesariamente amenorrea primaria, ya que leves alteraciones pueden dar lugar a desarrollo de los caracteres secundarios, pubertad y fertilidad inicial

La atresia folicular acelerada, tanto prenatal como postnatal, origina gónadas sin folículos o muy escasos y se involucran factores genéticos, enzimáticos, inmunológicos y agentes externos.

La reducción prematura de la población suele deberse a un incremento de la atresia folicular a través de un proceso de apoptosis programado. Éste está mediado por numerosas moléculas del ovario fetal y del adulto con acción pro-apoptósica y pro-supervivencia, cuyo desequilibrio puede determinar el incremento de la tasa de atresia folicular.

Las alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, aparecen en un 20-50% de los casos. Caben resaltar el síndrome de Turner, la trisomía X presente en el 3,8% de mujeres con fallo ovárico prematuro, las alteraciones de los brazos cortos y largos, los isocromosomas y el síndrome del cromosoma X frágil, pero los más frecuentes son los mosaicismos (45XO/46XX; 45X/47XXX, 46XX/47XXX, etc.) con una incidencia que oscila entre el 5 y el 40%. En ellos el daño gonadal suele ocurrir una vez ha tenido lugar el desarrollo y la diferenciación del ovario y por ello, con frecuencia, queda algún grado de función folicular. También se imbrican defectos genéticos autosómicos.

Es necesaria la presencia de los dos cromosomas X para el desarrollo normal de la gónada, la ausencia de uno de ellos no interfiere en el proceso de la emigración de las células germinales primitivas, pero sí acelera la atresia, de forma que al nacimiento la gónada es disgenética y sin folículos.

La *Galactosemia*, trastorno hereditario autosómico recesivo del metabolismo de los hidratos de carbono, por déficit de la enzima galactosa-1-fosfato-uridintransferasa produce alteraciones en la función ovárica en el 30-60% de los casos, pero se desconoce el mecanismo.

La presencia de folículos, en la **disfunción folicular**, no es sinónimo de función ovárica normal. Aunque muchas son desconocidas, conocemos algunas de sus causas tales como las *alteraciones enzimáticas de la esteroidogénesis*.

Numerosos estudios (Coulam, 1983) han mostrado que la *autoinmunidad* es una de las causas potenciales. Las enfermedades autoinmunes endocrinas producen una regulación aberrante de la respuesta inmune tanto de la inmunidad celular (células T, células NK) como de la humoral (anticuerpos) convirtiéndose el tejido endocrino en blanco del ataque autoinmunitario, resultando, finalmente, la destrucción de la glándula.

Parece que en la patogénesis de estos fallos endocrinos se requiere la participación conjunta de factores genéticos y ambientales (Coulam, 1986; Hoek, 1997).

Son numerosas las enfermedades autoinmunes capaces de actuar sobre el ovario (hipotiroidismo, enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo, candidiasis mucocutánea, miastenia gravis, enfermedad de Chron, vitíligo, anemia perniciosa, diabetes mellitus, lupus, artritis reumatoide, etc.).

Son conocidos casos de presencia de anticuerpos circulantes frente al receptor de la FSH, de la LH, anti-zona pelúcida, etc.

A pesar de todo ello, se desconoce el mecanismo implicado en la autoinmunidad contra el ovario.

Finalmente, cuando no se encuentra una causa, y son muchos los casos, se denominan **idiopáticos**. Algunos son transitorios y la paciente recupera la función ovárica de forma espontánea, incluso quedan gestantes, si bien es frecuente que vuelva a repetirse el fallo ovárico.

1.4 VALORACIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA

Se utiliza el término Reserva ovárica (RO) para describir la capacidad funcional de los ovarios y refleja el número y la calidad de los ovocitos que quedan en el ovario en un momento determinado y guarda una correlación inversa con la edad cronológica de la mujer.

Los cambios sociales acaecidos en los últimos años en la planificación familiar, han causado un incremento en la incidencia de pacientes infértiles debido al envejecimiento de su capacidad reproductiva (Weinstein *et al.*, 1993; Abma *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 2001). Estudios en poblaciones con gran número de familias numerosas, y donde apenas se usan anticonceptivos, han demostrado que la fertilidad de la mujer empieza a declinar bastante antes de que se pueda apreciar, probablemente sobre los treinta. Descenso que se ve acentuado a los treinta y cinco y que conducirá a la esterilidad en una edad media de cuarenta y un años (Spira *et al.*, 1998; Wood, 1989; te Velde and Pearson, 2002). La probabilidad de no concebir un primer hijo en doce meses es menor 5% para mujeres de veinte años, pero sube hasta un 30% para mujeres de treinta y cinco años (Abma *et al.*, 1997). El efecto de la edad sobre la fertilidad femenina también ha sido demostrado por los resultados de numerosos estudios sobre tratamiento de fertilidad en parejas infértiles. La probabilidad de conseguir un hijo gracias a las técnicas de reproducción asistida (TRA) disminuye claramente después de los treinta y cinco años, y lo mismo se ha demostrado para las tasas de implantación embrionaria (Broekmans *et al.*, 2006). Así, la edad de la mujer se ha establecido como un importante predictor del éxito de las TRA.

En las últimas dos décadas, han sido estudiados varios tests conocidos como Tests de Reserva Ovárica (TRO), por su habilidad para predecir los resultados de un tratamiento de fecundación in vitro en términos de ovocitos recuperados y tasas de embarazo. Algunos de estos tests han llegado a ser parte de las pruebas diagnósticas de rutina realizadas en pacientes infértiles que van a someterse a un tratamiento de reproducción asistida.

Se considera que una reserva ovárica normal debe permitir obtener 8-10 folículos/ovocitos maduros tras estimulación con gonadotropinas en FIV, para proporcionar unas posibilidades óptimas de embarazo (Fasouliotis *et al.*, 2000). En general, la edad de la mujer es una manera sencilla de obtener información acerca de su RO, tanto en términos

de cantidad como de calidad (Templeton *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha observado una sustancial variación en la disminución de la capacidad reproductiva en función de la edad (te Velde and Pearson, 2002). Por ello, el objetivo de los TRO sería identificar entre las mujeres que van a someterse a una TRA, las que tienen riesgo aumentado de baja respuesta o probabilidad muy baja de conseguir un embarazo tras FIV; las de edad avanzada que tendrán buenas posibilidades de embarazo; las relativamente jóvenes que a pesar de tener una baja reserva, pueden presentar posibilidades de embarazo. En las mujeres que desean retrasar la maternidad, sería interesante poder valorar su reserva ovárica actual y predecir su edad de menopausia.

Si conseguimos identificar tales categorías de mujeres, el manejo podrá ser individualizado, en relación a las dosis de estimulación y al consejo que podremos hacer a la pareja acerca de sus posibilidades de éxito (Tarlantzis *et al.*, 2003) y la conveniencia de iniciar o no el tratamiento.

Casi toda la literatura dedicada a la RO se centra en la capacidad de respuesta a la estimulación con gonadotropinas en el contexto de un ciclo de Fecundación in Vitro. Puesto que no hay método para contabilizar el remanente de folículos primordiales, se acepta que una respuesta adecuada a la estimulación ovárica es el parámetro clínico de RO que nos va a informar del pool de folículos primordiales, y servirá como punto de referencia para la valoración de la capacidad diagnóstica de los TRO. También la consecución de un embarazo tras FIV, se establece como variable para juzgar la validez clínica de los TRO. Sin embargo, la obtención de un embarazo tras TRA puede estar influenciada por otros factores, por lo que muchos test presentan buena capacidad de predicción de la respuesta a la estimulación, pero fracasan a la hora de predecir la probabilidad de embarazo.

Se considera que el proceso de envejecimiento reproductivo está determinado por un descenso gradual de la cantidad y calidad de los ovocitos contenidos en los folículos presentes en la corteza ovárica. El envejecimiento del ovario conlleva unos cambios endocrinos que reflejan el agotamiento de la población de folículos: disminución del recuento de folículos antrales (RFA) y del volumen ovárico; reducción en la producción de inhibinas, básicamente de la inhibina B, y hormona antimülleriana (AMH); incremento de los niveles de hormona folículoestimulante (FSH) interciclo y en fase folicular precoz, y aumento prematuro de los niveles basales de estradiol.

La edad constituye el primer marcador de cantidad y de calidad de la RO. En los ciclos de FIV se pone de manifiesto claramente la relación directa entre la edad de la mujer y la tasa de embarazo. Se puede obtener una valoración de la RO midiendo directamente productos de las células de la granulosa (Estradiol, AMH, Inhibina B) o mediante el estudio de la capacidad de respuesta ovárica (FSH, Estradiol, tests funcionales). La mayoría de los TRO usados tienen un bajo valor predictivo, lo que los convierte en herramientas de screening.

1.4.1 TESTS PASIVOS DE RESERVA OVÁRICA

HORMONA FOLÍCULOESTIMULANTE (FSH)

Los niveles basales de FSH en día 3 del ciclo, es una medida indirecta del tamaño de la cohorte de folículos, y está regulada por varios factores, incluyendo inhibinas, activinas, estradiol y folistatinas. Es el test más ampliamente utilizado para la evaluación de la respuesta ovárica a la estimulación, en las últimas dos décadas.

La elevación de los valores séricos de FSH se debe a un mecanismo de compensación de la hipófisis ante la depleción folicular y la reducción en la producción hormonal del ovario (estradiol). La calidad de los ovocitos puede también relacionarse con los niveles de FSH. Como algunos investigadores han descritos, altos títulos de FSH se asociaron con un incremento de aneuploidias (Nasseri *et al.*, 1999).

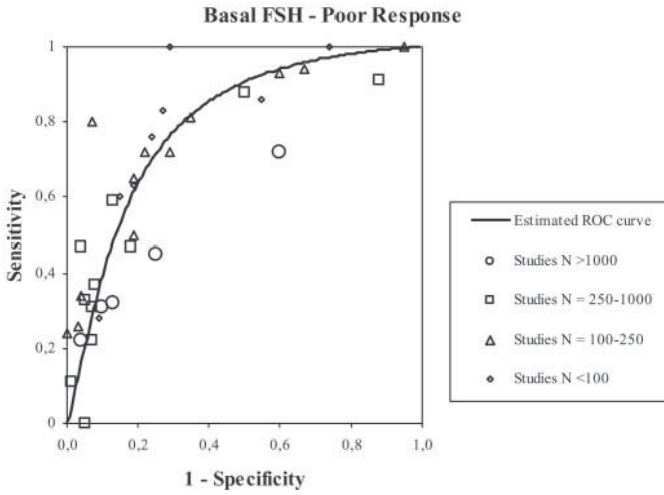
La apropiada fecha de obtención de la FSH es esencial. El test se realiza en el día más 3 del ciclo menstrual, entendiendo el día 1 el primer día de menstruación. Obtener una muestra más allá del tercer día, proporcionará una información menos válida. Los valores de FSH son estables entre los días 2 y 5, y por ello, cualquier medida realizada en esta ventana, proporcionará resultados comparables. Debido a que los quistes funcionales representan una fuente de estradiol endógeno, una ecografía transvaginal para documentar el estado del ovario en el momento de la medida de FSH, será necesaria.

No todos los laboratorios, utilizan el mismo inmunoensayo para medir la FSH, por tanto, estas diferencias deben ser tomadas en consideración cuando se comparan los resultados de distintos estudios. Las fluctuaciones fisiológicas de las gonadotropinas durante el ciclo menstrual, también pueden introducir un grado de error en las medidas. No se ha aceptado un punto de corte universal, válido para

predecir la baja respuesta. Se consideran que mujeres que se someterán a un ciclo FIV, con niveles de FSH el día 3 < 15 mU/ml tendrán dos veces más posibilidades de concebir que mujeres con niveles de FSH entre 15 y 24.9 mU/ml (Scott *et al.*, 1993). Otras series, mostraron un pronunciado declive en las tasas de gestación cuando la FSH era mayor de 20 mU/ml (Muasher *et al.*, 88). Un metanálisis realizado por el equipo de Broekmans, mostró en mujeres con ciclos regulares que la precisión de la FSH para predecir una baja respuesta y bajas posibilidades de concepción, era satisfactoria sólo cuando se utilizaban umbrales altos de FSH. De aquí que la FSH se presenta útil sólo para un pequeño número de mujeres como test de screening y para su asesoramiento (Jirge, 2011). Es conocido que el envejecimiento ovárico empieza varios años antes que cualquier elevación en los niveles de FSH, por lo que un test normal no descartaría una baja respuesta en algunos casos. En general, una historia de FSH basales elevadas, en mujeres menores de 40 años, anticipa un número reducido de ovocitos recuperados durante el ciclo FIV, incluso aunque los valores de FSH en dicho ciclo sean normales. En mujeres mayores de 40 años, niveles de FSH elevados en el tercer día del ciclo, presuponen pero pronóstico. Estas pacientes probablemente tendrán comprometida la respuesta ovárica y dañada la calidad embrionaria en comparación a mujeres con niveles normales, que repercutirán en el bajo número de ovocitos recuperados, el mayor número de cancelaciones y las tasas más bajas de implantación y embarazo (Roberts *et al.*, 2005).

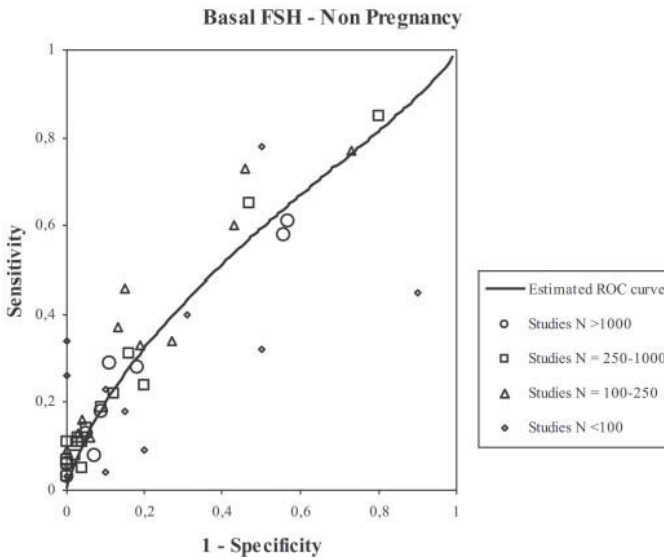
Combinado con otros marcadores, la FSH nos será útil para el asesoramiento de las parejas que vayan a iniciar un tratamiento de FIV, pero no deberá utilizarse para excluir a mujeres con ciclos regulares de un tratamiento de reproducción asistida.

La revisión realizada por Broekmans y su equipo en 2006, muestra curvas ROC estimadas y valores de sensibilidad-especificidad para todos los estudios incluidos, en la valoración de los distintos tests de RO para la predicción de baja respuesta y de no embarazo (gráficas 1 y 2). Los estudios que reportaban valores umbrales diferentes son representados por un número equivalente de puntos de sensibilidad y especificidad. *N* en las leyendas se refiere al número de ciclos estudiados, lo cual en algunos estudios es equivalente al número de parejas tratadas. Mostramos a continuación, y posteriormente para cada TRO, las curvas ROC estimadas para la FSH.



Gráfica 1.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor de la FSH basal en la predicción de la baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).



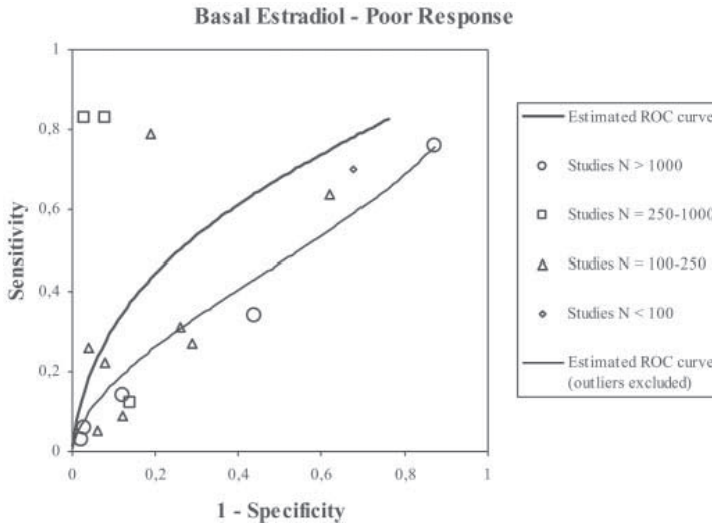
Gráfica 2.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor de la FSH basal en la predicción de no-embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

ESTRADIOL (E2)

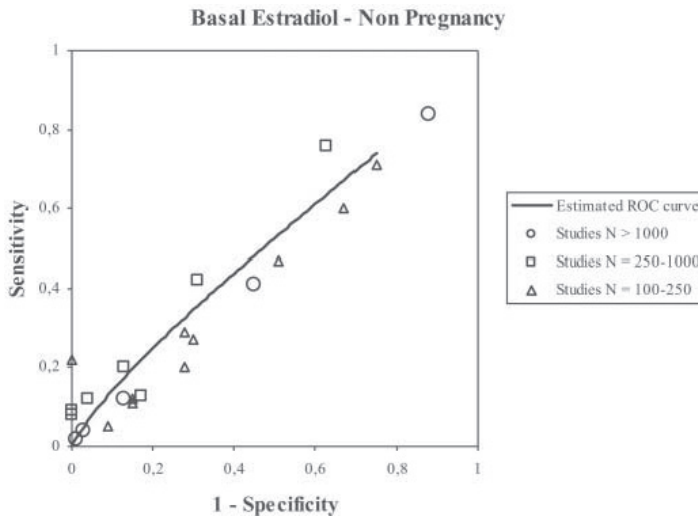
Conforme aumenta la edad de la mujer y disminuye la reserva de folículos, aumenta el nivel de FSH. Al disminuir los folículos, disminuyen las células de la granulosa y sus productos de secreción, La mayor parte del estradiol circulante en la mujer en edad reproductiva está producido por el folículo preovulatorio, por lo que mientras exista desarrollo folicular no se observan diferencias significativas en la mujer de edad reproductiva avanzada con ciclos regulares, respecto a los observados en mujeres más jóvenes. Las modificaciones de los niveles de estradiol basal asociadas a la reducción de la RO se deben al reclutamiento folicular precoz debido al incremento de los niveles interciclo de FSH, que se traducen en una elevación de los niveles de estradiol basal.

Se ha demostrado una correlación inversa entre la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas y los niveles de estradiol. Pacientes que se van a someter a un ciclo FIV con niveles elevados de Estradiol en día 3 (>80 pg/ml), tuvieron mayores tasas de cancelación y menores de concepción, independientemente de los niveles de FSH. Estos datos contrastan con los de estudios previos que no mostraron una clara asociación entre los niveles de estradiol y los resultados de un tratamiento FIV (Scott *et al.*, 1993). El estradiol ha sido analizado en diez estudios diferentes (Broekmans *et al.*, 2006), y se concluyó que presentaba un bajo valor predictivo tanto para predecir baja repuesta como no-embarazo (gráficas 3 y 4). Probablemente la utilidad de la determinación de estradiol basal en el estudio de la RO se reduzca a permitir identificar pacientes con baja RO que presentan acortamiento de la fase folicular del ciclo y niveles de FSH “falsamente” bajos, al estar inhibida su secreción por la presencia de niveles elevados de estradiol.



Gráfica 3.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del E2 basal en la predicción de baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).



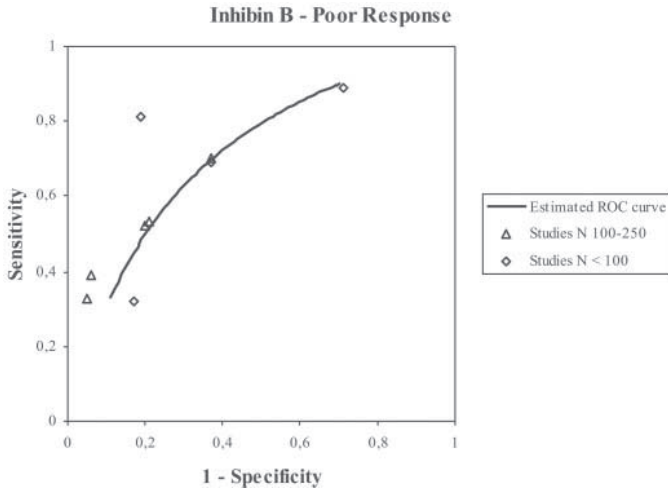
Gráfica 4.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del E2 basal en la predicción de no-embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

INHIBINA B

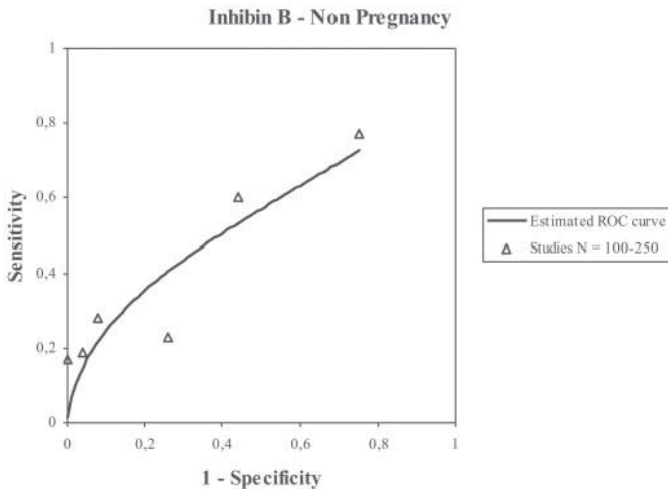
Las inhibinas son glicoproteínas heterodiméricas miembros de la superfamilia de los Transformin-growth factors $-\beta$ (TGF- β). Se componen de una subunidad unida por un puente disulfuro a una de las dos subunidades β (β A y β B), formando la inhibina A y B (respectivamente). El patrón de secreción para estas dos hormonas es distinto a lo largo del ciclo menstrual. Se conoce que la inhibina B es mayormente producida en la fase folicular temprana y media, mientras que la inhibina A es la dominante en la fase folicular tardía y fase lútea (Groome *et al.*, 1994 y 1996). Por ello se consideró la inhibina B más idónea para su uso en endocrinología reproductiva. En el periodo de transición menopáusica se produce una sustancial disminución de los niveles de inhibina B, más precozmente que los cambios en la inhibina A y el estradiol, sugiriendo que esta reducción de la inhibina B es responsable del incremento monotrópico de FSH observado durante el envejecimiento ovárico.

Se encontró concentraciones significativamente reducidas de inhibina B en mujeres mayores de 35 años (Klein *et al.*, 1996). Estos hallazgos fueron ampliados por otros investigadores, que mostraron que niveles de inhibina B en día 3 por debajo de 45 pg/ml, se asociaban con baja respuesta a gonadotropinas, tasas de cancelación mayores, menor número de ovocitos recuperados y tasas de embarazo significativamente reducidas en comparación con aquellas mujeres que presentaban niveles mayores de 45 pg/ml (Seifer *et al.*, 1997). Nueve estudios revisados en 2006, mostraron que la inhibina B como test presentaba una alta tasa de falsos positivos, lo que la hacía inapropiada para excluir pacientes de un tratamiento FIV (gráficas 5 y 6).



Gráfica 5.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor de la inhibina en la predicción de baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).



Gráfica 6.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor de la inhibina en la predicción de no-embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

HORMONA ANTIMÜLLERIANA (HAM)

Su aparición como test de reserva ovárica es relativamente reciente, pero presenta varias ventajas frente a otros métodos. Primero, la HAM aparece como el marcador que más precozmente sufre cambios con la edad de la mujer, por lo que podría identificar una disminución de la reserva ovárica antes que otras técnicas. A diferencia de la FSH, la HAM no necesita ser medida en un día concreto del ciclo. Además, no presenta variabilidad interciclos, ni sus niveles se alteran por el uso de agonistas de la GnRH.

Estudios recientes, sugieren que la HAM se correlaciona mejor con el número de ovocitos recuperados en un ciclo FIV, en comparación con la edad, FSH, LH, inhibina-B y estradiol (Fanchin *et al.*, 2003a; Riggs *et al.*, 2008).

Es el objeto de nuestra tesis, por lo que posteriormente ahondaremos con detalle en sus características.

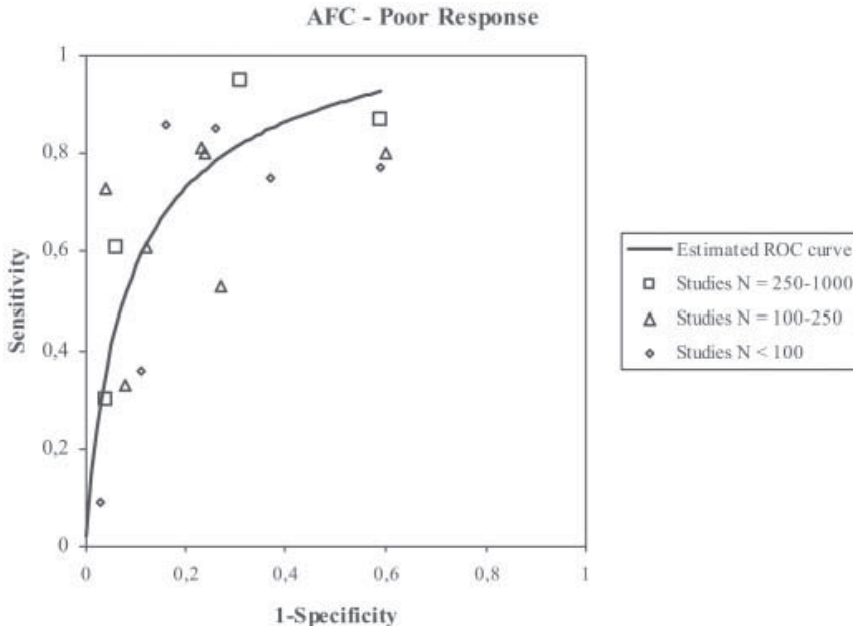
RECUENTO DE FOLÍCULOS ANTRALES

Debido a que la disminución de la reserva ovárica con el tiempo está funcionalmente relacionada con el número de folículos antrales disponibles para el reclutamiento, la exploración ecográfica del ovario por vía vaginal se ha utilizado para la valoración del status gonadal previo y durante un tratamiento de fertilidad.

Los folículos en fase antral se distinguen bien mediante ecografía, su contenido líquido crea una marcada interfase con el tejido sólido ovárico circundante. Diferentes diámetros se han utilizado para definir un folículo antral (2-5 mm y/o 7-10 mm). No existe consenso sobre el tamaño de los folículos antrales que representarían verdaderamente la reserva ovárica. Se ha visto que el número de folículos antrales con tamaño entre 2-5 mm disminuye con la edad y se correlaciona con otros marcadores como la FSH o el test de clomifeno, y aquellos con tamaño entre 7-10 mm permanecen constantes (Jirge, 2011). Por ello, los primeros se presentan para ser más fiables como marcadores de reserva ovárica. El número de folículos antrales con un diámetro de 2-5 mm medidos en el día 1-2 del ciclo (o justo antes de la administración de gonadotropinas) se presentó como predictor de respuesta ovárica y embarazo, siendo un recuento menor de cinco predictor de no embarazo (Chang *et al.*, 1998). Resulta difícil establecer un valor umbral del RFA a partir del cual se pueda predecir una baja respuesta, con gran variabilidad de los puntos de corte

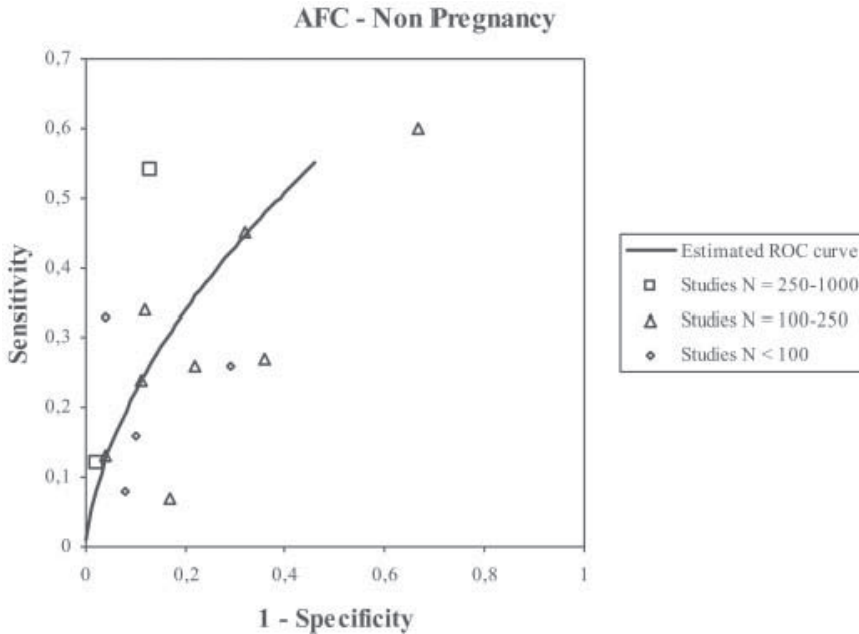
entre los distintos autores. Aunque no existe variación en el RFA a lo largo del ciclo menstrual, la mayoría de autores realizan la valoración en fase folicular precoz, entre el 3-5º día del ciclo.

Problemas relacionados con esta técnica son la variabilidad interobservador y la variación biológica, pero debido a que la habilidad del RFA para predecir una baja respuesta puede ser significativamente mejor que la que tienen FSH, inhibina B y estradiol, el RFA ha sido considerado el test de primera elección por algunos autores (Hendriks *et al.*, 2005; Avril, 2006). Sin embargo, un metanálisis de 15 estudios publicados sobre el RFA, concluyó que la precisión del test en predecir baja respuesta en mujeres con ciclos regulares era satisfactoria sólo con umbrales bajos, y debido al limitado número de tests con resultados anormales, el RFA carecía de sensibilidad y especificidad para predecir un embarazo (Maheshwari *et al.*, 2006; Hendriks *et al.*, 2007). Como anteriormente, presentamos curvas ROC extraídas de la revisión de Broekmans que muestran la sensibilidad y especificidad del RFA para baja respuesta y no embarazo (gráficas 7 y 8).



Gráfica 7.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del RFA en la predicción de la baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).



Gráfica 8.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del RFA en la predicción de no embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

VASCULARIZACIÓN OVÁRICA

Consiste en la evaluación del flujo sanguíneo del estroma ovárico, mediante técnica Doppler. La ecografía Doppler vaginal ha sido extensamente utilizada para la valoración del flujo sanguíneo ovárico tanto en ciclos normales como en ciclos de fecundación in vitro (Chui *et al.*, 1997). Los últimos estudios encontraron una significativa correlación inversa entre la edad y el flujo sanguíneo perifolicular en el día de la administración de la HCG o el día anterior, pero no en días previos (Costello *et al.*, 2006). Incluso, un alto grado de flujo ovárico perifolicular en la fase temprana de un ciclo FIV ha sido asociada con una tasa mayor de embarazos (Sherstha *et al.*, 2006). Cuando esta modalidad de estudio de la imagen se utilizaba en el momento de la recuperación de ovocitos, se observó una tendencia estadísticamente significativa hacia tasas de embarazo más altas cuando la cohorte de embriones a transferir incluía al menos uno

que procediera de un folículo con alto flujo vascular (Robson *et al.*, 2008). Otro estudio encontró que un índice de pulsatilidad bajo en el estroma ovárico, medido durante la inducción de la ovulación, se asociaba con mayores tasas de embarazo (Kim *et al.*, 2002). Sin embargo, un meta-análisis para predecir la capacidad predictiva de esta prueba no pudo ser completado (Broekmans *et al.*, 2006), debido a la heterogeneidad del estudio, destacando las diferencias en el equipamiento y las técnicas de medida. Dado los retos asociados con la evaluación de la vascularización ovárica, unas normas específicas deben desarrollarse, basadas en la disponibilidad de las distintas modalidades de imagen, y recoger los resultados de cada centro.

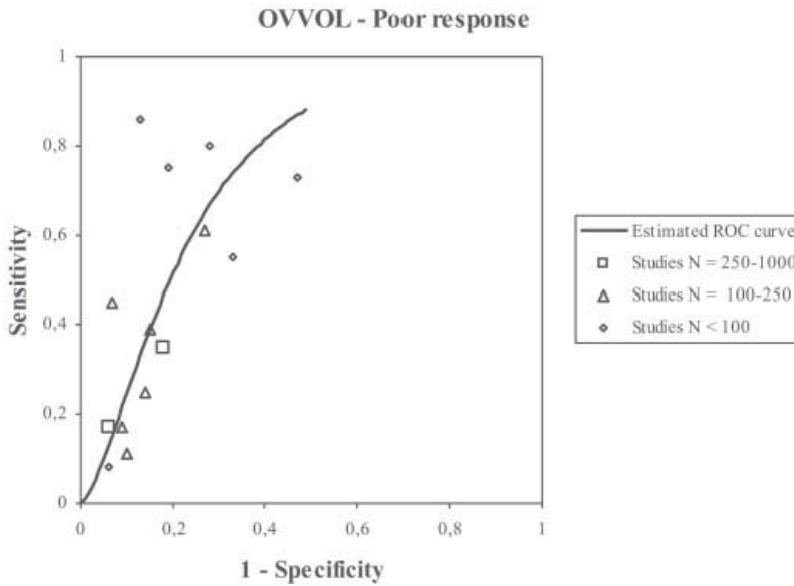
De todas maneras, se puede concluir según el siguiente estudio, que el incremento del flujo sanguíneo ovárico durante su estimulación, no proporciona información adicional al recuento de folículos antrales.

En este caso, la revisión realizada por el equipo de Broekmans no incluyó curvas ROC ya que sólo un estudio presentaba las características necesarias para poder llevar a cabo un metanálisis.

VOLUMEN OVÁRICO

El volumen de los ovarios se miden por ecografía transvaginal aplicando al fórmula para una elipse ($D1 \times D2 \times D3 \times \pi/6$). El volumen de cada ovario se calcula con la medida en tres direcciones del ovario. El volumen de cada ovario se suma para obtener el volumen basal ovárico.

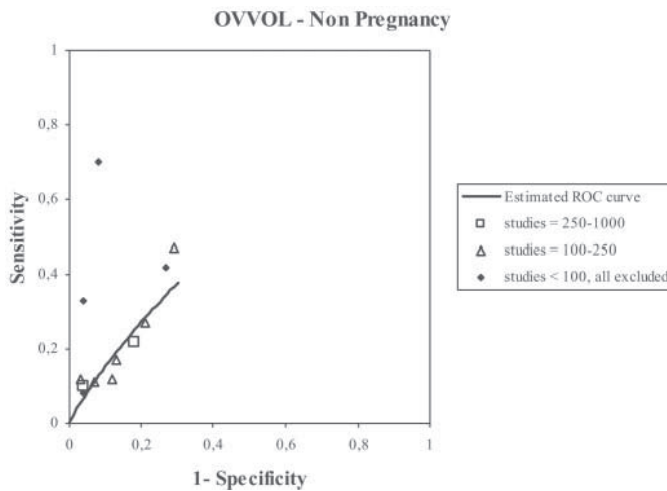
El volumen de los ovarios generalmente disminuye con la edad. Esta relación se apreció objetivando una significativa tendencia a la disminución del volumen ovárico (VO), número de folículos, y vascularización estromal en función de la edad (Kupesic *et al.*, 2003). Este hallazgo apoyaba un estudio anterior que incluía más de 200 casos de FIV, en los que se objetivó que el volumen ovárico era un importante predictor clínico del éxito reproductivo, superior a la FSH o el estradiol basal (Syrop *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque utilizemos un umbral bajo para el VO, cuando se utiliza sólo este parámetro, no presenta un valor de predicción aceptable en relación al no-embarazo, y un meta-análisis concluyó que el VO no era apropiado como test de rutina en el manejo de la reserva ovárica (Broekmans *et al.*, 2006) (gráfica 9 y 10).



Gráfica 9.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del volumen ovárico en la predicción de la baja respuesta.

(extraído de Broekmans, 2006).



Gráfica 10.

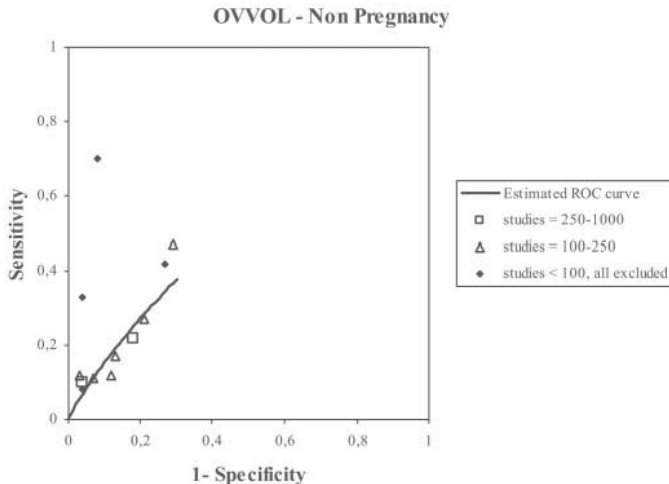
Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del volumen ovárico en la predicción de no embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

1.4.2 TESTS DINÁMICOS DE RESERVA OVÁRICA

Los test dinámicos investigan la capacidad de respuesta ovárica a diferentes estímulos: al citrato de clomifeno, a un análogo agonista de la GnRH (“flare-up”) o a las gonadotropinas exógenas.

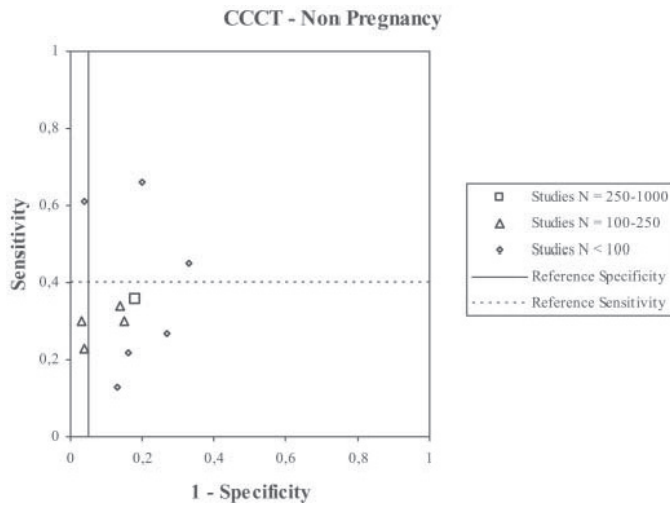
TEST DE CITRATO DE CLOMIFENO (TCC)

En las mujeres normorespondedoras, el CC provoca una mayor secreción hipofisaria de LH que de FSH; sin embargo, cuando la dotación folicular es escasa, la respuesta se invierte y se excreta más FSH. La prueba consiste en administrar 100 mg de citrato de clomifeno desde el 5º al 9º día del ciclo, determinando los niveles basales de FSH en el día 3 del ciclo, y en el día 10 posteriores al tratamiento. Se considera anormal el test si los niveles FSH tras la estimulación son superiores a 10 UI/ml, o si la suma de los valores basales y tras la estimulación son superiores a 25 UI/ml. Sin embargo, un metanálisis concluyó que el poder predictivo de respuesta ovárica y embarazo es bajo, y en cualquier caso no superior a otras pruebas basales como la FSH. Además, el TCC presenta el inconveniente compartido por todos los test dinámicos de ser caros, más invasivos, precisar mayor tiempo y asociar posibles efectos secundarios a las medicaciones (Jirge, 2011) (gráficas 11 y 12).



Gráfica 11.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del TCC en la predicción de la baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).

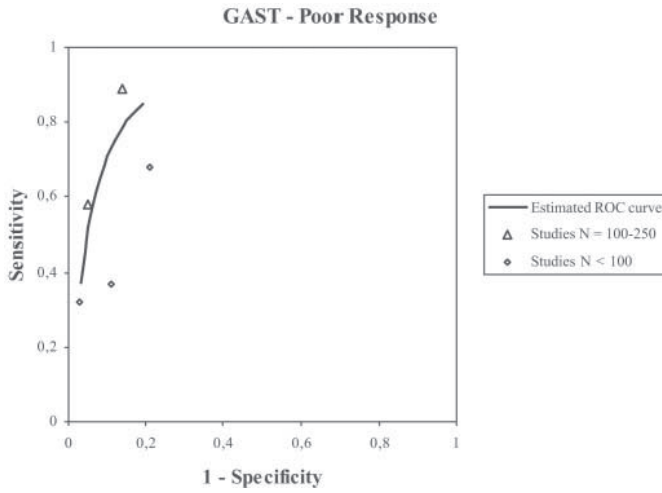


Gráfica 12.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del TCC en la predicción de no embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

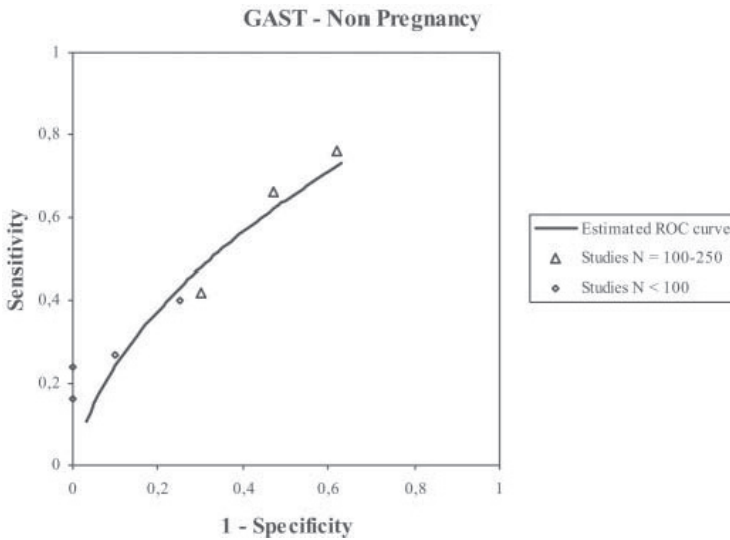
TEST DE ESTIMULACIÓN CON AGONISTAS DE LA GnRH (GAST)

Evalúa los cambios en las concentraciones plasmáticas del estradiol entre el 2º y 3º día el ciclo, tras la administración de un análogo agonista de la GnRH. Un aumento en las concentraciones de estradiol es indicativo de buena reserva ovárica. Su capacidad predictiva en cuanto a la baja respuesta en ciclos de FIV es bastante buena, aunque no mayor a la de la inhibina B o el recuento de folículos antrales (Jirge, 2011), y sin embargo, no lo es en cuanto a la posibilidad de conseguir gestación (gráficas 13 y 14).



Gráfica 13.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del GAST en la predicción de la baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).



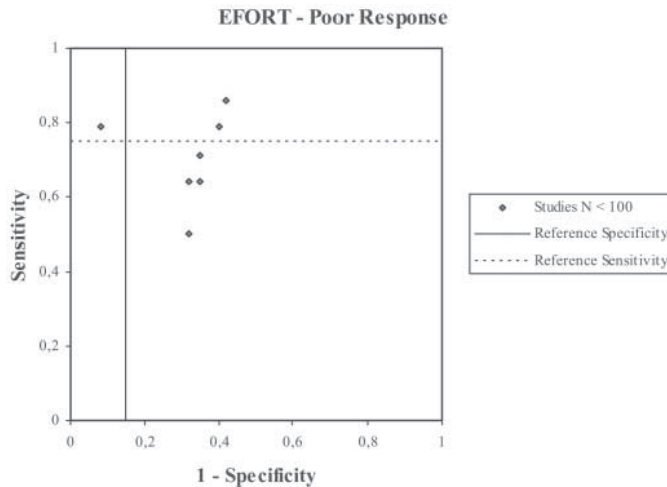
Gráfica 14.

Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad-especificidad para todos los estudios reportados sobre el valor del GAST en la predicción de no embarazo (extraído de Broekmans, 2006).

EFFORT (EXOGENOUS FSH OVARIAN RESERVE TEST)

Consiste en la medida de los niveles séricos basales de FSH y estradiol, seguida por la administración de 300 UI de FSH, en el día 3 del ciclo. A las 24h, se vuelve a evaluar el estradiol en sangre. Si la FSH es inferior a 11 mU/ml, el incremento de estradiol es superior a 30 pg/ml, o ambas cosas a la vez, el test es normal.

Se presentó mejor que el TCC para predecir la alta respuesta, pero inferior en la predicción de la baja respuesta (Kwee *et al.*, 2006). Sólo tres estudios publicados sobre el EFFORT pudieron ser identificados en una revisión sistemática (Broekmans *et al.*, 2006), pero debido a la heterogeneidad de sus resultados no pudieron realizarse curvas ROC (gráfica 15). Su alto ratio de falsos positivos dificulta su uso. Este test consume tiempo, y es raramente usado.



Gráfica 15.

Puntos de sensibilidad-especificidad para los tres estudios reportados sobre el valor del EFFORT en la predicción de la baja respuesta (extraído de Broekmans, 2006).

TEST DE HMG

Consiste en la administración de 150 UI de HMG a partir del 2º ó 3º día del ciclo, durante 5 días, determinando el número de folículos y niveles de estradiol tras la estimulación. En un estudio se observó que la capacidad predictiva de respuesta ovárica de los niveles de estradiol fue superior a la de la FSH basal.

RESPUESTA A GONADOTROPINAS EN UN CICLO PREVIO DE FIV

La posibilidad de revisar los datos de un ciclo FIV previo y preferiblemente reciente, proporciona información valiosa acerca del tratamiento de fertilidad que planificaremos. A diferencia de los niveles séricos basales de distintas hormonas, la ecografía o los test dinámicos tradicionales, la respuesta previa a un régimen específico de gonadotropinas, permite mostrar un mayor rango de información sobre la paciente y su capacidad reproductiva. Incluso una revisión multifactorial sobre tests de reserva ovárica, identificó la respuesta previa a gonadotropinas como el test que proporcionaba la información más precisa del estado del pool de folículos primordiales. Es obvio, que no cada paciente presenta un ciclo previo de estimulación con gonadotropinas.

1.4.3 BIOPSIA OVÁRICA

A nivel anatómico, el potencial reproductivo de una mujer se traduce en el número de folículos primordiales disponible en la corteza ovárica para producir ovocitos viables, en un momento dado. Se ha sugerido que la determinación de la densidad folicular directamente tomando un muestra ovárica es más predictiva que los actuales tests hormonales o ecográficos (Lass *et al.*, 2004). Para estudiar el valor de la biopsia ovárica en el estudio del potencial reproductivo, se han utilizado ovarios extraídos de mujeres en edad reproductiva durante intervenciones no indicadas por patología ovárica. Posteriormente se han analizado microscópicamente. Sin embargo, la distribución folicular no es uniforme en el ovario y por ello la biopsia de una muestra ovárica, no representará la verdadera densidad folicular. Su invasividad y riesgos quirúrgicos asociados, nos hacen desechar esta técnica como método de evaluación de la reserva ovárica.

1.5 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE LA HAM

La HAM es producida por las células de la granulosa de los folículos pre-antrales y antrales y su función fundamental es la inhibición de su desarrollo en las fases iniciales de la foliculogénesis manteniendo su expresión restrictiva hasta que estos alcanzan un estado de desarrollo y madurez capaz de ser seleccionados para la fase de dominancia por efecto de la FSH. En la especie humana esto ocurre cuando los folículos antrales alcanzan un tamaño de 4-6 mm (Bonilla-Musoles *et al.*, 2010c).

Una vez segregada se localiza en líquido folicular y en sangre periférica. Su concentración en suero es un reflejo del pool folicular, por lo que la reducción en la cuantía de folículos pequeños va acompañada de reducción en sangre circulante.

Numerosos investigadores coinciden hoy en considerarla un novedoso marcador de reserva ovárica, respuesta a las gonadotropinas, resultados cuantitativos y cualitativos en RA (Seifer *et al.*, 2002; Van Rooij *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003a y b; Muttukrishna *et al.*, 2004; Eldar-Geva *et al.*, 2005; Hazout *et al.*, 2004; Peñarrubia *et al.*, 2005; Tremellen *et al.*, 2005; Fiçicioglu *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2007 y 2009; Moawad *et al.*, 2009).

La aparición de una baja respuesta a la estimulación con gonadotropinas exógenas supone la existencia de una imposibilidad, una dificultad o una resistencia por parte del ovario a su acción (Peñarrubia *et al.*, 2007). En un primer ciclo pudiera ser una simple fluctuación al azar (en general mujeres jóvenes y con niveles de FSH no elevados) lo que se conoce con el nombre de “regresión media”. Responderán probablemente bien en ciclos subsiguientes. No así en pacientes que no responden de forma permanente.

Éstas son más importantes y ***los mecanismos descritos del fallo serían:***

Trastornos de la angiogénesis ovárica y/o folicular. Se ha postulado una menor capacidad por parte del ovario para desarrollar una adecuada red vascular responsable de la distribución de la FSH circulante o la presencia de una mayor resistencia en los vasos distales. El Doppler color parece sugerir la existencia de una microcirculación anómala alrededor de los folículos dominantes.

También se ha especulado que estas podrían tener una menor capacidad para producir factores angiogénicos locales tipo angiotensina o el VEGF lo que condicionaría un ambiente hipóxico en los folículos o una menor difusión de las gonadotropinas exógenas.

Interferencia en la acción ovárica de la FSH. Se ha planteado la existencia en el suero de proteínas de bajo peso molecular capaces de inhibir la unión de la FSH a su receptor. También se ha purificado en líquido folicular un factor de alto peso molecular que actuaría de idéntica forma. Igualmente se conoce, en cerdas, un polipéptido estructuralmente similar a la Insulin-like growth factor-binding protein-3 que bloquearía la producción de estradiol por las células de la granulosa bajo la acción de la FSH.

Disminución de factores intra-ováricos moduladores de la acción de la FSH. Se habla de la existencia de alteraciones autocrinas-paracrinas intra-ováricas capaces de reducir la producción de ciertos péptidos intra-ováricos que participan en la modulación de la acción de la FSH potenciando su efecto (IGF-1 y 2).

Polimorfismo del receptor de la FSH. Se ha planteado la posibilidad de que polimorfos de un único nucleótido en el gen para el receptor de FSH puedan dar lugar a sutiles modificaciones en la función del receptor que solo se manifestarían en casos de estimulación de este.

Autoinmunidad. Se habla de que algunas mujeres producirían anticuerpos contra los componentes celulares del folículo, inhibiendo el crecimiento de las células de la granulosa o bloqueando el receptor para la FSH.

Habría pues tres grupos de bajas respondedoras:

1. Baja respuesta en jóvenes y con niveles normales de FSH.
2. Añosas con perfil endocrinológico anormal (FSH alta).
3. Jóvenes con perfil endocrinológico anormal.

El estudio de estos casos muestra que la población folicular a ser reclutada está disminuida independientemente de la edad cronológica y del perfil endocrinológico. Es decir que el fundamento fisiopatológico común es una reserva ovárica disminuida

1.5.1 EL CONCEPTO DE EDAD REPRODUCTIVA AVANZADA Y DETERIORO DE LA RESERVA OVÁRICA

La capacidad de respuesta del ovario al estímulo de las gonadotropinas es un reflejo directo del potencial del ovario definido como “su reserva” que está en función del pool de folículos primordiales y primarios existentes.

Datos obtenidos a partir de la Epidemiología, la Clínica y la Biología Reproductiva demuestran que hasta un 10% de la población femenina está en situación de experimentar una reducción acelerada de su potencial reproductivo antes de los 32 años (Peñarrubia *et al.*, 2007) La edad reproductiva ideal está entre los 20 y 24 años y disminuye a partir de los 35 de forma drástica y es crucial recordar que la reducción del número y calidad de los ovocitos remanentes está íntimamente correlacionada.

La causa del deterioro de la calidad ovocitaria con la edad va *unida a anomalías de la meiosis* con el consiguiente incremento de la tasa de aneuploidías. El deterioro se debería a:

- La acumulación de daños en el DNA del ovocito a medida que aumenta la edad.
- La Calidad ovocitaria estaría, en cierto grado, establecida desde la época fetal por ello los mejores ovocitos serían reclutados y ovulados antes, de forma que los de menor calidad constituirían la población residual de las mujeres mayores.
- Los efectos de la edad en la calidad estarían mediados por un *acortamiento de los telómeros que provocaría disrupciones del huso acromático*. Dado que la actividad telomerasa es prácticamente inexistente durante la ovogénesis tardía, la longitud del telómero está predeterminada durante la ovogénesis fetal. Los ovocitos que se ovulan tardíamente serían aquellos que fueron creados tarde durante la ovogénesis fetal.

En resumen, el aspecto más importante de la reserva ovárica es que se trata de una función biológica más que cronológica y que, en consecuencia, el inicio de su declive es muy variable. Con frecuencia existe una discrepancia entre ambas, entre edad cronológica y edad biológica o gonadal (Peñarrubia *et al.*, 2007).

Un reciente estudio (Jonson *et al.*, 2004) ha sugerido la existencia de células germinales pluripotentes capaces de proliferar y de producir nuevos folículos en el ovario post-natal reemplazando a los folículos atrésicos, es decir, contemplando el ovario como si fuera un testículo con capacidad indefinida para producir nuevos ovocitos (Gosden, 2004). Es muy probable que estas células representen las migratorias descritas en la embriología.

1.5.2 PLANTEAMIENTO ACTUAL EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Nos enfrentamos en los últimos años a un retraso en la edad de concebir, y con ello a una disminución progresiva en la reserva ovárica convertida hoy en la principal causa de infertilidad en la mujer.

Se han aducido varios motivos resumibles en:

1. Aumento en el nivel socio-económico.
2. Incorporación de la mujer al mundo laboral.
3. El mayor declive de la fertilidad a partir de los 30 años.
4. El pool de folículos declinaría con la edad aunque de forma muy variable entre mujeres. (Nardo et al., 2008).
5. La diferencia existente entre la edad biológica y la ovárica ya que difiere la cantidad con la calidad de los folículos. A mayor edad, más anomalías genéticas y cromosómicos ovocitarias, pero esta norma no se respeta en todas. (Ebner *et al.*, 2006; Bonilla-Musoles, 2009).

El coste de las medicaciones empleadas con todas las técnicas de RA, el disconfort en las pacientes, el riesgo de complicaciones asociadas a la estimulación y la posibilidad de fracasos previsibles, justifican la necesidad de lograr una información clínica relevante antes de iniciar los tratamientos. (Nardo *et al.*, 2008).

Hoy día, cuando la seguridad y la relación coste/beneficio son la base de las técnicas de RA, no pueden aceptarse muy bajas o muy altas respuestas a la inducción.

Conocemos que el éxito reproductivo tras FIV depende de la edad. Por ello, ésta per se, es un factor predictivo importante que deberá tenerse siempre presente como primer eslabón diagnóstico y pronóstico. La relación entre edad biológica y reserva ovárica puede ser muy variable, ya que ésta está relacionada tanto con la cantidad como con la calidad del pool folicular que persiste.

Durante las dos últimas décadas se han propuesto numerosas hormonas y test como marcadores predictivos del pool restante, destinados a mostrar su aspecto cuantitativo, posible respuesta ovárica y éxito del FIV (Bonilla-Musoles, 2009).

Muchos de ellos tras haber sido empleados en el diagnóstico predictivo de reserva, hoy son historia, sólo aportan un valor relativo a la propia edad de la mujer o su valor predictivo o es muy deficiente o sigue pendiente de demostrar (Broekmans *et al.*, 2006 y 2008).

Hoy sigue siendo preciso identificar dos grupos básicos de mujeres:

- **Aquellas relativamente jóvenes con reserva ya reducida,**
- **Aquellas mayores, por encima de 37 años (más aún de los 40), que aún poseen un potencial de reserva satisfactorio.**

De lograrse esta premisa, podrían individualizarse y optimizarse los tratamientos con pautas distintas de inducción o recurriendo a otras técnicas mucho más eficaces como, la ovodonación, de forma que se obtengan los mejores resultados reproductivos.

El conocimiento, o la medición directa del pool de folículos primordiales y primarios existente son imposibles, pero se ha visto que la determinación de los antrales está relacionada con la cantidad de folículos primordiales que posee. Por ello su medición se considera uno de los aspectos cuantitativos del envejecimiento ovárico.

Faltan marcadores del aspecto cualitativo. El declive de la fertilidad relacionado con la edad no puede ser determinado con un test directo. Sólo midiendo la cantidad puede obtenerse información indirecta respecto de la calidad.

La respuesta a la estimulación en el FIV es otra vía para medir la cantidad. La baja respuesta se considera un signo de disminución de reserva, aunque esta puede estar mediada por otros factores, como obesidad e IMC, o por ciertos polimorfismos del receptor de la FSH (Eldar-Geva *et al.*, 2005).

1.5.3 LA HORMONA ANTIMÚLLERIANA; SU EXPRESIÓN Y FACTORES QUE LA MODULAN

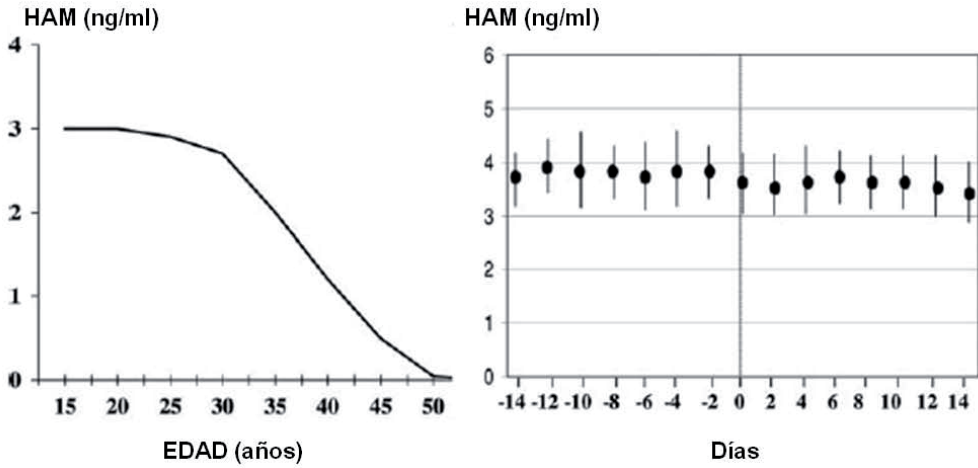
Se trata de una glicoproteína dimérica miembro de la superfamilia de los *transforming growth factor* beta (Moawad *et al.*, 2009) que va ligada a un disulfuro, con un peso molecular de 140 KDa. El gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 19, en la banda 19p 13.3. Tiene una longitud de 2754 bp y está dividido en 5 exones. La parte 3' del exón 5 codifica la parte bioactiva de la molécula.

Su papel más fundamental es en la diferenciación sexual masculina. Se expresa fuertemente en las células de Sertoli desde la semana 8, manteniéndose en altos niveles hasta la pubertad. Induce la regresión de los conductos de Müller encargados del desarrollo de las trompas, útero y parte superior de la vagina.

Se presenta precozmente en ovarios fetales desde la semana 36, expresándose en las células de la granulosa de los folículos.

Es casi indetectable al nacimiento; inicia su incremento entre los 2-4 años y continúa hasta la pubertad tardía. Posteriormente permanece estable mostrando un declive progresivo durante toda la vida reproductiva hasta que empieza la pérdida de la reserva ovárica, reflejando así la disminución del pool folicular.

Es indetectable en menopausia (Moawad *et al.*, 2009; La Marca *et al.*, 2009; Broer *et al.*, 2009). La correlación entre el pool y la HAM es tan estrecha que se la ha propuesto para la predicción de la menopausia (Fanchin *et al.*, 2003b; La Marca y Volpe, 2006b) (Esquema 2).



Esquema 2

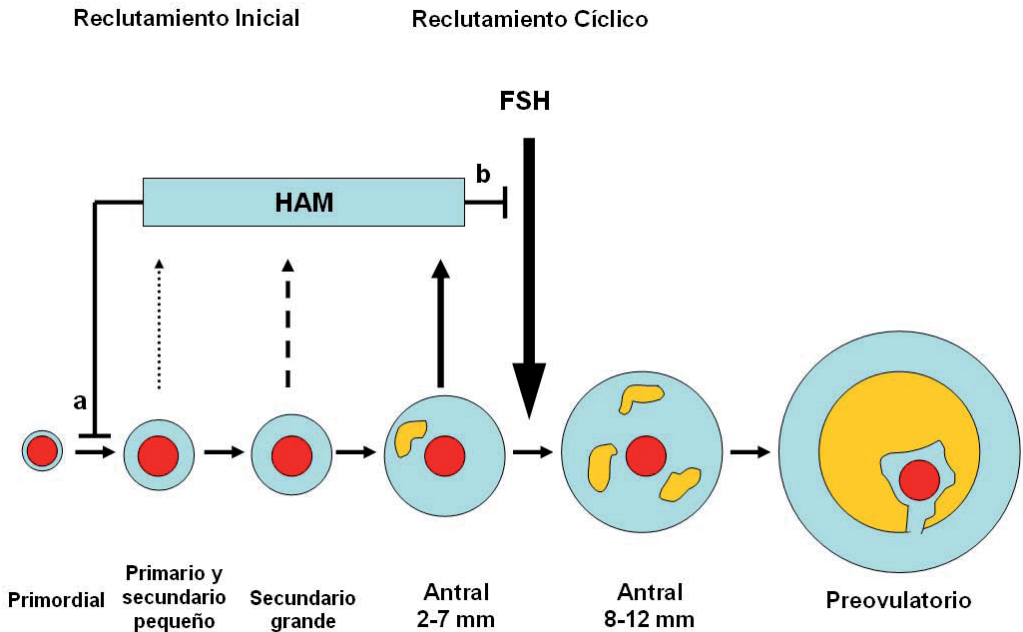
A la **izquierda** niveles medios de HAM en suero a lo largo de la vida. A la **derecha** valores de HAM en el ciclo menstrual. Se ha reportado valores indetectables de HAM después de la menopausia. A la **derecha** patrón circulatorio de HAM en una mujer joven y sana. Los valores de HAM se muestran estables a lo largo del ciclo. Día 0=día del pico de la LH. (Modificado de La Marca, 2010b; La Marca, 2006a).

Los valores circulantes son solo la expresión de su origen ovárico, y ya son indetectables a los 3-5 días de una anexectomía bilateral (La Marca *et al.*, 2010b).

No se altera durante el ciclo (La Marca *et al.*, 2006a), el embarazo, la supresión hipofisaria con agonistas de la GnRH o el uso de anovuladores, como acontece con la FSH, Inhibina B, estrógenos, etc (Broekmans *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2010a) indicando que la actividad ovárica FSH independiente no cíclica persiste incluso cuando se suprime la secreción pituitaria de hormonas.

Las células de la granulosa de los folículos primordiales no la expresan pero sí la de los primarios y los antrales hasta un tamaño < 6 mm.

El 75% de los folículos secundarios la expresan, pero la máxima expresión se localiza en los folículos preantrales y antrales pequeños mencionados. En folículos mayores la HAM está producida sobretodo en las células cercanas al ovocito y en algunas de las células que rodean el antro (Esquema 3).



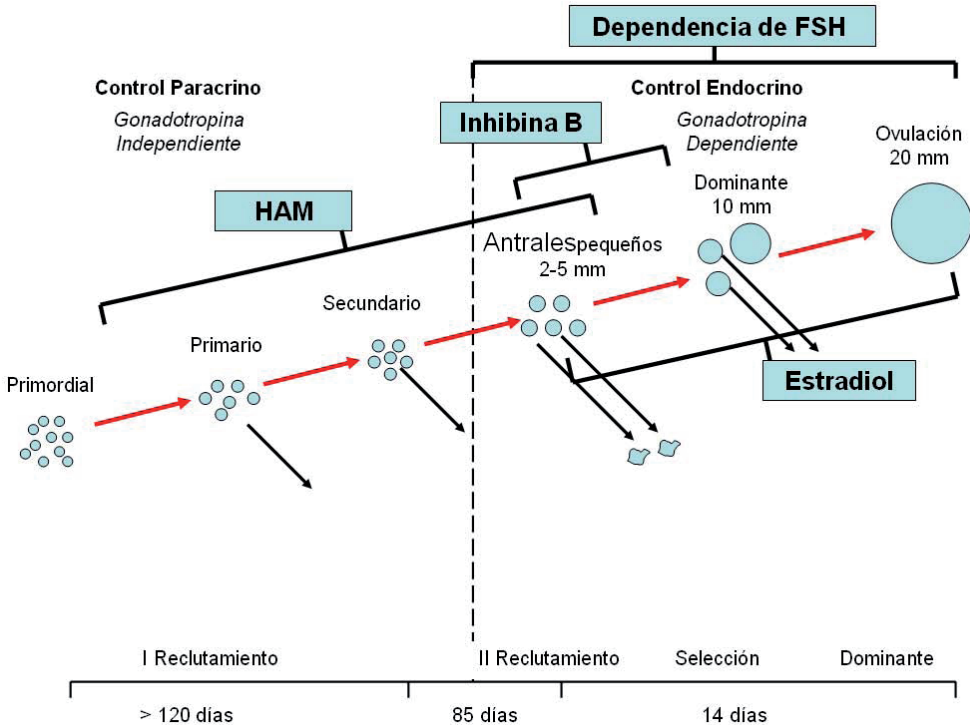
Esquema 3

Función de la HAM en los dos compartimentos principales del desarrollo folicular. En rojo el ovocito. En azul la granulosa. En amarillo el líquido folicular. La HAM se expresa en folículos primarios pequeños y grandes (flecha entrecortada) y en antrales pequeños (flecha entera), siendo estos los que contribuyen básicamente a sus valores séricos. El reclutamiento inicial tiene lugar como un proceso continuo, mientras el reclutamiento cíclico está conducido por un aumento en los niveles séricos de FSH al final del ciclo menstrual previo. Los efectos inhibitorios del HAM se muestran (a) en el reclutamiento inicial de folículos primarios del pool de folículos primordiales restantes y (b) sobre la sensibilidad de los folículos antrales a la FSH (Modificado de Broekmans, 2008).

Recientemente se ha demostrado que los ovocitos de los folículos preantrales tempranos, tardíos y preovulatorios estimulan los niveles HAM mRNA en las células de la granulosa de forma que depende del grado de desarrollo del ovocito. Estos hallazgos sugieren que la regulación de la expresión de los genes de las células de la granulosa por parte del ovocito ocurre durante amplios periodos del desarrollo folicular y que la regulación ovocitaria de la expresión del HAM juega un papel en la coordinación intra e interfolicular del desarrollo de los folículos.

Continúa siendo expresada en los folículos en crecimiento hasta que estos alcanzan el tamaño y estado de diferenciación (los 6 mm antes mencionados) cuando son seleccionados para la dominancia folicular por la acción de la FSH. No se expresa en folículos atrésicos ni en las células tecales (Weenen *et al.*, 2004).

El efecto inhibitorio de la HAM sobre la sensibilidad folicular a la FSH probablemente juega un papel fundamental en el proceso de la selección folicular (Esquema 4).



Esquema 4

Expresión de la HAM durante toda la foliculogénesis y su relación con la FSH, inhibina B y estradiol. Al contrario de otros marcadores esta refleja el número de folículos primordiales y en desarrollo inicial. FSH, E₂, e Inhibina están conectadas por feedbacks negativos. Por ello solo son un reflejo indirecto del número de folículos antrales.

En ausencia de HAM (ratas carentes) los folículos primordiales son reclutados precoz y más rápidamente conduciendo a su rapidísimo agotamiento.

La reproducibilidad inter-cíclica de las mediciones de HAM ha mostrado ser más fiable que la FSH, Inhibina y recuento de folículos antrales (Van Rooij *et al.*, 2005; Fanchin *et al.*, 2005a).

Indudablemente, los niveles de HAM sérica se correlacionan con el conteo de folículos antrales y por esto resulta ser un poderoso predictor de la respuesta ovárica a la estimulación con FSH exógena (de Vet *et al.*, 2002; Fişciouglu *et al.*, 2006; Van Rooij *et al.*, 2002).

Los mecanismos reguladores de la expresión de la HAM ovárica aún son desconocidos, pero la expresión del receptor de la HAM en las células de la granulosa sugiere que juegan un papel en la fisiología ovárica.

1.5.4 LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA. SUS RECEPTORES.

Ejerce sus efectos biológicos a través de un sistema heteromérico de receptores transmembrana consistentes en receptores serina/ treonina kinasa ligados a membrana simple, llamados tipo I y tipo II. El tipo II llamado HAM RII comparte especificidad de ligandos y el tipo I regula señales inhibitorias cuando es activado por el tipo II. Estos receptores se expresan en los órganos diana para la HAM: las gónadas y las células mesenquimales adyacentes a los conductos de Müller.

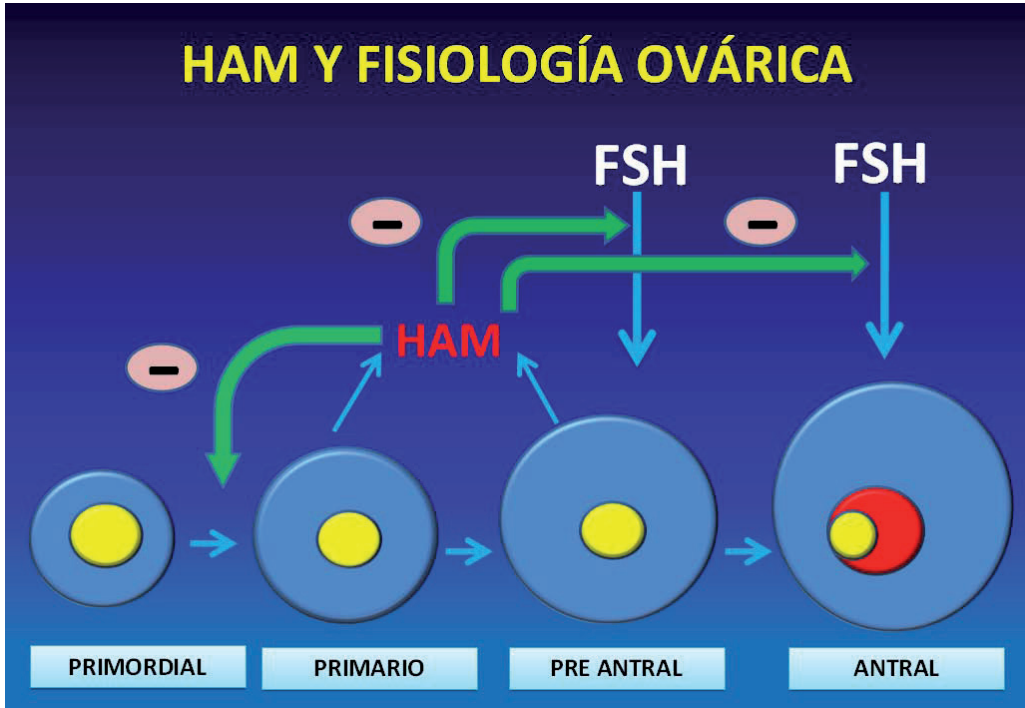
El gen humano para el HAM RII se localiza en el cromosoma 12 y está formado por once exones, distribuidos en 8 pares de kilobases.

Se localiza en el mesénquima alrededor de estos conductos y el anillo urogenital tanto del hombre como de la mujer. La pérdida de la función en el receptor tipo II, así como en los ligandos HAM causan la persistencia de los conductos Müllermanos. No está clara la identidad de los receptores tipo I, especialmente en las gónadas, se han descrito ya tres receptores (ALK2, ALK.y ALK6).

1.5.5 EL PAPEL DE LA HAM EN LA FISIOLOGÍA DEL OVARIO

La activación de los folículos primordiales y su desarrollo están regulados tanto por factores internos positivos como negativos.

Esta hormona actúa como un regulador negativo de los estadios iniciales del desarrollo folicular (Esquema 5)



Esquema 5

La HAM inhibe el desarrollo desde folículos primordiales hasta los pre antrales de pequeño tamaño (< 6mm) (Modificado de Durlinger, 2002).

Es capaz también de inhibir al folículo en crecimiento FSH dependiente. Este efecto es el resultado de una reducción en la proliferación de células de la granulosa y concuerda con estudios in Vitro que mostraron que la administración exógena de HAM reduce la expresión de aromatasa y el número de receptores LH en cultivos de células de granulosa.

En base a estas observaciones, se ha sugerido que la HAM sería uno de los factores involucrados en la respuesta de los folículos ováricos a la FSH durante el reclutamiento ovárico (Esquema 5).

Algunos estudios han mostrado que es capaz de bloquear la proliferación de las células granulosa-luteinizadas humanas in vivo. Además la concentración en el líquido folicular es inversamente proporcional a los índices mitóticos de las células de la granulosa in vivo. Esto sugiere que existiría un rol autocrino de la HAM sobre la maduración de los folículos.

Muy recientes investigaciones en primates (Thomas, 2009) empleando antagonistas de la GnRH y del VEGF (vascular endotelial growth factor) han mostrado que esta hormona probablemente actuaría a través de este factor vascular o bien que ambos estarían interconectados.

Cuando se han estudiado ratas homocigóticas sin actividad HAM se ha observado que disponen de más folículos preantrales y antrales pequeños en crecimiento y su pool de folículos primordiales se agota mucho antes. Los heterocigóticos disponen de una reserva intermedia.

1.5.6 CRITERIOS DE BAJA RESPUESTA:

Entre un 2 y un 30% de las mujeres que se inducen resultan en una baja respuesta.

El porcentaje entre la población varía con la edad (mayor en mujeres de más edad), con la definición de baja respondedora aceptada en el grupo a tratar y con la patología preexistente (endometriosis, cirugías, etc.)

Existen numerosos criterios de baja respuesta. Señalamos los que hoy día se consideran realmente de interés clínico (Bonilla-Musoles *et al.*, 2010a; Broer *et al.*, 2009):

1. La cancelación de ciclos de inducción previos por baja respuesta.
2. Un número de folículos dominantes el día de administración de la HCG o de la punción limitado. Se estima entre <3 y <6 entre ambos ovarios.
3. Número de ovocitos recuperados el día de la punción. La literatura varía entre menos de <3 y <7. Es uno de los criterios más empleados (La Marca *et al.*, 2010b).
4. Dos o varios de estos criterios.

Se emplee el criterio que se emplee estas pacientes tienen definitivamente menos índices de gestaciones que mujeres de idéntica edad normo respondedoras.

1.5.7 EFICACIA EN LA PREDICCIÓN DE LA BAJA RESPUESTA

Una predicción de la baja o nula respuesta tendría un enorme impacto clínico ya que permitiría:

Aconsejar el tratamiento en aquellas mujeres con alto riesgo de cancelación, baja o nula respuesta (Fleming *et al.*, 2006). Disponer de medios para la correcta información de riesgos/beneficio del tratamiento.

Optimizar las estrategias de inducción empleando regímenes apropiados. Ajustar dosis de FSH independientes de edad y del IMC (Nelson *et al.*, 2007 y 2009; Gnoth *et al.*, 2008).

Contribuiría a disminuir el número de cancelaciones.

Evitaría riesgos quirúrgicos.

Jugaría un papel central en mujeres jóvenes bajas respondedoras.

Jugaría un papel central en ovodonadoras con buena respuesta y mala calidad ovocitaria.

En mujeres de edad avanzada ayudaría a identificar aquellas que sí dispondrían oportunidades si se demostrara que es de esperar una respuesta normal a la inducción (La Marca *et al.*, 2010b).

Eliminaría costes innecesarios al sistema sanitario.

Eliminaría el estrés psicológico resultante de la ansiedad en la esperanza de concebir y del fracaso subsiguiente así como desagradables reacciones con el médico.

Entre todos los marcadores del estatus folicular (edad, FSH basal, inhibina B, RFA, volumen ovárico, test dinámicos y realización de un FIV-TE), hoy se le concede el máximo interés debido a su fiabilidad y seguridad como predictor reproductivo de la reserva y éxito del FIV. Una de sus mayores ventajas con respecto a hormonas y test dinámicos sería la ausencia de cambios cíclicos. Sin embargo ésta, ha sido puesta en duda por algunos autores (Hadlow *et al.*, 2013).

Lamentablemente, y esto es importantísimo, el valor predictivo de la HAM en la baja respondedora no es absoluto, tiene falsos positivos y negativos (Fanchin *et al.*, 2003a; Broekmans *et al.*, 2006). Especialmente los casos de falsa positividad pueden tener consecuencias muy negativas para la pareja ya que pueden llevar a una información incorrecta para iniciar una FIV. Además es bien conocido que casos de baja respuesta logran quedar gestantes (Klinkert *et al.*, 2004; Van der Gaast *et al.*, 2006) en particular las mujeres jóvenes (Lashen *et al.*, 1999; Ulug *et al.*, 2003).

¿Qué significan valores de HAM bajos antes de la FIV?

Que es muy probable que el ciclo sea cancelado, que se produzca una muy baja respuesta con resultados de no transferencia o con índices de éxito muy reducidos.

Se trata de un grupo de pacientes de muy difícil manejo pues se conoce existe entre un 10 y un 20% de casos de falsa positividad, es decir la HAM no debería emplearse para excluir casos de FIV (Satwik *et al.*, 2012).

Cuando se ha pretendido emplear con el fin de intentar no recurrir a procedimientos de RA se han usado valores de corte para identificar a este grupo entre 0,70 y 0,75 ng/ml, que clasifican, con una sensibilidad del 75% las bajas respondedores, sin embargo la prevalencia de mujeres jóvenes con estos valores o inferiores y que pueden responder no es despreciable (15%).

Por ello se ha propuesto que solo sean rechazadas aquellas mujeres con valores inferiores a 0,1-0,35 ng/ml (Muttukrihna *et al.*, 2005; Lekamge *et al.*, 2007). Por supuesto un límite de corte realmente bajísimo.

Cuando se ha pretendido emplear con el fin de individualizar el tratamiento no se ha demostrado beneficio alguno. El empleo de muy altas dosis de gonadotrofinas solas, con agonistas o antagonistas está en plena discusión (Popovic-Todorovic *et al.*, 2003; Klinkert *et al.*, 2005).

¿Qué significan valores normales de HAM antes de la FIV?

Podría anticiparse que probablemente serán normo respondedoras con buen pronóstico. Incluso podrían proponerse protocolos de inducción con dosis bajas de gonadotrofinas.

¿Qué significan valores altos de HAM antes de la FIV?

Probablemente son pacientes con riesgo de alta respuesta y SHO. Deberían ser informadas.

Sin duda son los casos que se beneficiarán de protocolos individualizados de tratamiento (empleo de bajas dosis de FSH y antagonistas). Además se beneficiarán de uso de agonistas para desencadenar el pico de la LH que prácticamente elimina el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).

Valores de referencia

Es escasa la literatura que muestra valores límite de HAM que separen mujeres de buen y mal pronóstico. Serían de desear no curvas ROC, como las que aportan, sino valores cuantificados y éxito correspondiente. Sería de desear, igualmente, valores

de referencia en idénticas unidades (emplean pmol/L; ng/mL; ugr/L; etc). Podemos calcular la unidades de ng/ml a pmol/l, multiplicando el valor por 7.14.

Ejemplos:

- Una media cuyo límite es 2,7 ng/mL (Silberstein *et al.*, 2006).
- Un límite de 18 pmol/l (2,54 ng/mL) para predecir el embarazo.
- Un límite de 4,9 pmol/L (0,69 ng/mL) discriminaría entre ciclos que se cancelan y evolucionan (Peñarrubia *et al.*, 2005; Broer *et al.*, 2009).
- Un límite de 8,1 pmol/L (1,13 ng/mL) predeciría la baja respuesta en un ciclo FIV siguiente con una sensibilidad del 80% y especificidad del 85% (Tremellen *et al.*, 2005).
- Un límite de 2 ng/ml (14.20 pmol/l) tendría un valor predictivo de baja respuesta con una sensibilidad del 87% y especificidad del 64% (Muttukrishna *et al.*, 2005).
- Teniendo en cuenta que las formas extremas de respuesta ovárica, baja e hiperestimulación, se asocian con una calidad ovocitaria mala, se decidió dividir a las pacientes empleando el percentil 25 (1,65 ng/mL) y el 75 (4,54 ng/mL) para identificar la cohorte normal (1,66 – 4,62 ng/mL) (Ebner *et al.*, 2006) (tabla 1).

	Grupo 1 HAM < 1.66	Grupo 2 HAM 1.66-4.52	Grupo 3 HAM >4.52
Edad (años)	34.8 ± 3.7*	32.0 ± 4.6**	30.5 ± 4.4
Esterilidad (años)	6.0 ± 5.2***	3.35 ± 2.5	3.4 ± 2.3
N. Ciclos	2.2 ± 1.8	1.9 ± 1.3	2.0 ± 1.5
FSH (UI/ml)	10.5 ± 3.8****	7.7 ± 2.1	6.9 ± 2.0
LH (UI/ml)	5.7 ± 2.6	5.8 ± 2.5	5.8 ± 2.9
Dosis (UI)	2396 ± 790****	1712 ± 623**	1449 ± 439
Duración (días)	9.6 ± 1.8	9.7 ± 1.7	10.3 ± 2.4
Endometrio (mm)	9.9 ± 1.3	10.2 ± 1.9	10.2 ± 1.8
E ₂ (pg/ml)	802.6 ± 377.8*****	1279.5 ± 630.9**	1728.8 ± 912.2
N. Ovocitos	4.6 ± 3.1****	9.1 ± 5.1*****	12.9 ± 5.7
N. Ovocitos Metafase II	4.0 ± 2.8****	7.4 ± 4.1**	10.4 ± 5.1

Tabla 1

*Comparación de datos demográficos y detalles de la estimulación ovárica controlada (HOC) con respecto a valores basales de HAM. Valores de media ± desviación estándar HAM ng/ml; estradiol (E₂) el día de la ovulación. FSH y LH el día +3; *P<0.05 versus*

*grupo 2 y **P < 0.001 versus grupo 3; ***P < 0.05 versus otros grupos; ****P < 0.001 versus otros grupos; *****P < 0.001 versus grupo 3. (Modificado de Ebner 2006)*

Todo ello es trascendental pues estudios prospectivos en grupos de pacientes seguidas entre 1 y 7 años mostró que el recuento de folículos antrales (RFA), el nivel de FSH y el de inhibina B no variaron mientras que la HAM disminuyó un 38% (Van Rooij *et al.*, 2004).

Estos resultados coinciden con recientes investigaciones en las que la HAM ha sido determinada para estimar su valor en función de la edad (La Marca y Volpe, 2006b). Se observó una buena correlación entre edad en la menopausia y declive de esta hormona, apoyando la hipótesis de que esta predice el comienzo de la menopausia.

Puede concluirse que, comparado con otros marcadores, refleja mejor el declive continuo del pool con la edad (Van Rooij *et al.*, 2004). Este declive está ya presente, unos trece años, antes de que aparezcan los cambios clínicos.

En un estudio multicéntrico publicado el 2011 (Almog *et al.*, 2011), encontramos normogramas que muestran la correlación entre la edad y los diferentes percentiles de HAM en mujeres infértiles sin ovarios poliquisticos. Estos normogramas pueden proporcionar una referencia al clínico para el manejo de estas pacientes. Sin embargo, concluyen que futuras validaciones con estudios longitudinales son necesarias.

Eficacia de respuesta a la inducción

La primera publicación como marcador de respuesta ovárica a las gonadotropinas data del año 2002 (Seifer *et al.*, 2002) y mostró que valores altos se asociaban con una superior captación de ovocitos.

Esto ha sido confirmado en estudios prospectivos y retrospectivos (Van Rooij *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003a; Peñarrubia *et al.*, 2005; Fişcioglu *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2009; Nardo *et al.*, 2008; Broer *et al.*, 2009).

La misma literatura muestra que es superior en la predicción de la respuesta ovárica a la edad, FSH, estradiol e inhibina, mientras que sería semejante al RFA (Barad *et al.*, 2009). Incluso se afirma, con razón, que ésta es un marcador directo de la reserva ovárica, mientras que el resto de hormonas lo son indirectas (Fleming *et al.*, 2006).

Un metaanálisis sobre 13 publicaciones (Broer *et al.*, 2009) señaló que la sensibilidad diagnóstica para el conjunto de marcadores varía entre el 40% y el 91%

y la especificidad entre el 64% y 48%, pero no hubo diferencias evidentes de que fuera mejor predictor que el RFA, aunque sí, con el resto de marcadores.

La HAM tendría la ventaja de no mostrar variaciones cíclicas, por ello considera debería determinarse en todos los ciclos previamente al inicio de la estimulación.

Un reciente trabajo (Fanchin *et al.*, 2007) ha estudiado las concentraciones en líquido folicular en casos de FIV. Comparando las determinaciones con las tasas de implantación, transfiriendo solo un preembrión y con los resultados de embarazos clínicos se observó una mayor tasa a mayores concentraciones

Eficacia como predictora de la FIV

Los niveles de HAM disminuyen gradualmente durante la administración de FSH en la hiperestimulación, debido al feed-back negativo de esta segunda sobre la primera (Muttukrishna *et al.*, 2005).

Esta reducción también puede ser explicada por el aumento supra-hipofisario de los niveles de estradiol. Este último ha sido implicado como un regulador negativo tanto de la HAM como del HAM RII mRNA. Más aún, la disminución del HAM en mujeres tratadas con FSH puede ser el resultado del crecimiento folicular inducido por ésta, haciendo así que estos folículos pierdan su expresión de HAM.

Durante la estimulación los niveles de HAM se correlacionan positivamente con el número de folículos antrales pequeños, pero no de los grandes, y con los valores de inhibina B. Estos niveles disminuyen gradualmente durante la hiperestimulación, probablemente reflejando la reducción dramática en el número de folículos antrales pequeños confirmando así la escasa expresión de la HAM cuando los folículos son grandes. Parece pues (Fleming *et al.*, 2006) que no deben determinarse sus valores durante la estimulación.

Estudios prospectivos en mujeres sometidas a FIV comparando hormonas, folículos antrales, ovocitos recuperados y éxito gestacional han mostrado que los ovarios de las pacientes normo respondedoras con HAM alta tenían un número de folículos antrales significativamente mayor, y que los valores séricos de HAM se correlacionaban con folículos antrales, folículos recuperados, edad, inhibina B y FSH (Muttukrishna *et al.*, 2005).

Estos resultados hacen suponer que su determinación en mujeres normales permitiría, aunque se desconoce el tiempo, conocer el pronóstico reproductivo para años posteriores, lo cual sería de enorme interés en la situación actual de la prolongación de la edad para la primera gestación.

Igualmente los valores de HAM fueron predictivos en el éxito del FIV, mucho más que la edad, la FSH, la inhibina B o el estradiol (Singer *et al.*, 2009).

Estudios retrospectivos han mostrado que valores de HAM de 1,1 pmol/L se asociaron con fallo total de FIV. Lamentablemente estos valores son demasiado bajos.

Estos hallazgos se han confirmado en estudios prospectivos. Usando un índice de corte de 1,13 ng/ml, la HAM predijo la reserva con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85% (Tremellen *et al.*, 2005).

Se ha observado que los valores de HAM fueron 10 veces inferiores en ciclos cancelados.

Semejante cosa ocurre con los datos referentes a índices de gestaciones en la FIV.

Varios trabajos han intentado hallar un valor de corte que permitiera diferenciar aquellas con posibilidad/imposibilidad de gestación (Hazout *et al.*, 2004; Eldar-Geva *et al.*, 2005; Kwee *et al.*, 2008; Elgindy *et al.*, 2008).

Un grupo de 165 mujeres no seleccionadas sometidas por primera vez a FIV fueron divididas en 3 grupos según valores séricos, edad, IMC, FSH y RFA. (Nardo *et al.*, 2008) (Tabla 2).

	Baja respuesta (n = 15)	Respuesta normal (n = 134)	Alta Respuesta (n = 16)	P
Edad (años)	35.6 ± 1.8	32.3 ± 3.9	31.1 ± 3.2	.0005
IMC (kg/m ²)	24.7 ± 3.6	23.9 ± 3.3	24.3 ± 2.8	NS
FSH (UI/ml)	9.4 ± 4.3	7.7 ± 2.0	6.9 ± 1.5	.011
HAM (ng/ml)	0.91 ± 0.55	3.04 ± 2.06	5.56 ± 2.85	<.0001
RFA (n)	5.4 ± 3.2	12.5 ± 6.7	16.4 ± 7.4	<.0001

Tabla 2

Demografía de las pacientes, valores basales de FSH, HAM, y RFA. Los valores están representados ± SD. NS = No significativo; RFA = Recuento de folículos antrales.

(Modificada de Nardo, 2008)

Se observó una correlación significativa en casos con concentraciones extremas llegando a afirmarse que sería plausible que en un futuro próximo tanto la FSH, LH, Estradiol basal, pudieran ser reemplazados por esta determinación. Hay autores que ya la recomendaron en su momento (Fleming *et al.*, 2006).

Un límite de corte de 1,0 ng/ml tendría una sensibilidad del 87 % y una

especificidad del 67% para baja respuesta. La combinación de baja concentración sérica y baja respuesta al FIV reflejaría sin duda un mal pronóstico.

A pesar de su extraordinario interés está por definir el umbral mínimo que debe ser aceptado para considerar baja respuesta y no tener que recurrir a FIV-TE. Una reciente publicación (Raine-Flenning *et al.*, 2008) muestra que induciendo a pacientes por bajo de estos umbrales existe un índice de cancelaciones muy alto, casi del 20%, en otro 20% no se obtuvieron embriones para transferir, pero en aquellas transferidas aún se lograron un 35% de embarazos.

Sin embargo, la opinión mayoritaria cree que no es posible establecerlo (Van Rooij *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003a; Peñarrubia *et al.*, 2005; Fiçicioglu *et al.*, 2006; Ebner *et al.*, 2006; Kwee *et al.*, 2007; Smeenk *et al.*, 2007). La respuesta no fue la esperada, pues tanto la HAM como el RFA, solo valoran el pool de folículos sensibles a la FSH que queda.

Estas investigaciones muestran, y con mucha lógica, que los resultados dependen de numerosos otros parámetros, muchos de ellos sin relación directa con la HAM. Así:

- El RFA precisa de ecografistas avezados así como disponer de ecógrafos de alta resolución. Entrarían aquí las nuevas tecnologías 3D-4D por nosotros empleadas y apenas difundidas (Bonilla-Musoles *et al.*, 2009).
- Sin embargo, y en pro de la situación actual, se ha observado que el RFA realizado al inicio del ciclo por varios ecografistas, tiene escasa variabilidad inter-observadores, lo mismo que cuando se ha realizado en varios ciclos consecutivos (Kwee *et al.*, 2007).
- Otros factores pronósticos fundamentales sin relación con la HAM son la calidad embrionaria, la técnica de la transferencia, la receptividad endometrial, etc. (Boomsma y Macklon, 2006).

Por ello se ha llegado a proponer (Eldar-Geva *et al.*, 2005) que solo conociendo la respuesta tras varios ciclos consecutivos de estimulación podría sospecharse la capacidad real reproductiva. Sin duda esta aseveración sería de un coste económico inaceptable.

Numerosos investigadores proponen últimamente combinar mediante diversas variables, varios de estos marcadores (FSH, HAM, E2, inhibina, RFA y edad) lo que proporcionaría una sensibilidad del 87% y una especificidad del 80%

para baja respuesta. Todas estas variables en realidad complican más que ayudan (Muttukrishna *et al.*, 2005)

Existe un trabajo que la relaciona con la natalidad (Nelson *et al.*, 2009) y que describe un dramático aumento a medida que los valores fueron mayores.

En tanto en cuanto, no se dispongan de valores de referencia internacionalmente aceptados, proponemos emplear los siguientes (tabla 3).

CATEGORIA PREDICTIVA	VALORES
RESPUESTA NULA	< 1 pmol/L
RESPUESTA REDUCIDA	≥ 1 y < 5 pmol/L
RESPUESTA NORMAL	≥ 5 y < 15 pmol/L
ALTA RESPUESTA	≥ 15 pmol/L

Tabla 3

Valores de referencia según categoría predictiva.

Eficacia como predictora de la baja respuesta

Numerosos autores han investigado su utilidad en la predicción de la baja respuesta (tabla 4)

Autor	n	Diseño	Corte	S%	Esp%	Baja Resp.
Van Rooij et al. (2002)	119	Prosp	0.3 µg/l	60	89	<4
Muttukrishna et al. (2004)	69	Prosp	0.1 ng/ml	87.5*	72.2*	<4 ó cancelación
Muttukrishna et al. (2005)	108	Retro	0.2 ng/ml	87	64	≤4
Tremellen et al. (2005)	75	Prosp	8.1 pmol/l	80	85	≤4
Peñarrubia et al. (2005)	80	Prosp	4.9 pmol/l	53*	96*	cancelación
Ebner et al. (2006)	141	Prosp	1.66 ng/ml	69	86	<4
Fıçıcıođlu et al. (2006)	50	Prosp	0.25 pg/ml	90.9	90.9	<5
La Marca et al. (2007)	48	Prosp	0.75 ng/ml	80	93	<4 ó cancelación
Fréour et al. (2007)	69	Prosp	1.3 µg/l	44	100	<6
Smeenk et al. (2007)	80	Prosp	1.4 µg/l	62	73	≤4
McIlveen et al. (2007)	84	Prosp	1.25 ng/ml	58	75	≤4
Kwee et al. (2007)	110	Prosp	1.4 µg/l	76	86	<6
Nakhuda et al. (2007)	77	Prosp	0.35 ng/ml	90.1*	81.8*	cancelación
Lekamge et al. (2007)	126	Retro	14 pmol/l	73	73	≤4
Nelson et al. (2007)	340	Prosp	5 pmol/l	75†		≤2
Gnoth et al. (2008)	132	Prosp	1.26 ng/ml	97	41	≤4
Nardo et al. (2008)	165	Prosp	1.0 ng/ml	87	67	≤4 día 8
Jayaprakasan et al. (2008)	135	Prosp	0.99 ng/ml	100	73	<4 ó cancelación

Tabla 4

Sensibilidad (S), Especificidad (Esp) y definición de baja respuesta del HAM en la predicción de la baja respuesta a la estimulación con gonadotropinas. (La Marca, 2010b).

Los rangos de sensibilidad y especificidad oscilan entre el 44-100 % y 41-96 % respectivamente. No todos muestran una sensibilidad (>0.75) y especificidad (>0.85) óptimas. (La Marca *et al.*, 2010b).

En la siguiente tabla se resumen todos los estudios retrospectivos y prospectivos que encontraron una relación entre el número de ovocitos recuperados y los niveles séricos de HAM, incluidos en la revisión realizada por La Marca y su grupo. La mayoría de autores comparó HAM con edad y otros marcadores hormonales (FSH, estradiol e inhibina B), pero solo unos pocos estudios compararon los niveles de HAM con marcadores ecográficos de reserva ovárica (Tabla 5). El balance de los estudios publicados parece indicar que la HAM es mejor marcador predictivo de respuesta ovárica que la edad, la FSH, el estradiol y la inhibina B.

Autor	n	R con oocitos ^a	HAM mejor que		D+3 FSH	D+3 E2	D+3 inhB	Edad
			RFA	Vol Ov.				
Seifer <i>et al.</i> (2002)	107	0.48			✓	✓		
Van Rooij <i>et al.</i> (2002)	130	0.57	=		✓	✓	✓	✓
Fanchin <i>et al.</i> (2003a, b)	93	0.43						
Muttukrishna <i>et al.</i> (2004)	69	0.69			✓		✓	
Hazout <i>et al.</i> (2004)	109	0.38			✓	✓	✓	✓
Muttukrishna <i>et al.</i> (2005)	108	0.5	=		✓			
Eldar-Geva (2005)	56	0.64	X		✓		✓	
Silberstein <i>et al.</i> (2006)	257	0.33			✓			
Fıcioglu <i>et al.</i> (2006)	50	0.56	✓		✓	✓		✓
Lekamge <i>et al.</i> (2007)	126	0.34	=					
La Marca <i>et al.</i> (2007)	48	0.7						
Kwee <i>et al.</i> (2007)	110	0.63	X	✓	✓			✓
Nakhuda <i>et al.</i> (2007)	77	0.63			✓			
MdIveen <i>et al.</i> (2007)	84	0.78	✓	✓	✓		=	✓
Nelson <i>et al.</i> (2007)	340	0.71			✓			✓
Elgindy <i>et al.</i> (2008)	33	0.88	=	✓	✓			
Lie Fong <i>et al.</i> (2008)	125	0.47						
Jee <i>et al.</i> (2008)	59	0.53					X	
Jayaprakasan <i>et al.</i> (2008)	135	0.47	=	✓	✓	✓		✓
Wunder <i>et al.</i> (2008)	276	0.35			✓		X	

Tabla 5

HAM como marcador de la respuesta ovárica en el control de la estimulación.

Comparación con otros predictores. R= Correlación entre HAM sérica y número de ovocitos recuperados. ✓= Mejor que. X= peor que. = = igual que (La Marca, 2010b).

Eficacia como predictora de la calidad ovocitaria

Se ha descrito su correlación con la calidad ovocitaria (Hazout *et al.*, 2004, Ebner *et al.*, 2006; Silberstein *et al.*, 2006; Cupisti *et al.*, 2007; Barad *et al.*, 2009) y con la morfología embrionaria (Silberstein *et al.*, 2006). Los niveles serían un potente predictor tanto del pool como de la calidad ovocitaria (Ebner *et al.*, 2006). Valores extremos confirmarían estos asertos:

Señalan que:

- Los valores medios en edad reproductiva serían $3,39 \pm 2,11$ ng/ml, con desviaciones de 0,13 a 10,37 ng/ml.
- Los valores medios en ciclos transferidos serían de $3,46 \pm 2,24$ ng/ml.
- Los valores en aquellos casos en donde no hubo transferencia (ciclos cancelados) fueron mucho menores (media de $1,15 \pm 1,28$ ng/ml).

Distinguen tres grupos de pacientes:

Grupo 1: valor menor de 1,66 ng/ml

Grupo 2: de 1,66 a 4,54 ng/ml

Grupo 3: más de 4,54. ng/ml

El grupo uno necesitó mucha mayor cantidad de gonadotropinas, se obtuvieron menos ovocitos y los valores de estradiol sérico fueron inferiores.

La cancelación de ciclos estuvo fuertemente correlacionada con estos niveles bajos.

Valores por bajo de 1,66 ng/ml y por encima de 4,62 mostraron ovocitos de peor calidad.

La calidad (Ebner *et al.*, 2006) fue estudiada microscópicamente en las blastómeras determinando las anomalías, granulaciones oscuras centrales, vacuolizaciones y agregación del retículo endoplasmático liso.

Respecto de los resultados en la fecundación, la posterior evolución hasta blastocisto y la morfología, los grupos uno y tres no se vieron afectados por la concentración sérica de HAM. Sin embargo, la calidad ovocitaria fue muy superior en el grupo dos (tabla 6).

	Grupo I HAM < 1.66	Grupo II HAM 1.66-4.52	Grupo III HAM > 4.52
N. Ovocitos	155	627	462
Metafase II	139 (89.7)	538 (85.8)	390 (84.4)
Ovocitos normales	47 (33.8)	242 (45.0)***	139 (35.6)
Anomalías	92 (66.2)	296 (55.0)	251 (64.4)
Granulación Central	43 (46.7)***	88 (29.7)	75 (29.9)
Vacuolización	9 (9.8)	39 (13.2)**	13 (5.2)
REL	4 (4.4)	5 (1.7)**	16 (6.4)
Incorporación	14 (15.2)****	61 (20.6)	85 (33.8)
Cuerpos refractarios	7 (7.6)	77 (26.0)***	39 (15.5)
Gránulos en EP	7 (7.6)	13 (4.4)	8 (3.2)
Anomalías múltiples	8 (8.7)	13 (4.4)	15 (6.0)

Tabla 6

Número y calidad de los ovocitos con relación a distintos niveles de HAM.

*PVS = Espacio perivitelino; REL = Retículo endoplasmático liso; *P < 0.05 versus grupo 1; **P < 0.01 versus grupo 3; ***P < 0.01 versus otros grupos; ****P < 0.001 versus otros grupos. (Modificada de Ebner, 2006)*

Aproximadamente la mitad de los ovocitos procedentes de pacientes con HAM normal no estaban afectados en comparación con solo un tercio en las bajas y altas respondedoras.

La posible explicación podría estar en que como consecuencia de que la HAM se produce en las células de la granulosa en estadios foliculares tempranos, valores bajos se asocian con fallo en la expresión de las células de la granulosa y así podría lesionar de forma irreversible al gameto. Esto está en línea con los hallazgos de que el rasgo negativo predominante en el grupo de HAM bajo es la granulación central oscura del citoplasma, un fenómeno que se piensa acontece precozmente en la maduración ovocitaria.

A pesar de que las inclusiones citoplasmáticas (excepto la vacuolización) que no alteran el desarrollo posterior, fueron las anomalías más frecuentes en el grupo 2. En el grupo 3 lo ha sido la agregación del retículo endoplasmático. Esto refuerza publicaciones recientes que denotan la relación entre apilamientos de retículo endoplasmático y mayores niveles de estradiol.

Silberstein (Silberstein *et al.*, 2006) encuentra embriones de mejor morfología y comportamiento en la división en pacientes con HAM \geq 2,7 ng/mL comparadas con valores menores.

En este aspecto (Jee *et al.*, 2008) se han relacionado los niveles de esta hormona y la inhibina B con el número y la calidad de ovocitos inmaduros obtenidos tras la administración de la HCG. Ambas hormonas se correlacionaron perfectamente con la inmadurez, indicando que serían buenos predictores para determinar en ciclos FIV la calidad ovocitaria obtenida.

Las escasas investigaciones existentes no parecen mostrar la misma relación que se observa entre concentración de HAM en líquido folicular (ver después) con los valores en sangre periférica.

La primera investigación (Silberstein *et al.*, 2006) si la halló y pudo discriminar entre los de alto y bajo potencial de implantación. En consecuencia lo que se observó fue capacidad de implantación pero no índice de embarazos

No se ha hallado una correlación consistente entre HAM, morfología embrionaria e índice de aneuploidias embrionarias (Lie Fong *et al.*, 2008). No está pues evidenciado que sea un marcador de calidad.

La mayoría de estudios que la han relacionado para predecir la gestación tras FIV indican que no es consistente. Solo tres investigaciones, prospectivas (Eldar-Geva *et al.*, 2005; Elgindy *et al.*, 2008) o retrospectiva (Lekamge *et al.*, 2007) han mostrado una correlación positiva, pero el número de casos investigados era pequeño.

Solo ha aparecido una publicación que relacione valores HAM e índice de nacimientos tras FIV (Nelson *et al.*, 2007) observando que éste era inmensamente mayor en aquellas con valores basales altos. Sin embargo solo fue estadísticamente significativo para valores $< 7,8$ pmol/l. Por encima de estos valores no hubo diferencias.

Por tanto la HAM no parece predecir entre embarazo y no embarazo, simplemente parece identificar aquellas con baja o alta probabilidad de gestación, un hecho que está, sin duda, relacionado con la buena correlación existente entre los valores basales de HAM y el número de ovocitos que se recuperan (Nelson *et al.*, 2007 y 2009).

En resumen, parece que los aspectos cualitativos ovocitarios y embrionarios no pueden predecirse mediante estas determinaciones.

1.5.8 LA HAM COMO MARCADOR DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA MUJER DE EDAD AVANZADA

Con el avance de la edad existe una disminución en la función reproductiva debido a la reducción de la reserva folicular y a la propia calidad ovocitaria.

Hasta el momento, los marcadores más empleados han sido el incremento de la FSH, la disminución de inhibina B y el RFA. La HAM es el más novedoso.

Cuando se han estudiado estos valores en espacios de tiempo de hasta 7 años, se ha observado una reducción del 40% de la HAM que no se correlacionó con FSH, inhibina B y RFA. La HAM fue el único marcador que mostró una disminución longitudinal en el tiempo (de Vet *et al.*, 2002).

En relación con otros marcadores, la HAM refleja mejor el continuo declive del pool ovocitos/folículos. La disminución de la HAM con el aumento de la edad aparece antes que otras variables indicando que probablemente sea el mejor marcador de la edad ovárica y la transición a la menopausia.

1.5.9 IMPORTANCIA DE LA HAM EN DISFUNCIONES OVARICAS

Estudios de HAM a lo largo de la vida han mostrado que en circunstancias fisiológicas en que las gonadotropinas están disminuidas (embarazo) o patológicas (hipofisectomía, fallo hipotálamo-hipofisario) no se modifican sus valores circulantes. La placenta tampoco altera a esta hormona, demostrando que el reclutamiento folicular inicial no está abolido en el embarazo.

Se ha sugerido así, que su determinación aportaría información en la valoración diagnóstica del hipogonadismo secundario.

Se ha valorado en casos de amenorrea hipergonadotrópica (FOO) e hipogonadotrópica (amenorrea funcional hipotalámica). Los valores son normales en esta segunda, lo que indica que el reclutamiento folicular inicial no está abolido, y son indetectables o muy bajos en el 83% de los FOO's. De hecho se ha empleado esta hormona para identificar el FOO incipiente en mujeres jóvenes eumenorréicas con hiper gonadotropismo moderado, ya que esta hormona precede al comienzo de las irregularidades cíclicas.

Por ello que tiene un inmenso campo diagnóstico en mujeres tratadas con quimio o radioterapia, operadas de ovarios o endometriosis.

Mención especial merece el **Síndrome de Ovarios Poliquísticos**. Estas pacientes muestran un desarrollo folicular incrementado comparado con mujeres normales.

Se aprecia un aumento de la síntesis por las células de la granulosa dos a tres veces superior, lo que sugiere que el desarrollo alterado folicular ya está presente en la infancia y pubertad.

El incremento sería debido pues a:

- Acumulación excesiva de folículos antrales.
- Aumento de la secreción de HAM por las células de la granulosa de estos.

Los valores parecen estar en relación con la severidad del síndrome ya que son más altos en aquellas insulín-resistentes y en las amenorréicas. Quizás la HAM juegue un rol en la anovulación de la patogenia del síndrome.

La administración de metformina se asocia con reducción de los valores lo que sugiere que podría ser empleada para comprobar la eficacia del tratamiento (Tomova *et al.*, 2011).

La obesidad se asocia a reducción de la fertilidad y a abortos incluso en aquellas con ciclos ovulatorios. Estas muestran valores inferiores de inhibina B y HAM a

pesar de disponer de recuento de folículos antrales normales. Parece que se debe a factores intrínsecos de la obesidad no relacionados con la reserva ovárica.

Finalmente se ha sugerido una reducción de la reserva en **fumadoras** (Freour *et al.*, 2008) consumidoras de **alcohol** (Nardo *et al.*, 2008) según la **raza** y la **etnia** (Seifer *et al.*, 2009).

1.5.10 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA CUANTITATIVA OVÁRICA EN RA

Es predictiva de la alta respuesta a FSH, por lo que serviría como un test para predecir la aparición del síndrome de hiperestimulación (SHO).

Se conoce la existencia de una relación dosis/respuesta entre la HAM y la respuesta ovárica a la FSH, lo que lleva a la hipótesis que una alta respuesta a la inducción resultaría de la existencia de concentraciones basales altas de HAM.

Presentamos los escasos trabajos existentes en este sentido (tabla 7).

Autor	Diseño	n	HAM Valores medios Respuesta normal	Respuesta excesiva	SHO
Tremellen <i>et al.</i> (2005)	Prosp	75	15.47 pmol/l	21.53 pmol/l ^a	
Eldar-Geva <i>et al.</i> (2005)	Prosp	56	14.1 pmol/l	37.8 pmol/l ^b	
Nakhuda <i>et al.</i> (2006)	Retro	30	0.63 ng/ml		3.6 ng/ml
La Marca <i>et al.</i> (2007)	Prosp	48	5.98 ng/ml	10.13 ng/ml ^c	
Nelson <i>et al.</i> (2007)	Prosp	340	10 pmol/l	27 pmol/l ^d	
Nardo <i>et al.</i> (2008)	Prosp	165	3.04 ng/ml	5.56 ng/ml ^f	

Tabla 7

Valores basales de HAM en mujeres con respuesta normal, respuesta alta en control de estimulación ovárica y síndrome de hiper-estimulación ovárica (SHO). Respuesta excesiva cuando se recuperaron: a ≥ 18; b ≥ 20; c ≥ 16; d ≥ 21 ovocitos. (La Marca, 2010b).

Se han publicado 4 estudios prospectivos (Nardo *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2007; Raine-Fenning *et al.*, 2008; Kwee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008) que determinan puntos de corte para la predicción de la alta respuesta y el síndrome de hiperestimulación ovárica (tabla 8).

Autor	n	Diseño	Corte	S(%)	Esp (%)	Predicción alta respuesta	Predicción SHO
Kwee <i>et al.</i> (2007)	110	Prosp	5 mcg/l	53	91	✓ ^a	
Nelson <i>et al.</i> (2007)	340	Prosp	25 pmol/l	60	94.9	✓ ^b	
Lee <i>et al.</i> (2008)	262	Prosp	3.36 ng/ml	90.5	81.3		✓
Nardo <i>et al.</i> (2008)	165	Prosp	3.5 ng/ml	88	70	✓ ^c	

Tabla 8

Valores de corte de HAM para la predicción de la alta respuesta y SHO. Respuesta excesiva cuando se recuperan: a: más de 20; b \geq 21 ovocitos. (La Marca, 2010b).

Se ha descrito que la HAM sería igual de predictiva que el estradiol y RFA y mejor que la edad y el IMC para identificar mujeres que lo desencadenarán y que el valor de referencia sería de $\geq 3,5$ ng/ml (Nardo *et al.*, 2008). Valores basales de HAM predecirían el SHO con una sensibilidad del 90,5% y una especificidad del 81,3% para un límite de corte de 3,36 ng/ml lo que sugiere que la respuesta aumentada y el SHO estarían causados por la administración de gonadotropinas a mujeres con “reserva ovárica aumentada” (Lee *et al.*, 2008), algo que ya fue evidenciado anteriormente (La Marca *et al.*, 2007) comparando con la edad FSH, estradiol e inhibina B. La HAM sería superior y comparando con el RFA los resultados muestran un valor predictivo semejante.

Consecuentemente la determinación de HAM previa a la administración de gonadotropinas podría aportar información para administrar protocolos con dosis más bajas. Los valores declinan durante la administración de gonadotropinas (Fanchin *et al.*, 2003a y 2003b; Fanchin *et al.*, 2005a; La Marca *et al.*, 2004a y 2004b). Esta reducción se debe, probablemente, a:

- Un feedback negativo directo o indirecto de la FSH exógena sobre la HAM.
- Por el aumento supra-hipofisario de los niveles de estradiol. Este último ha sido implicado como un regulador negativo tanto de la HAM como del HAM RII mRNA.
- La disminución de la HAM en mujeres tratadas con FSH puede ser el resultado del crecimiento folicular inducido por ésta, haciendo así que estos folículos pierdan su expresión de HAM, probablemente la causa fundamental.

La prevención pues, deberá hacerse meses o días antes del inicio de la inducción. A pesar de la ausencia de cambios cíclicos en la HAM, y por estos motivos, debe evitarse su determinación una vez iniciada ésta o el día de la punción. Son de esperar valores más bajos.

Numerosos trabajos han encontrado una correlación positiva con el número de los ovocitos recuperados (ver tabla 2). Valores altos el día +3 de estimulación se asocian a una mayor captura (Seifer *et al.*, 2002). Los valores fueron dos a tres veces superiores en aquellas que se recuperaban > 11 comparados con con aquellas que se recuperaron < 6 .

También se ha comparado con el número de ovocitos reclutados (Fiçicioglu *et al.*, 2006; McIlveen *et al.*, 2007) llegándose a la conclusión que la HAM sería igual o más predictiva, si bien no existe unanimidad (Eldar-Geva *et al.*, 2005; Kwee *et al.*, 2007).

En resumen puede concluirse que el RFA y la HAM tiene un poder de predicción semejante en el número de ovocitos que se reclutarán (Broer *et al.*, 2009).

1.5.11 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA CUALITATIVA OVÁRICA EN RA

Hoy está totalmente reconocido que el éxito de las TRA está relacionado con la calidad más que con la cantidad de ovocitos recuperados. Como el estatus de la reserva ovárica incluye a ambas la HAM refleja no solo la respuesta cuantitativa sino la cualitativa, de aquí que numerosos investigadores hallan encontrado una correlación positiva significativa con la calidad (Hazout *et al.*, 2004; Ebner *et al.*, 2006; Fanchin *et al.*, 2007; Silberstein *et al.*, 2006; Cupisti *et al.*, 2007). Con el fin de clarificar la compleja relación entre calidad ovocitaria/embrionaria e índices de implantación y gestación comentaremos los estudios existentes de HAM en líquido folicular y en suero (Fanchin *et al.*, 2007; La Marca *et al.*, 2010b).

Estudios en líquido folicular

Dos trabajos (Fanchin *et al.*, 2005b y c) han estudiado las concentraciones en líquido folicular obtenido de folículos (pequeños y grandes) el día de la captación folicular, y comparados con las concentraciones de E₂ y andrógenos. Estas fueron tres veces superiores en los folículos pequeños confirmando que su producción en las células de la granulosa declina a medida que maduran.

Tanto en los folículos pequeños como en los grandes halló una correlación positiva con el número de folículos antrales pequeños del día + 3 del ciclo previo, con los folículos en crecimiento el día de la administración de la HCG y el número de ovocitos recuperados.

Estos resultados indican que los niveles de la HAM periférica no son dependientes exclusivamente del número de folículos sino que también está modulada por la habilidad folicular individual de producir HAM. Por ello valores elevados de HAM periférica indican no solo que el número de folículos antrales está aumentado sino también que cada folículo probablemente produce más HAM

de forma individualizada. Esto ofrece un concepto nuevo sobre la asociación que se ha publicado entre HAM periférica y potencial ovárico de fertilidad llevando a especular si valores séricos de HAM reflejarían la respuesta a la inducción no solo cuantitativa sino cualitativa folicular.

En otro trabajo (Fanchin *et al.*, 2007) estudiando ciclos con un solo folículo dominante se comparó la concentración de HAM en líquido folicular con la calidad de ovocitos, embriones generados, índices de implantación, de embarazo y de embarazos en curso. Se observó que los índices de implantación y embarazos en curso aumentaron drásticamente comparando los casos de baja con alta concentración. La morfología embrionaria fue similar en ambos grupos lo que indica que la HAM folicular sería un factor adicional en la selección de los ovocitos. Estas investigaciones resultan de interés clínico para aquellos países en los que el cultivo embrionario y la transferencia están limitados legalmente.

Semejantes investigaciones han sido repetidas analizando también la inhibina B (Wunnder *et al.*, 2008a y b) transfiriendo solo un pre-embrión. Se observó una mayor tasa de embarazos a mayores concentraciones de HAM e inhibina B. Igualmente se observó una correlación positiva con E_2 y negativa para FSH (Dumesic *et al.*, 2009).

Aunque parece existir una relación entre concentración en líquido folicular, calidad ovocitaria, embrionaria e índice de gestaciones, está aún por confirmar.

Estudios en suero

Aunque los estudios en líquido folicular parecen indicar que la HAM puede ser útil en la predicción de la calidad ovocitaria y embrionaria y de embarazo, no se puede decir lo mismo en cuanto a la HAM medida en suero. Son pocos los estudios que concluyen que la HAM pueda dar información relevante acerca de los ovocitos, calidad embrionaria y resultados gestacionales (La Marca *et al.*, 2010b).

Silberstein y colaboradores (2006) encontraron que la HAM sérica medida el día de la administración de la HCG se correlacionó con la calidad de los embriones obtenidos, permitiendo discriminar entre embriones de alto y bajo potencial de implantación. En consecuencia, la tasa de implantación, pero no la de embarazo, fue más alta en el grupo con niveles de HAM más altos (Silberstein *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que no existe una correlación consistente entre la HAM sérica y la morfología embrionaria y la tasa de aneuploidias embrionarias (Lie Fong

et al., 2008).

La gran mayoría de estudios que han investigado la relación de la HAM con la tasa de embarazos tras FIV concluyen que no es útil en la predicción del éxito reproductivo. Sólo pocos estudios reportaron un valor cut-off significativo que distinga entre embarazo y no embarazo. Sin embargo los únicos estudios prospectivos al respecto presentan un tamaño muestral escaso, el primero 56 y el segundo 33 (Eldar-Geva *et al.*, 2005; Elgindy *et al.*, 2008). Por otro lado, un estudio que incluyó 109 pacientes y que era favorable al valor predictivo de la HAM para el embarazo tras FIV, presenta un diseño retrospectivo (Lekamage *et al.*, 2007).

Un estudio publicado relacionó la HAM en suero con la tasa de nacimientos tras FIV (Nelson *et al.*, 2007). En este estudio que incluyó 340 pacientes, fue demostrado que la tasa de nacimientos se incrementaba a mayor niveles de HAM. Sin embargo, esta afirmación era válida sólo para mujeres con niveles basales de HAM <7.8 pmol/l. Estos hallazgos pueden ser explicados en parte, por la buena correlación entre HAM y el número de ovocitos recuperados (Nelson *et al.*, 2007).

En conclusión, la posible predicción de los aspectos cualitativos de los programas de RA por parte de la HAM, sigue siendo controvertida. La evidencia sugiere que esta relación puede ser únicamente indirecta debido a la fuerte correlación entre la HAM sérica y la respuesta cuantitativa del ovario (La Marca *et al.*, 2010b).

1.5.12 FACTORES A TENER EN CUENTA EN EL MANEJO DE LA HAM

Es importante tener en cuenta cuando se maneja esta hormona que:

- a. Hasta el presente, no existen datos longitudinales sobre valores estándares durante el periodo reproductivo. Deberán determinarse valores de normalidad en relación con la progresiva edad. Se desconoce igualmente qué niveles son predictivos, independientemente de la edad, de gestación espontánea en la población general (La Marca *et al.*, 2010b). Es pues prematuro su aplicación para investigar la fertilidad en la población general (Broekmans *et al.*, 2008).
- b. En la clínica, en pacientes de RA, parece muy útil el empleo de valores extremos para predecir la hiper-respuesta a la FSH, especialmente en SOP, y para informar sobre el riesgo de baja respuesta, cancelaciones o fracasos.
- c. Las bajas respondedoras jóvenes tienen un pronóstico diferente, debido a

la falta de relación entre baja respuesta y calidad ovocitaria. Muchas de ellas logran gestación. Por ello ésta no debe ofertarse como test para conocer las posibilidades gestaciones especialmente si es el primer intento FIV.

- d. Pacientes con valores bajos quizás podrían beneficiarse de dosis más elevadas de gonadotropinas.
- e. Se han descrito casos de falsos positivos. No deben excluirse estas parejas de programas de FIV en tanto en cuanto esto no se confirme.
- f. El empleo en estos casos de corticoides y óxido nítrico podría mejorar la respuesta.
- g. Se ha propuesto por ello hacer un primer FIV sin ninguno de los test referidos y que la respuesta sería el test de primera línea. (Eldar-Geva *et al.*, 2005).
- h. Sin duda, el futuro pasa por identificar marcadores genéticos del proceso que regula la cantidad y la calidad de los ovocitos.
- i. Falta clarificar con precisión el rol de la HAM existente en líquido folicular.
- j. Falta clarificar con precisión el rol en la foliculogénesis.
- k. Falta clarificar con precisión sus posibles efectos extra ováricos en endometrio, células neoplásicas de cérvix, mama, epitelio ovárico, etc.
- l. No existe un patrón internacional de medición estandarizado. Se emplean varios kits (Immunotech-echman Coulter, Diagnostic System Laboratories y otros más recientes) y se han descrito discordancias entre ellos (Streuli *et al.*, 2009).

MATERIAL Y MÉTODO

2. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 OBJETIVOS

El presente trabajo tiene **como objetivo primario:**

- Evaluar la eficacia de la HAM como análisis predictivo de la reserva ovárica y la respuesta a Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

Y como objetivos secundarios:

- Valorar qué lugar ocupa la HAM en el ámbito del estudio de la reserva ovárica, en comparación a otros marcadores, ecográficos (recuento de folículos antrales) y hormonales (FSH, LH, Estradiol).
- Aproximarnos a la posibilidad de evitar realizar TRA que no van a aportar resultados clínicos o sustituirlas por otras que tienen muchísimo mejor pronóstico reproductivo.

2.2 MATERIAL Y MÉTODO

El estudio ha incluido a 153 pacientes que respondían a cada uno de los siguientes criterios de inclusión:

- Antecedente de dos o más fallos a TRA (inducciones de ovulación, IAH, FIV/ICSI).
- Ciclos menstruales normales.
- Presencia de ambos ovarios.
- Sin historia previa de endocrinopatías, quimioterapia y/o radioterapia.

Todas las parejas fueron informadas de integrar el estudio, las cuales a pesar de los fracasos previos y conociendo en el presente ciclo los datos clínicos, la evolución de la inducción y los niveles de HAM y otras hormonas, aceptaron la realización de un nuevo ciclo FIV/ICSI y la inclusión en el estudio, firmando el correspondiente consentimiento.

Se ha definido como criterios de exclusión:

- Factor masculino severo (< 5 millones espermatozoides /ml).
- Casos de fallo ovárico oculto o fallo ovárico precoz.
- Aquellas pacientes en las que se observaron quistes ováricos u otro tipo de patología ovárica durante el recuento de folículos antrales.

- Pacientes con antecedente de cancelaciones por baja respuesta.
- Pacientes intervenidas quirúrgicamente de patología ovárica severa (endometriosis, quistectomias amplias, ooforectomía unilateral, etc.) (Fig. 7)

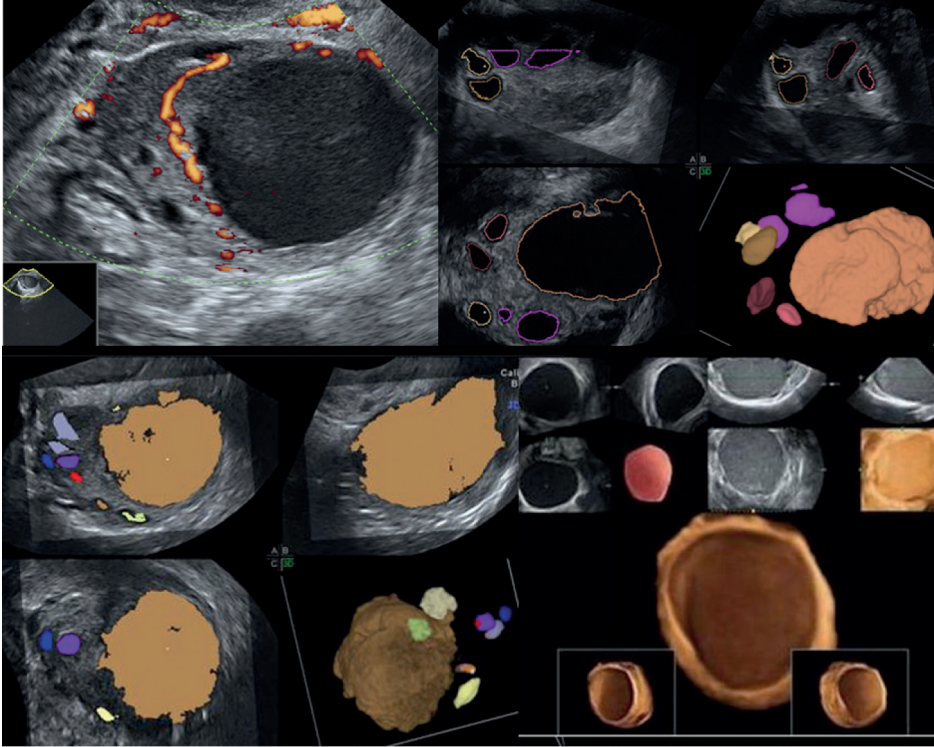


Figura 7:

2D vaginal Angiopower Doppler (arriba izq); inverse mode (arriba derecha) sonoAVC mode (abajo izq); modo HD Live (abajo derecha).

Se observa un foco de endometriosis en color marrón. El resto de áreas coloreadas corresponden a folículos antrales. Las imágenes 3D de la endometriosis muestran la verdadera importancia de esta tecnología ya que permite ver el tamaño del foco, las posibilidades de extirpación quirúrgica y las de conservar partes del ovario. La imagen inferior derecha que mostramos, deja ver claramente que aún persiste tejido ovárico no afectado y que en él hay folículos antrales.

Se dispuso de **determinaciones hormonales basales (FSH, LH, 17 β -estradiol) y HAM** realizadas en el día +3 del ciclo anterior a la estimulación. Se empleó para las técnicas de determinación de FSH, LH y 17 β -E₂ el enzimoimmunoensayo tipo

sandwich o enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica MbH, Wiesbaden. Alemania). Con una sensibilidad analítica de 0.4 mU/ml para FSH, 0.5 mU/ml para LH, 3 pg/ml para 17β -E₂. Para la HAM se empleó el AMH/MIS immunoassay (Laboratory Instrument & Beckman-Coulter, Viena, Austria). Con una sensibilidad analítica estimada (ELISA) de 0.1 ng/ml correspondiente a 0.7 pmol/l.

Todas la pacientes fueron sometidas a una ecografía transvaginal 3D entre los días 3^o-5^o del ciclo para el **recuento de folículos antrales (RFA)**. En todas las exploraciones se empleó un equipo Voluson E-8 General Electric, Zipf, Austria, con transductor vaginal de 7,5 MHz. Las ecografías fueron realizadas en todos los casos por el mismo ecografista, intentando así evitar diferencias interobservador. Primero se adquirió una imagen basal tridimensional de cada ovario usando el modo 3D, incluyendo en el sector el ovario en su totalidad y realizando un posterior barrido. Los datos e imágenes de ambos ovarios de cada paciente fueron guardados en nuestro equipo para su análisis posterior. En segundo lugar y de forma off-line el **modo Sono AVC** (Automated Volume Calculation) fue usado para el conteo de folículos antrales en cada ovario, trabajando sobre el mismo ecógrafo. Consideramos folículos antrales aquellos folículos que miden entre 2 y 10 mm de diámetro el día 3-5 del ciclo. El modo sono AVC identifica todas las zonas anecóicas, midiendo automáticamente su diámetro mayor y su volumen, y las individualiza mediante colores de acuerdo con su tamaño. Para realizar el RFA mediante este método, trabajamos sobre la primera adquisición volumétrica obtenida de cada ovario. Limitamos la zona del ovario que queremos analizar en los tres planos ortogonales para excluir la máxima información extraovárica posible, y nos aseguramos que la totalidad del ovario está incluida en la región de interés. Después aplicamos el modo AVC y cada folículo será representado con un color específico y se mostrarán sus dimensiones y tamaños relativos (fig 8). El número total de folículos antrales inicialmente identificado fue guardado. Posteriormente reanalizamos de forma manual cada ovario para un RFA más preciso. Aquellos folículos que no fueron incluidos en el cálculo automático y que pudimos observar después fueron incluidos mediante un sencillo click sobre cada uno de ellos. Cada folículo antral identificado de este modo recibe un nuevo color y sus dimensiones aparecen igual que con los folículos ya identificados. Mediante

este reanálisis también pudimos excluir áreas que fueron erróneamente contadas para el conteo de folículos antrales. La suma total de folículos antrales en ambos ovarios fue tomada como el RFA para cada paciente.

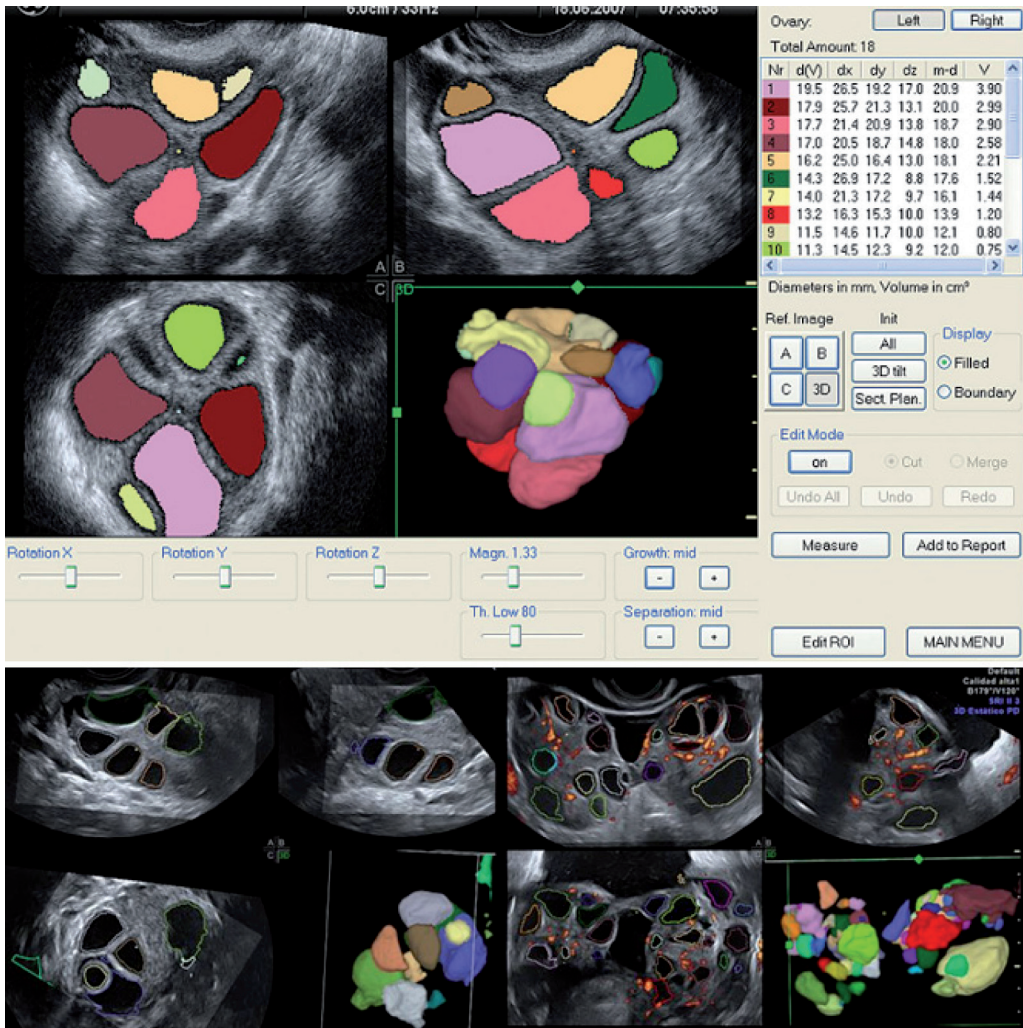


Figura 8:

Sistemas AVC que colorea cada uno de los folículos y valora sus diámetros y el volumen (arriba), en dos casos con buena respuesta, mostrando por tanto, numerosos folículos asincrónicos. La 2D, en los planos ortogonales, muestra al mismo tiempo el Doppler energía. (abajo derecha).

La **inducción de la ovulación** se llevó a cabo empleando 225-300 UI de rFSH (Puregon®, MSD, Madrid, España) durante 6 días, continuada según el tamaño

folicular y los niveles de $17\beta\text{-E}_2$. El día +5 o cuando se objetivaron folículos de 15mm de tamaño o mayores, se suministró 0,25 mg de GnRH antagonista (Orgalutran[®], Serono, Madrid) de forma diaria hasta la administración de rHCG (Ovitrelle[®], Serono, Madrid).

El criterio de inclusión que utilizamos para baja respuesta fue:

- Obtención de ≤ 5 ovocitos el día de la punción.

Los criterios de inclusión para baja respuesta cancelada fueron:

- Recuento de un número de folículos el día de administración de la HCG o el de la punción <3 entre ambos ovarios determinados con modo AVC.
- Obtención de cero ovocitos el día de la punción.

No fue cancelada ninguna paciente por presentar una hiperrespuesta, es decir, mas de veinte folículos el día de la administración de la HCG.

Una vez dispusimos del resultado de la estimulación del presente ciclo, analizamos los siguientes subgrupos de acuerdo al **número de ovocitos recuperados**:

- Grupo 1, baja respuesta canceladas: < 5 . (n= 34, 22,22%)
- Grupo 2, baja respuesta no cancelada: < 5 . (n= 44,28,75%)
- Grupo 3, respuesta normal: ≥ 5 y ≤ 15 . (n= 65,42,48%)
- Grupo 4, altas respondedoras: > 15 . (n= 10, 6,5%)

Se ha dividido al grupo de pacientes bajas respondedoras entre canceladas y no canceladas con la intención de:

- Contrastar si en este primer grupo, los niveles de HAM y RFA son significativamente menores que el resto. Si así fuera, podríamos estimar un nivel umbral para este grupo de pacientes.
- Diferenciar los resultados respecto a la edad para intentar hallar diferencias significativas si las hubiera.
- Valorar calidad ovocitaria, calidad embrionaria y resultados gestacionales, pues en los casos cancelados estos datos no pueden ser aportados y no podríamos conocer la posible relación HAM/RFA en estas mujeres bajas respondedoras.

A la hora de analizar el valor de la HAM y el resto de marcadores definimos dos tipos de variable respuesta que nombraremos como RES1 y RES2:

- RES1 incluye los grupos respuesta bajas, tanto canceladas como no canceladas, normo y altas respondedoras.
- RES2 incluye los grupos respuesta bajas canceladas, bajas no canceladas, normo y altas respondedoras.

En el caso de no hallar diferencias entre las pacientes bajas respondedoras canceladas y bajas respondedoras no canceladas, basaremos el estudio sobre una única variable, RES1.

El grupo de altas respondedoras, que es muy limitado, se ha introducido siguiendo recomendaciones de publicaciones semejantes, como comparativo estimativo.

En resumen, 78 casos (50,9%) fueron consideradas bajas respondedoras; 65 (44,48%) fueron normo respondedoras y solo 10 casos (6,5%) altas respondedoras.

Una vez finalizado el ciclo FIV/ICSI de cada paciente, se han valorado los siguientes **parámetros**:

- Edad
- Valores hormonales FSH, LH, 17-E_2 y de HAM
- RFA con modo AVC.
- Dosis total de gonadotrofinas empleadas y días de estimulación;
- Total de ovocitos recuperados y grado de madurez de los mismos. Número de ovocitos fertilizados.
- Total de embriones obtenidos GI, GII;
- Número de embriones transferidos y su calidad;
- Gestaciones obtenidas;
- Evolución clínica (número de abortos, gestaciones ectópicas o embarazos en curso)

Todos los datos fueron incluidos en un programa de memoria **File Maker** (Fig. 9 y 10):

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Hemos utilizado el análisis de la varianza, ANOVA, para el estudio de variables normalmente distribuidas. Para estudiar la normalidad de los residuos hemos realizado la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Sobre aquellas que superaron dicha prueba aplicamos el test no paramétrico de Kruskal Wallis. En todos los casos fijamos el nivel de significación en 5%.

Para obtener las curvas ROC, primero hemos aplicado un modelo de regresión logística y después, mediante el *package* de R, *DiagnosisMed*, hemos obtenido las gráficas, los niveles de sensibilidad y especificidad, así como el área bajo la curva.

Los análisis estadísticos se han realizado con la ayuda de los paquetes estadísticos Infostat [1] y R versión 2.10.1 [2].

[1] InfoStat (2009). InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

[2] R Development Core Team (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RESULTADOS

3.- RESULTADOS

3.1. DESCRIPTIVO

Descriptivo global:

Estadística descriptiva

Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
edad	153	35.15	4.30	18.46	0.35	21.00	45.00
FSH	153	8.09	6.68	44.65	0.54	1.55	58.00
E2	93	54.34	44.06	1941.14	4.57	10.00	260.00
RFA	149	9.07	7.29	53.17	0.60	0.00	36.00
HAM	153	13.35	11.75	138.09	0.95	0.36	60.96

A continuación presentamos en forma de tabla un breve descriptivo de las variables que hemos incluido en el estudio para cada uno de los niveles de la variable respuesta RES1 (*alta, normo y baja*):

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	edad	10	31.60	3.86	14.93	1.22	24.00	38.00
Normo	edad	66	33.97	4.54	20.59	0.56	21.00	43.00
Baja	edad	77	36.55	3.57	12.74	0.41	27.00	45.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	HAM	10	27.21	14.34	205.55	4.53	9.88	60.96
Normo	HAM	66	15.54	11.90	141.73	1.48	0.43	59.30
Baja	HAM	77	9.76	9.44	89.16	1.08	0.36	46.70

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	RFA	10	21.00	7.66	58.67	2.42	9.00	36.00
Normo	RFA	65	11.17	7.25	52.61	0.90	0.00	35.00
Baja	RFA	74	5.68	4.38	19.21	0.52	0.00	32.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	E2	9	33.22	11.05	122.19	3.68	15.00	46.00
Normo	E2	40	51.20	32.47	1054.28	5.20	16.00	225.00
Baja	E2	44	60.98	55.82	3116.04	8.51	10.00	260.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	FSH	10	4.82	1.39	1.94	0.44	1.55	6.30
Normo	FSH	66	7.42	3.47	12.07	0.43	2.22	20.60
Baja	FSH	77	9.13	8.84	78.19	1.03	2.07	58.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	LH	1	3.98	0.00	0.00	0.00	3.98	3.98
Normo	LH	41	6.70	4.11	16.93	0.64	1.50	20.70
Baja	LH	60	6.55	7.58	57.39	0.98	0.70	58.60

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	OvocitRecup	10	19.30	4.76	22.68	1.51	15.00	28.00
Normo	OvocitRecup	66	8.30	2.60	6.77	0.32	5.00	14.00
Baja	OvocitRecup	77	2.28	1.49	2.23	0.17	0.00	4.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	OvocitM2	10	13.20	5.96	35.51	1.88	7.00	24.00
Normo	OvocitM2	64	5.31	3.11	9.68	0.39	0.00	13.00
Baja	OvocitM2	74	1.18	1.20	1.43	0.14	0.00	4.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	EmbrTotal	10	8.50	4.95	24.50	1.57	0.00	19.00
Normo	EmbrTotal	62	3.94	2.51	6.32	0.32	0.00	10.00
Baja	EmbrTotal	75	0.97	1.16	1.35	0.13	0.00	4.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	EmbrG1G2	10	5.90	2.85	8.10	0.90	0.00	10.00
Normo	EmbrG1G2	62	3.23	2.38	5.65	0.30	0.00	10.00
Baja	EmbrG1G2	76	0.89	1.13	1.27	0.13	0.00	5.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Min	Máx
Alta	EmbrOtros	10	2.10	3.51	12.32	1.11	0.00	11.00
Normo	EmbrOtros	62	0.65	1.15	1.31	0.15	0.00	5.00
Baja	EmbrOtros	75	0.19	0.56	0.32	0.06	0.00	3.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	EmbrTrans	10	1.90	0.74	0.54	0.23	0.00	3.00
Normo	EmbrTrans	62	1.87	0.80	0.64	0.10	0.00	3.00
Baja	EmbrTrans	76	0.86	0.95	0.90	0.11	0.00	3.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	etG1	0	sd	sd	sd	sd	sd	sd
Normo	etG1	32	1.22	0.79	0.63	0.14	0.00	3.00
Baja	etG1	38	0.63	0.79	0.62	0.13	0.00	3.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	etG2	0	sd	sd	sd	sd	sd	sd
Normo	etG2	28	0.86	0.93	0.87	0.18	0.00	3.00
Baja	etG2	33	0.48	0.67	0.45	0.12	0.00	2.00

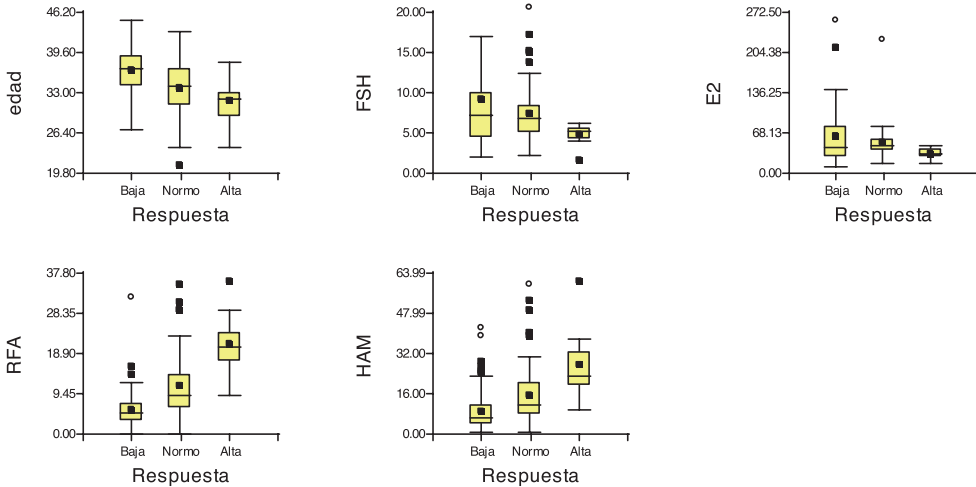
Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	etOtro	0	sd	sd	sd	sd	sd	sd
Normo	etOtro	24	0.17	0.38	0.14	0.08	0.00	1.00
Baja	etOtro	31	0.45	0.81	0.66	0.15	0.00	3.00

Estadística descriptiva

RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	OvocitOtros	9	5.78	1.79	3.19	0.60	3.00	8.00
Normo	OvocitOtros	24	3.25	1.80	3.24	0.37	0.00	6.00
Baja	OvocitOtros	8	1.25	1.04	1.07	0.37	0.00	3.00

Representamos gráficamente mediante box-plots, las principales variables a estudio:



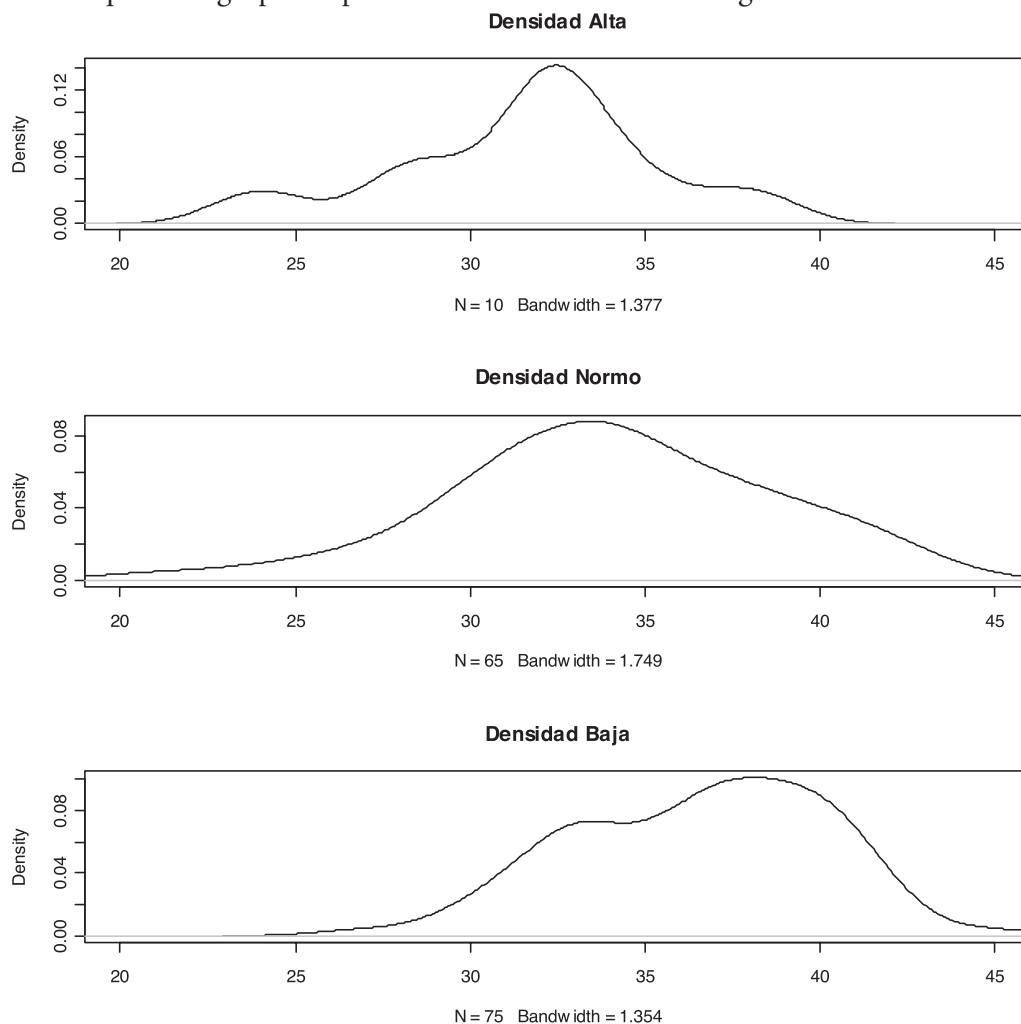
En relación al descriptivo de HAM y RFA, vemos que las medias de las variables coinciden con la bibliografía siendo las altas respondedoras las que más RFA y HAM tienen con respecto a los demás grupos.

Para la variable Edad presentamos algún descriptivo más como los cuartiles para cada nivel de respuesta y unas gráficas de densidad suavizadas:

```

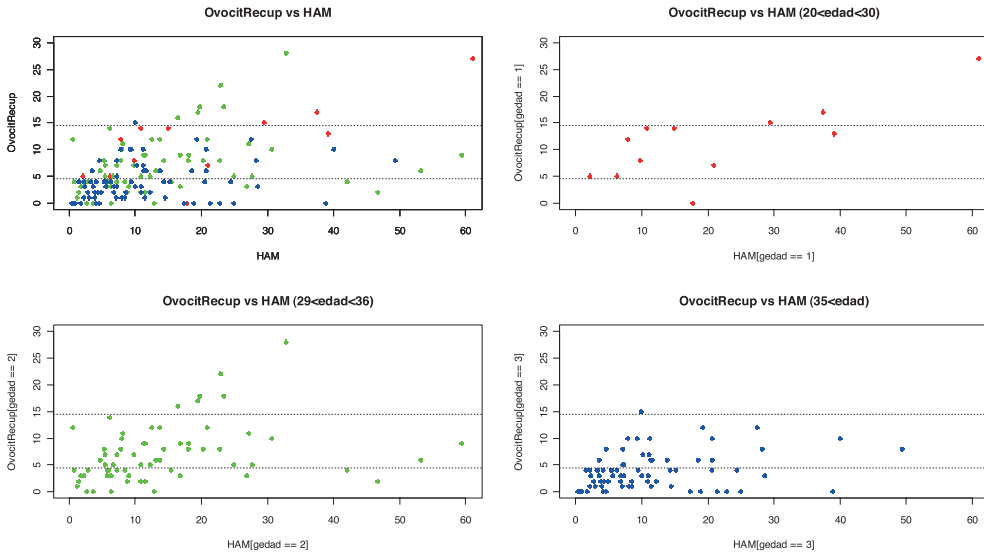
$Alta
[1] 24 29 32 33 38 (min, cuartil1, cuartil2, cuartil3, max)
$Normo
[1] 21 31 34 37 43
$Baja
[1] 27.0 33.5 37.0 39.0 45.0
> quantile(edad[RES1=="Alta"],seq(0,1,0.1), na.rm=T)
0% 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90%
100%
24.0 27.6 28.8 31.1 32.0 32.0 32.4 33.0 33.4 35.3
38.0
> quantile(edad[RES1=="Normo"],seq(0,1,0.1), na.rm=T)
0% 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90%
100%
21.0 28.4 31.0 31.2 33.0 34.0 35.0 36.0 38.0 40.0
43.0
> quantile(edad[RES1=="Baja"],seq(0,1,0.1), na.rm=T)
0% 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90%
100%
27.0 32.0 33.0 34.0 36.0 37.0 38.0 39.0 40.0 41.0
45.0
    
```

Parece que los 3 grupos respuesta no están en el mismo rango de edades:



Se observa que las edades en cada nivel de respuesta no están en el mismo rango, siendo como era de preveer, las alta respondedoras las mas jóvenes, seguidas de las normo y por último, las baja respondedoras.

En las siguientes cuatro gráficas relacionamos la variable respuesta RES1, por tanto los ovocitos recuperados, con la HAM y la variable edad:

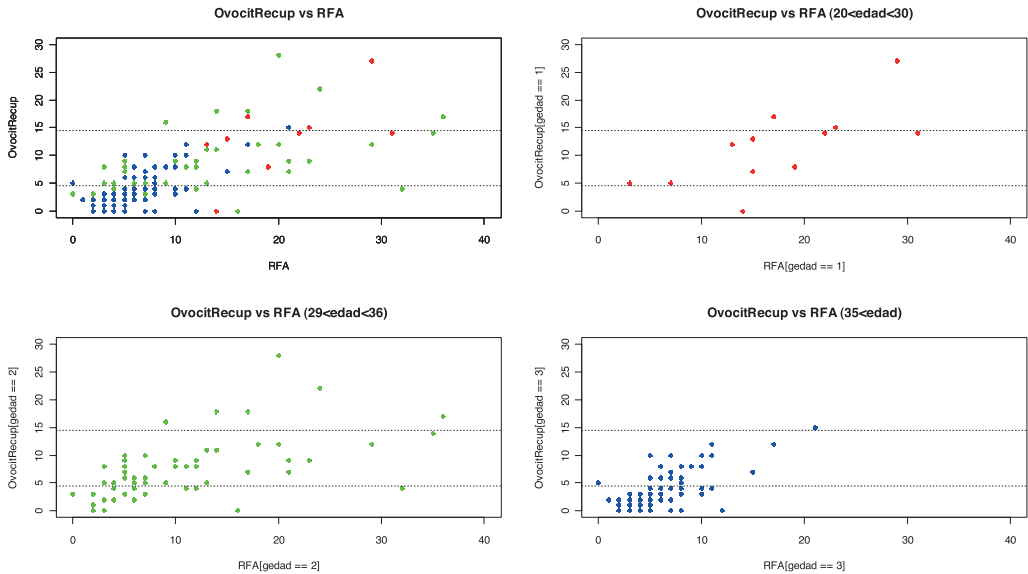


En el grupo de mujeres entre 20 y 30 años, observamos que los valores de HAM son mayores y se relacionan con un número de ovocitos recuperados mayor. En las gráficas siguientes que corresponden a los grupos entre 29-35 y >35, observamos que los valores de HAM se agrupan en niveles más bajos, y se relacionan con menor número de ovocitos recuperados. Aunamos los resultados de los tres grupos en la gráfica superior izquierda, que nos indica por tanto que a menor edad y mayor concentración de HAM, mayor es la respuesta, es decir, el número de ovocitos recuperados.

Las tres gráficas nos indican que al comparar ovocitos recuperados y HAM por grupos de edad, la dispersión no muestra significación estadística. Ello significa que las variables HAM y ovocitos recuperados se comportan igual en los distintos grupos de edad y por tanto las podremos comparar estadísticamente. Este punto lo analizaremos con más detalle en el siguiente apartado.

En el grupo de menor edad, observamos un punto muy alejado del resto, que corresponde a un valor de HAM mayor de 60. Pensamos que se trata de un error de laboratorio. Aunque incluimos el valor en el estudio, sobretodo para el análisis descriptivo, observaremos que este valor modifica el resultado de algunos análisis y por tanto el grupo altas respondedoras será excluido para realizar determinadas valoraciones.

En el siguiente grupo de gráficas, relacionamos la variable respuesta (ovocitos recuperados) y la edad con el recuento de folículos antrales (RFA):



Como ocurre con la HAM, observamos que a menor edad, mayor es el RFA y el número de ovocitos recuperados. En este caso, al comparar ovocitos recuperados y RFA por grupos de edad, la dispersión tampoco muestra significación estadística, indicando que ambas variables se comportan igual en los distintos grupos de edad y que pueden ser comparadas estadísticamente.

3.2 ANÁLISIS DE LA EDAD, RFA Y HAM SEGÚN LOS GRUPOS DE RESPUESTA OVÁRICA.

Vamos a considerar como variable respuesta (RES2) la definida en el apartado de Método. Dicha variable tiene cuatro niveles de clasificación en función de los ovocitos recuperados en la inducción: baja respuesta canceladas (grupo1), baja respuesta no-canceladas (grupo2), normorespuesta (grupo3) y alta-respondedoras (grupo4). En este primer apartado vamos a contrastar si la edad media y los niveles de RFA y HAM son significativamente diferentes entre los grupos 1 y 2. En caso negativo, realizaremos los análisis considerando una variable respuesta con 3 niveles (baja, normo y alta respondedoras), a la que llamaremos RES1, y que ya mostramos en los siguientes resultados para facilitar su comprensión.

Aunque el objeto de nuestra tesis es la HAM, realizaremos idénticos análisis con el RFA, pues ambos han sido considerados por la mayoría de los autores como los principales marcadores de reserva ovárica por delante de otros TRO. Por tanto realizaremos una comparación detallada del valor de ambos.

3.2.1 EDAD

Aplicamos un ANOVA de una vía considerando la edad como variable independiente y RES1 y RES2 como variable respuesta. Obtenemos:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
edad	153	0.13	0.12	11.48

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
edad	153	0.14	0.12	11.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	362.57	2	181.29	11.13	<0.0001
RES1	362.57	2	181.29	11.13	<0.0001
Error	2394.93	147	16.29		
Total	2757.50	149			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	386.02	3	128.67	7.93	0.0001
RES2	386.02	3	128.67	7.93	0.0001
Error	2401.50	148	16.23		
Total	2787.52	151			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.86643

Error: 16.2920 gl: 147

RES1	Medias	n	
Alta	31.60	10	A
Normo	33.97	66	A
Baja	36.55	77	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.01641

Error: 16.2263 gl: 148

RES2	Medias	n	
Alta	31.60	10	A
Normo	33.97	66	A
BajaNoCanc	36.39	44	B
BajaCanc	36.91	33	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

Mediante un ANOVA de una vía (Oneway ANOVA) podemos decir que la edad media de las mujeres del grupo *Baja* en RES1 es significativamente mayor que la de los grupos *Normo* y *Alta*. Entre estos dos grupos no detectamos diferencias significativas. En cuanto a RES2 podemos añadir que no detectamos diferencias de edad entre los niveles de *BajaNoCanc* y *BajaCanc*.

De este análisis deducimos que la edad media no es la misma en los cuatro grupos ($p < 0.0001$) aunque no diferenciamos significativamente al 5%, la edad media del grupo 1 (36.91 años) y la del grupo 2 (36.39 años), y tampoco la del grupo 3 (33.97 años) y la del grupo 4 (31.60 años). Así pues, la edad es un parámetro clínico de interés en reserva ovárica sólo para bajas respondedoras con/sin cancelación.

3.2.2. HAM

Aplicamos un ANOVA de una vía (Oneway ANOVA) y buscamos diferencias entre los distintos niveles de repuesta:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HAM	153	0.15	0.14	81.71

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HAM	153	0.15	0.14	81.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3210.93	2	1605.46	13.49	<0.0001
RES1	3210.93	2	1605.46	13.49	<0.0001
Error	17607.81	148	118.97		
Total	20818.73	150			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3248.24	3	1082.75	9.09	<0.0001
RES2	3248.24	3	1082.75	9.09	<0.0001
Error	17741.56	149	119.07		
Total	20989.80	152			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.03226

Error: 118.9717 gl: 148

RES1	Medias	n		
Baja	9.76	77	A	
Normo	15.54	66		B
Alta	27.21	10		C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.44160

Error: 119.0709 gl: 149

RES2	Medias	n			
BajaNoCanc	9.62	44	A		
BajaCanc	9.91	33	A		
Normo	15.54	66			B
Alta	27.21	10			C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mediante un ANOVA de una vía (Oneway ANOVA) detectamos diferencias significativas de HAM entre los niveles consecutivos de RES1. En cambio, no detectamos diferencias significativas entre los niveles de HAM de *BajaNoCanc* y *BajaCanc* de RES2.

¿Existe relación lineal significativa entre edad y HAM?

Mediante una regresión lineal simple se detecta una relación lineal significativa entre *HAM* y la *edad* ($p=0.0341$). La relación entre estas variables es significativa pero el modelo lineal ajusta bastante mal ya que sólo explica el 3% de la variabilidad de los datos ($R^2=0.03$).

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
HAM	151	0.03	0.02	141.02	1174.65	1183.70

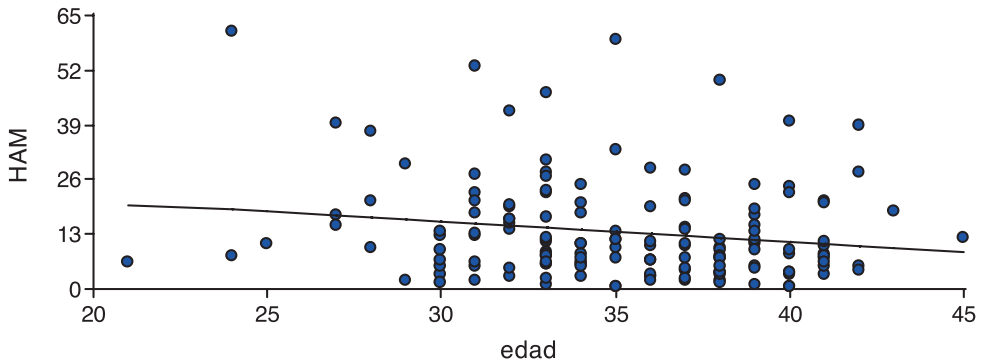
Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coeff	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	30.04	7.83	14.56	45.52	3.83	0.0002	
edad	-0.47	0.22	-0.91	-0.04	-2.14	0.0341	5.55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

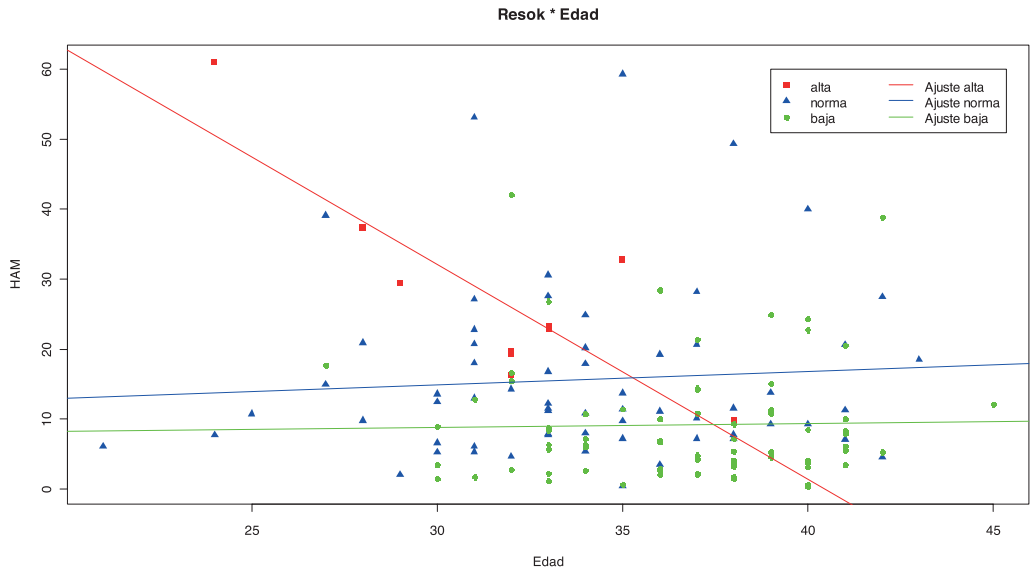
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	623.35	1	623.35	4.57	0.0341
edad	623.35	1	623.35	4.57	0.0341
Error	20308.70	149	136.30		
Total	20932.05	150			

Gráficamente:



Hemos detectado diferencias de HAM entre los grupos respuesta y en el análisis anterior sale significativa la relación entre HAM y edad. ¿Es la edad sólo la que produce las diferencias de HAM o la variable respuesta está realmente relacionada con HAM (que es nuestro objetivo)?

Para contestar esta pregunta comenzamos como siempre, viendo un gráfico de los datos. Hemos representado los valores de HAM de todas las mujeres del ensayo pero diferenciándolos según el grupo respuesta al que pertenecen. Por último, hemos añadido los ajustes lineales obtenidos mediante una regresión lineal en cada uno de los grupos de forma independiente. A simple vista parece que no existe relación lineal entre HAM y Edad para las mujeres normo y bajo respondedoras. Además, la relación lineal significativa detectada al analizar todos los datos juntos seguramente viene inducida sólo por el grupo *alta* (que además tiene sólo 10 datos).



Analíticamente, aplicamos un Análisis de la Covarianza (ANCOVA) con *HAM* como variable respuesta, *Resok* como factor principal y *Edad* como covariable. Gráficamente, estamos comprobando si existe relación lineal entre *HAM* y *Edad* y si esta relación es la misma en los tres grupos de *Res1*.

Obtenemos:

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES1	2	143	7.03	0.0012
edad	1	143	8.37	0.0044
edad*RES1	2	143	5.65	0.0043

El análisis indica que existe relación lineal entre *HAM* y *edad* ($p=0.0044$) pero como la interacción sale significativa ($p=0.0043$) nos está indicando que la relación no es la misma en cada grupo respuesta (como hemos visto en la gráfica). Así pues, no tiene sentido comparar los grupos respuesta a través de la *edad*.

Si eliminamos el nivel *Alta* de RES1, comprobamos que la interacción desaparece ($p=0.6047$) indicando que la relación entre *HAM* y *Edad* es la misma para las mujeres en *Normo* y *Baja* respuesta.

Tests de tipo 3 de efectos fijos

Efecto	Num		Den		F-Valor	Pr > F
	DF		DF			
RES1	1		135		0.02	0.8800
edad	1		135		0.05	0.8229
edad*RES1	1		135		0.27	0.6047

Como la interacción no ha salido significativa, la eliminamos del modelo y re-analizamos. De este nuevo análisis deducimos que no existe relación lineal entre HAM y la Edad para los niveles de *Normo* y *Baja* ($p=0.7528$). Seguimos detectando diferencias significativas entre el HAM de *Normo* y *Baja* de RES1 ($p=0.0023$):

Tests de tipo 3 de efectos fijos

Efecto	Num		Den		F-Valor	Pr > F
	DF		DF			
RES1	1		136		9.70	0.0023
edad	1		136		0.10	0.7528

Ahora ya queda claro que no existe relación entre *HAM* y *edad* ($p=0.7528$) y que se detectan diferencias significativas entre las baja y las normo respondedoras en cuanto a sus niveles de HAM.

En conclusión, este análisis de la covarianza muestra que la variable edad no influye en la relación entre HAM y respuesta, si excluimos el nivel *Alta*, y que la variable respuesta sí está realmente relacionada con la HAM.

Para ver si existen diferencias entre los grupos 1 y 2 de RES2 respecto a la HAM vamos a aplicar un análisis de la covarianza (ANCOVA), es decir, vamos a estimar los valores de HAM para cada nivel de la variable respuesta, pero ajustados por la edad.

Como la interacción entre HAM y RES2 sale significativa ($p=0.0115$) indica que la relación entre HAM y Edad no es la misma en todos los niveles de respuesta. Si eliminamos el nivel *Alta* de RES2, comprobamos que la interacción desaparece ($p=0.7785$):

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES2	2	135	0.11	0.8925
edad	1	135	0.01	0.9369
edad*RES2	2	135	0.25	0.7785

Como la interacción no sale significativa, la eliminamos del modelo y re-analizamos. Obtenemos:

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES2	2	137	4.92	0.0087
edad	1	137	0.09	0.7642

Medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES2	Estimador	estándar	Error		
				DF	Valor t	Pr > t
RES2	BajaCanc	9.9222	1.9025	137	5.22	<.0001
RES2	BajaNoCa	9.5548	1.6363	137	5.84	<.0001
RES2	Normo	15.7046	1.3833	137	11.35	<.0001

Diferencias de medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES2	_RES2	Estimador	estándar	Error		
					DF	Valor t	Pr > t
RES2	BajaCanc	BajaNoCa	0.3674	2.4795	137	0.15	0.8824
RES2	BajaCanc	Normo	-5.7824	2.3987	137	-2.41	0.0173
RES2	BajaNoCa	Normo	-6.1498	2.1759	137	-2.83	0.0054

De este nuevo análisis deducimos que no existe relación lineal entre HAM y la Edad para los niveles de *Normo*, *BajaNoCanc* y *BajaCanc* ($p=0.7642$). En cuanto a los niveles de RES2, detectamos diferencias significativas en los niveles de HAM entre *Normo* y *BajaNoCanc* ($p=0.0054$) y entre *Normo* y *BajaCanc* ($p=0.0173$) pero no entre *BajaNoCanc* y *BajaCanc* ($p=0.8824$).

3.2.3. RFA

En este caso aplicamos un test de Kruskal-Wallis para contrastar el RFA entre los distintos niveles de la variable respuesta. Aplicamos este test no paramétrico en lugar del ANOVA de una vía porque en este caso no podemos asumir la normalidad de los residuos.

Obtenemos:

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	RES1	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RFA	Alta	10	21.00	7.66	20.50	53.14	<0.0001
RFA	Baja	74	5.68	4.38	5.00		
RFA	Normo	65	11.17	7.25	9.00		

Trat.	Ranks
Baja	51.83 A
Normo	93.47 B
Alta	132.60 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	RES2	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RFA	Alta	10	21.00	7.66	20.50	54.37	<0.0001
RFA	BajaCanc	32	4.88	3.56	4.00		
RFA	BajaNoCanc	42	6.17	4.82	5.00		
RFA	Normo	65	11.17	7.25	9.00		

Trat.	Ranks
BajaCanc	43.39 A
BajaNoCanc	56.79 A
Normo	93.47 B
Alta	132.60 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Detectamos diferencias significativas de RFA entre los niveles consecutivos de RES1. En cambio, no detectamos diferencias significativas entre los niveles de RFA de *BajaNoCanc* y *BajaCanc* de RES2.

¿Existe relación lineal significativa entre edad y RFA?

Mediante una regresión lineal simple se detecta una relación lineal significativa entre RFA y la edad ($p < 0.0001$). La relación entre estas variables también sale significativa. En este caso, el porcentaje de varianza explicada por el modelo es del 18% ($R^2 = 0.18$).

Análisis de regresión lineal

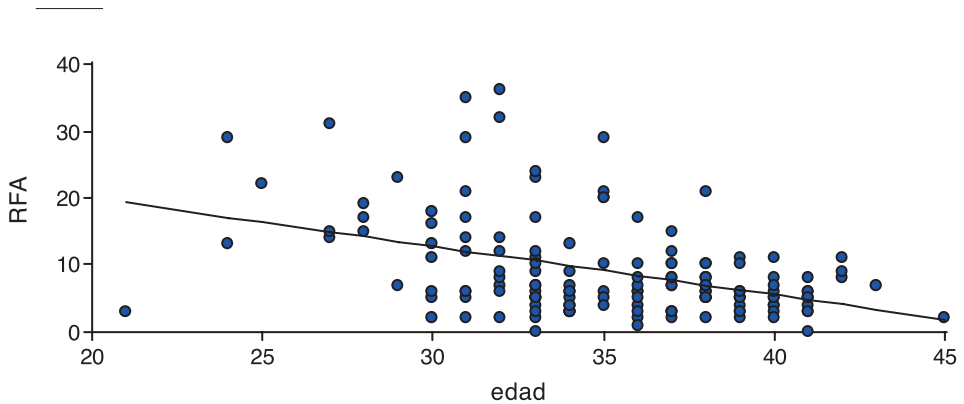
Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
RFA	147	0.18	0.18	45.63	978.02	986.99

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	34.53	4.51	25.62	43.44	7.66	<0.0001	
edad	-0.72	0.13	-0.98	-0.47	-5.68	<0.0001	33.08

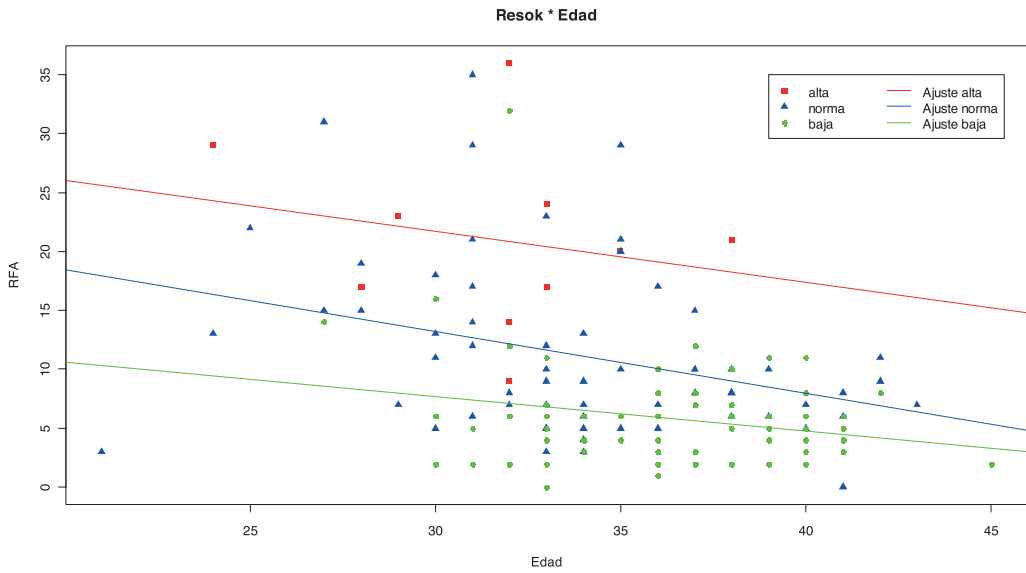
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1426.55	1	1426.55	32.29	<0.0001
edad	1426.55	1	1426.55	32.29	<0.0001
Error	6405.71	145	44.18		
Total	7832.26	146			



Igual que con HAM, hemos detectado diferencias de RFA entre los grupos respuesta y una relación lineal significativa entre RFA y edad. Como antes, nos preguntamos: ¿Es la edad sólo la que produce las diferencias de RFA o la variable respuesta está realmente relacionada con RFA?

Como anteriormente comenzamos representando los valores de RFA de todas las mujeres del ensayo pero diferenciándolos según el grupo respuesta al que pertenecen. Añadimos también los ajustes lineales obtenidos mediante una regresión lineal en cada uno de los grupos de forma independiente. En este caso, igual sí existe relación lineal entre *RFA* y *Respuesta* y posiblemente, no sean significativamente diferentes.



Vamos a estimar los valores de RFA para cada nivel de la variable respuesta, pero ajustados por la edad.

Quisieramos comentar que en cuanto a RFA, realmente no deberíamos aplicar un ANCOVA puesto que RFA no se distribuye perfectamente de forma normal. Deberíamos aplicar una regresión de Poisson o una regresión Binomial Negativa ajustada por Edad. En cualquier caso, como el análisis de la varianza es muy robusto, con nuestros datos, las conclusiones de los análisis son las mismas. Así pues, como el análisis de la varianza es más habitual y se comprende mejor, presentamos resultados del ANCOVA con RFA.

Empezamos aplicando un ANCOVA sobre RFA con RES1 como factor principal y Edad como covariable, junto a su interacción. Como no sale significativa ($p=0.7197$) nos indica que la relación entre el RFA y la Edad es la misma en todos los niveles de RES1.

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES1	2	139	1.02	0.3640
edad	1	139	4.90	0.0285
edad*RES1	2	139	0.33	0.7197

Eliminamos la interacción y re-analizamos. Obtenemos que sí existe una relación lineal entre el RFA y la Edad ($p=0.0005$). Como es la misma en los tres niveles de RES1, podemos compararlos. Detectamos diferencias significativas entre cada pareja de niveles de RES1 ($p<0.0001$ en cada comparación).

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES1	2	141	23.05	<.0001
edad	1	141	12.78	0.0005

Medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES1	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr > t
RES1	Alta	19.5110	1.8935	141	10.30	<.0001
RES1	Baja	6.3543	0.7157	141	8.88	<.0001
RES1	Normo	10.7302	0.7420	141	14.46	<.0001

Diferencias de medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES1	_RES1	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr > t	Ajuste	Adj P
RES1	Alta	Baja	13.1568	2.0605	141	6.39	<.0001	Bonferroni	<.0001
RES1	Alta	Normo	8.7808	2.0064	141	4.38	<.0001	Bonferroni	<.0001
RES1	Baja	Normo	-4.3760	1.0535	141	-4.15	<.0001	Bonferroni	0.0002

Con RES2 tampoco sale la interacción significativa ($p= 0.8720$).

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES2	3	139	0.70	0.5532
edad	1	139	5.61	0.0193
edad*RES2	3	139	0.23	0.8720

Eliminamos la interacción y re-analizamos. Obtenemos que sí existe una relación lineal entre el RFA y la Edad ($p=0.0005$). Como es la misma en los cuatro

niveles de RES2, podemos compararlos. Detectamos diferencias significativas entre cualquier pareja de niveles de RES2 salvo entre *BajaNoCanc* y *BajaCanc* ($p=0.4820$)

Tests de tipo 3 de efectos fijos

Efecto	Num	Den	F-Valor	Pr > F
	DF	DF		
RES2	3	142	15.85	<.0001
edad	1	142	12.87	0.0005

Medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES2	Estimador	estándar	Error		
				DF	Valor t	Pr > t
RES2	Alta	19.4915	1.8858	142	10.34	<.0001
RES2	BajaCanc	5.7252	1.0671	142	5.37	<.0001
RES2	BajaNoCa	6.6970	0.9091	142	7.37	<.0001
RES2	Normo	10.7082	0.7397	142	14.48	<.0001

Diferencias de medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES2	_RES2	Estimador	estándar	DF	Valor t	Pr > t	Error	
								Ajuste	Adj P
RES2	Alta	BajaCanc	13.7663	2.2091	142	6.23	<.0001	Bonferroni	<.0001
RES2	Alta	BajaNoCa	12.7945	2.1230	142	6.03	<.0001	Bonferroni	<.0001
RES2	Alta	Normo	8.7833	1.9969	142	4.40	<.0001	Bonferroni	0.0001
RES2	BajaCanc	BajaNoCa	-0.9718	1.3784	142	-0.71	0.4820	Bonferroni	1.0000
RES2	BajaCanc	Normo	-4.9830	1.3215	142	-3.77	0.0002	Bonferroni	0.0014
RES2	BajaNoCa	Normo	-4.0112	1.1893	142	-3.37	0.0010	Bonferroni	0.0058

Al comparar los grupos de baja respuesta en relación a estas variables de interés (Edad, RFA y HAM) se observa claramente que no existen diferencias significativas entre ellos. Así pues, en adelante, trabajaremos con un único grupo denominado *Baja Respuesta* que compararemos con *Normo* y *Alta Respuesta*. A esta variable la definimos como RES1. Este resultado, como se menciona, es absolutamente lógico, pues clínicamente la diferenciación entre baja respuesta cancelada y no cancelada es de escasa trascendencia.

3.3. ANÁLISIS DEL VALOR PREDICTIVO PARA BAJA RESPUESTA.

3.3.1. FSH vs RES1

- Comenzamos con un breve descriptivo:

Estadística descriptiva

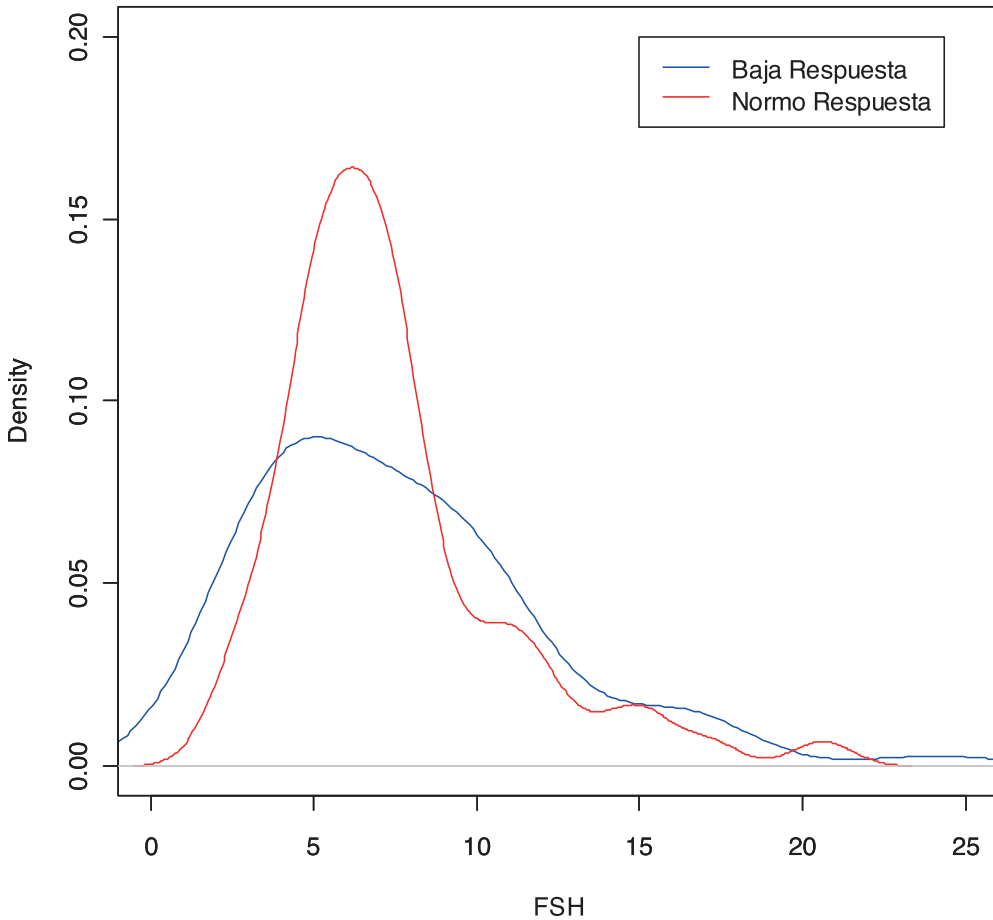
RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	FSH	10	4.82	1.39	1.94	0.44	1.55	6.30
Normo	FSH	66	7.42	3.47	12.07	0.43	2.22	20.60
Baja	FSH	77	9.13	8.84	78.19	1.03	2.07	58.00

- Cuartiles para bajas y normorespondedoras:

\$Baja	min,	cuartil 1,	cuartil	2=mediana,	cuartil3,
<u>max</u>					
	[1]	2.07	4.30	7.00	10.00
58.00					
\$Normo					
	[1]	2.22	5.06	6.76	8.20
<u>20.60</u>					

Representamos gráficamente los valores de FSH de las pacientes con baja y normo respuesta mediante curvas de densidad suavizadas. No hemos incluido las de alta respuesta por disponer de muchos menos valores.

Curvas de densidad suavizadas para la FSH



En cuanto al análisis estadístico, observamos que la media de FSH aumenta al reducirse la respuesta y que la varianza en el grupo de baja-respondedoras es 40 veces superior a la varianza del grupo alta respuesta. Así pues, decidimos aplicar un ANOVA de una vía con varianzas heterogéneas. Obtenemos:

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES1	2	52.7	12.68	<.0001

Diferencias de medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES1	_RES1	Estimador	Error		Valor t	Pr > t	Ajuste	Adj P
				estándar	DF				
RES1	Alta	Baja	-4.3153	1.1181	80.3	-3.86	0.0002	Bonferroni	0.0009
RES1	Alta	Normo	-2.6027	0.6137	30.3	-4.24	0.0002	Bonferroni	0.0003
RES1	Baja	Normo	1.7126	1.1133	97.2	1.54	0.1272	Bonferroni	0.3899

De este análisis deducimos que el grupo de mujeres de alta respuesta tienen niveles de FSH significativamente menores que en normo y baja respuesta.

No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de FSH de baja y normorespuesta ($p=0.1272$).

Las medias para alta y normo respondedoras están dentro de los valores considerados de normalidad (4,82 y 7,42 UI para altas y normo respondedoras) y las desviaciones estándar se mantienen ($\pm 1,39$ para altas respondedoras y $\pm 3,47$ para normo respondedoras), es decir:

- Los valores en alta respondedora con sus desviaciones son muy constantes
- Solo muy pocos casos de normo respondedoras se encuentran por encima del rango superior de normalidad
- No así en las bajas respondedoras, donde la media (9,13 UI) está muy próxima al rango superior de normalidad aceptado para la literatura y por nosotros (<10 UI). Además, y como hemos mencionado la varianza es enorme ($\pm 8,84$), 40 veces superior, lo que significa dos cosas:
 - Que numerosos casos muestran valores iniciales de FSH que deberían recomendar no iniciar la estimulación
 - Que valores que aun siendo de normalidad se acompañan de baja o muy baja respuesta.

Para estudiar la capacidad de la variable FSH para discriminar entre mujeres baja respondedoras y el resto (normo y alta respuestas), realizamos una curva ROC. Obtenemos:

Sample size: 153

Sample prevalence: 0.5132

Non-parametric AUC (trapezoidal method) and its 0.95 confidence limits (DeLong method)

Area under ROC curve: **0.5324 [0.4395 - 0.6253]**

T e s t
summary-----

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	SD
Overall summary	1.55	4.900	6.760	8.090	9.525	58.0	6.68235
Without disease	2.07	4.312	7.100	9.132	9.925	58.0	8.84230

Baja Resp.

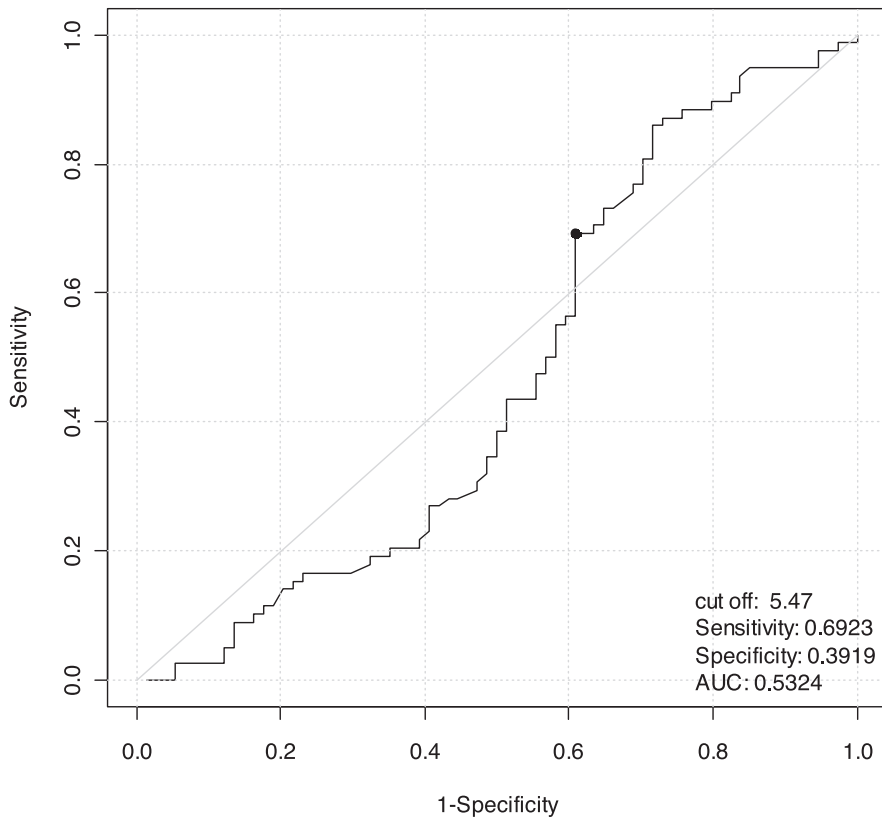
With disease	1.55	5.000	6.275	7.101	8.092	20.6	3.37760
--------------	------	-------	--------------	-------	-------	------	---------

Normo+Alta Resp.

Best cut-off estimations with 0.95 confidence limits -----

Best cut-off estimations with 0.95 confidence limits -----

	test.values	Sensitivity	Se.inf.cl	Se.sup.cl	Specificity	Sp.inf.cl	Sp.sup.cl	PLR	PLR.inf.cl	PLR.sup.cl
Max. Accuracy	4.39	0.8718	0.7798	0.9288	0.2703	0.1823	0.3809	1.19	0.97	1.46
Max. DOR	3.50	0.9487	0.8754	0.9799	0.1486	0.0851	0.2469	1.11	0.94	1.30
Min. Error rate	4.39	0.8718	0.7798	0.9288	0.2703	0.1823	0.3809	1.19	0.97	1.46
Max. Accuracy area	5.47	0.6923	0.5829	0.7837	0.3919	0.2886	0.5058	1.14	0.87	1.49
Max. Sens+Spec	4.41	0.8590	0.7649	0.9194	0.2838	0.1937	0.3952	1.20	0.97	1.48
Max. Youden	4.41	0.8590	0.7649	0.9194	0.2838	0.1937	0.3952	1.20	0.97	1.48
Se=Sp	6.78	0.4359	0.3314	0.5464	0.4459	0.3382	0.5591	0.79	0.57	1.09
Min. ROC distance	5.47	0.6923	0.5829	0.7837	0.3919	0.2886	0.5058	1.14	0.87	1.49
Max. Efficiency	4.41	0.8590	0.7649	0.9194	0.2838	0.1937	0.3952	1.20	0.97	1.48
Min. MCT	4.41	0.8590	0.7649	0.9194	0.2838	0.1937	0.3952	1.20	0.97	1.48



Cut-off that minimizes the distance between the curve and upper left corner.

De este análisis deducimos que la capacidad de la variable FSH para discriminar es baja.

Ciertos rangos se asocian a una escasa reserva ovárica y por tanto cabría esperar una baja respuesta. Sin embargo la varianza en sus niveles es muy grande, y por tanto no sería recomendable su determinación seriada. Aún así, la determinación de esta hormona sigue formando parte del estudio básico de la pareja estéril.

3.3.2. LH vs RES1

- Resultados descriptivos

Estadística descriptiva

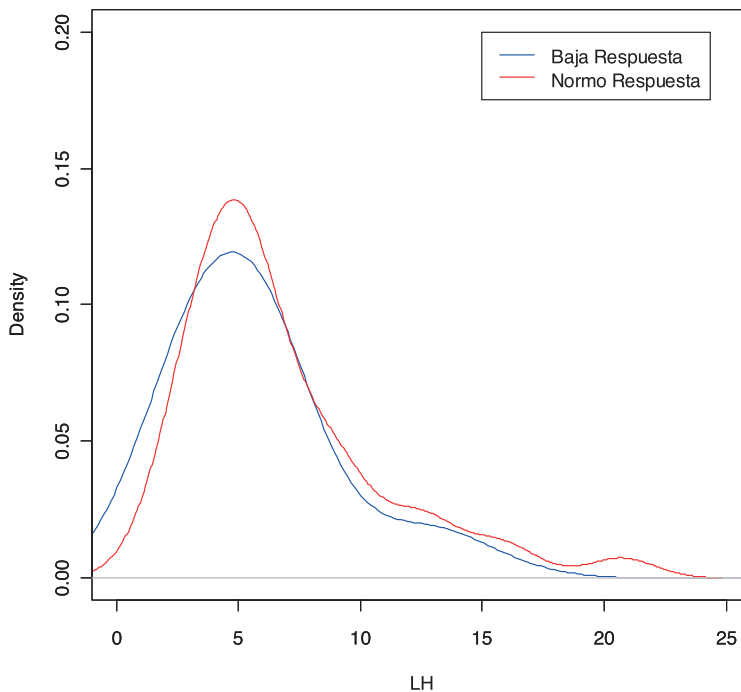
RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	LH	1	3.98	0.00	0.00	0.00	3.98	3.98
Normo	LH	41	6.70	4.11	16.93	0.64	1.50	20.70
Baja	LH	60	6.55	7.58	57.39	0.98	0.70	58.60

- Cuartiles:

```
$Baja min, cuartil1, cuartil2=mediana, cuartil3, max.  
[1] 0.70 3.30 5.38 6.75 58.60  
$Normo  
[1] 1.50 4.09 5.45 8.65 20.70
```

Representamos gráficamente los valores de LH de las pacientes con baja y normo repuesta mediante curvas de densidad suavizadas. No hemos incluido las de alta respuesta por disponer de un sólo valor.

Curvas de densidad suavizadas para la LH



Debido al escaso interés de esta hormona en la alta respondedora sólo disponemos de una observación por ello no se ha incluido en el análisis.

Los grupos de normo y baja respuesta tienen prácticamente la misma media y desviaciones estándar. Aplicando un ANOVA de una vía obtenemos un p-valor de 0.9035. No se detectan diferencias de nivel de LH entre las mujeres normo y baja respondedoras.

Como en el caso de la FSH la determinación de esta hormona carece de valor en la práctica clínica para conocer la respuesta ovárica

3.3.3. 17 – ESTRADIOL vs RES1

- Resultados descriptivos

Estadística descriptiva

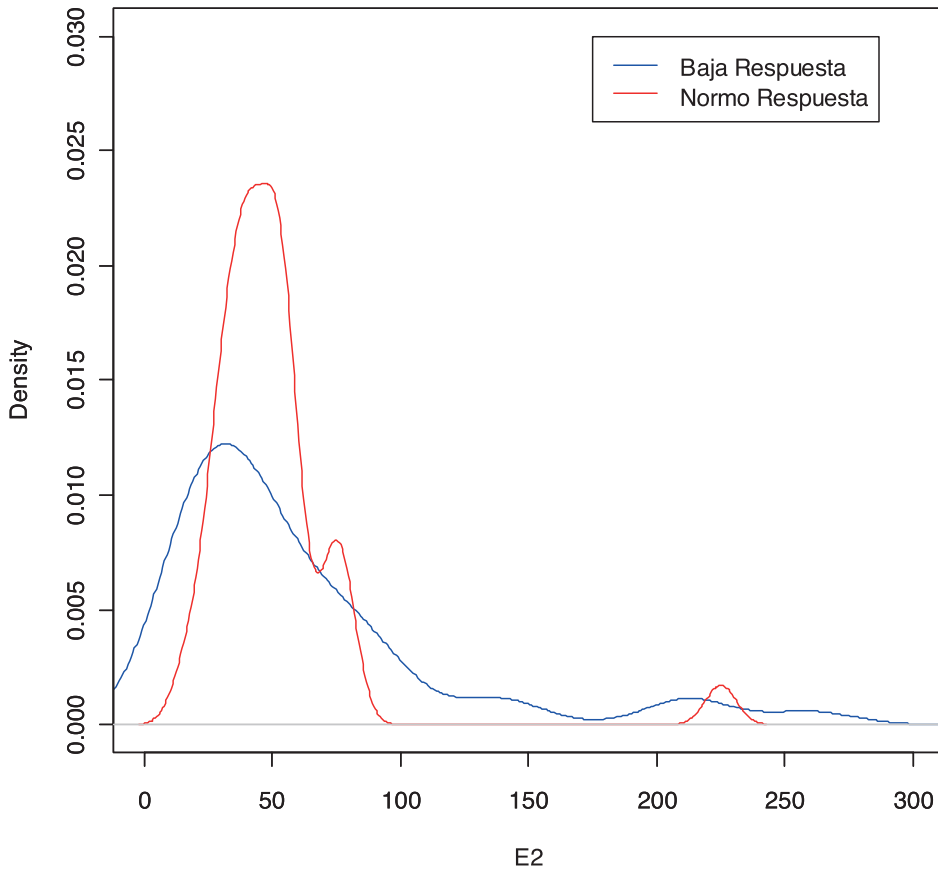
RES1	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	E.E.	Mín	Máx
Alta	E2	9	33.22	11.05	122.19	3.68	15.00	46.00
Normo	E2	40	51.20	32.47	1054.28	5.20	16.00	225.00
Baja	E2	44	60.98	55.82	3116.04	8.51	10.00	260.00

- Cuartiles:

\$Baja	min,	cuartil1,	cuartil2=mediana,	cuartil3,	max.
[1]	10.0	24.0	42.4	80.0	260.0
\$Normo					
[1]	16.0	37.5	48.0	56.0	225.0

Representamos gráficamente los valores de Estradiol de las pacientes con baja y normo respuesta mediante curvas de densidad suavizadas. No hemos incluido las de alta respuesta por disponer como con la FSH de menos valores.

Curvas de densidad suavizadas para la E2



Al igual que FSH, la media de E₂ aumenta al reducirse la respuesta. Los valores medios y la varianza se mantienen dentro de lo considerado como normal (< 75 pg/ml) para la alta y, casi en todos los casos, para la normo respondedora.

Como la varianza del grupo del grupo de baja respuesta es casi es 30 veces superior a la varianza del grupo alta respuesta decidimos aplicar un ANOVA de una vía con varianzas heterogéneas.

Obtenemos :

Tests de tipo 3 de efectos fijos

	Num	Den		
Efecto	DF	DF	F-Valor	Pr > F
RES1	2	50	6.79	0.0025

Diferencias de medias de mínimos cuadrados

Efecto	RES1	_RES1	Estimador	Error		DF	Valor t	Pr > t
				estándar				
RES1	Alta	Baja	-27.7608	9.2760		50	-2.99	0.0043
RES1	Alta	Normo	-17.9775	6.3726		39	-2.82	0.0075
RES1	Baja	Normo	9.7833	9.9749		68.6	0.98	0.3301

De este análisis solo se deduce lo ya descrito igualmente en la literatura, que el grupo de mujeres de alta respuesta tienen niveles de E2 significativamente menores que en normo y baja respuesta. En cuanto a las medias de estos dos últimos grupos, no se diferencian significativamente.

En cualquier caso, hemos realizado la curva ROC para ver su capacidad de discriminación:

Sample size: 93

Sample prevalence: 0.5376

Population prevalence: 0.5376 - same as sample prevalence if not informed

Informed Cost - cost(FN)/cost(FP): 1

Non-parametric AUC (trapezoidal method) and its 0.95 confidence limits (DeLong method)

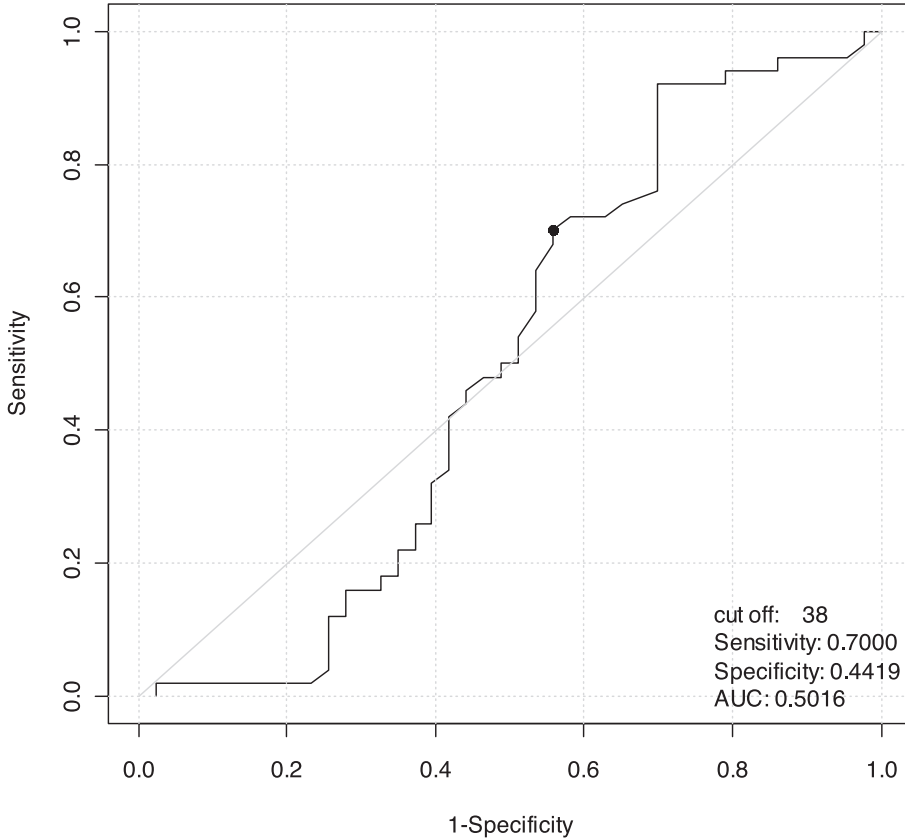
Area under ROC curve: 0.5016 [0.3871 - 0.6162]

Test summary-----

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	SD	
Overall summary	10	32.00	43.97	54.34	59.00	260	44.05840	
Without disease	10	25.00	43.97	60.98	75.50	260	55.82152	Baja Resp.
With disease	15	33.25	43.00	48.64	55.25	225	30.02954	Normo+Alta Resp.

Best cut-off estimations with 0.95 confidence limits -----

	test.values	Sensitivity	Se.inf.cl	Se.sup.cl	Specificity	Sp.inf.cl	Sp.sup.cl	PLR	PLR.inf.cl	PLR.sup.cl
Max. Accuracy	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68
Max. DOR	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68
Min. Error rate	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68
Max. Accuracy area	38.00	0.70	0.5625	0.8090	0.4419	0.3043	0.5889	1.25	0.88	1.77
Max. Sens+Spec	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68
Max. Youden	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68
Se=Sp	43.97	0.50	0.3664	0.6336	0.4884	0.3462	0.6325	0.98	0.65	1.47
Min. ROC distance	38.00	0.70	0.5625	0.8090	0.4419	0.3043	0.5889	1.25	0.88	1.77
Max. Efficiency	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68
Min. MCT	27.00	0.92	0.8116	0.9685	0.3023	0.1860	0.4511	1.32	1.04	1.68



Cut-off that minimizes the distance between the curve and upper left corner.

Se observa una sensibilidad baja, pero aceptable, no así la especificidad. Como en el caso de las tres hormonas anteriores, la determinación de ésta carece de valor en la práctica clínica para conocer la respuesta ovárica.

3.3.4 RELACIÓN RFA VS RESPUESTA

Analizamos la relación entre el RFA y la respuesta a la estimulación ovárica. Presentamos varios modelos de curvas ROC con el RFA como variable explicativa. Tratamos de estimar el valor de la variable respuesta en cada caso.

Modelo 1: Variable Respuesta = Baja vs Normo+Alta
Variable Explicativa = RFA

Para este análisis se crea una variable indicadora (factor) que toma el valor 0 para las pacientes del grupo *baja respuesta* y el valor 1 para el resto (*alta y normo respuesta*).

Sample size: 149

Sample prevalence: 0.5168

Population prevalence: 0.5168 - same as sample prevalence if not informed

Informed Cost - cost(FN)/cost(FP): 1

Non-parametric AUC (trapezoidal method) and its 0.95 confidence limits (DeLong method)

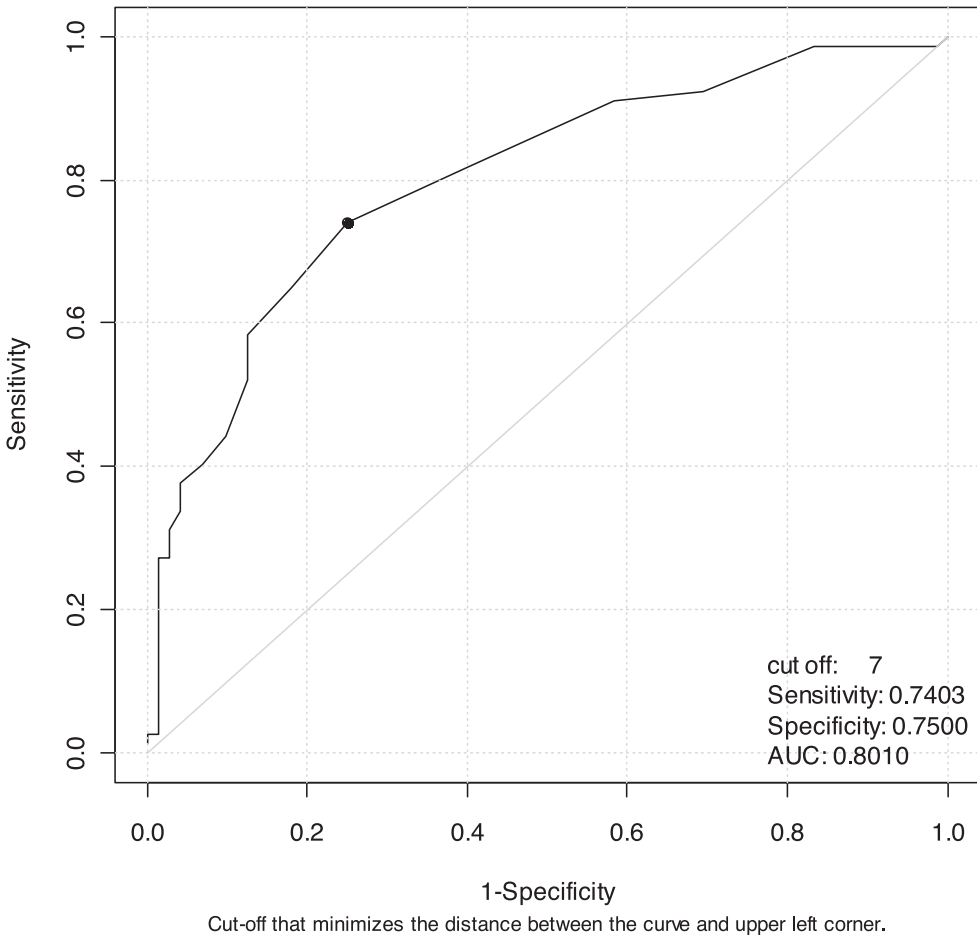
Area under ROC curve: **0.801 [0.7529 - 0.849]**

Test summary-----

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	SD	
Overall summary	0	5	7	9.067	11.00	36	7.29185	
Without disease	0	3	5	5.681	6.25	32	4.38251	bajas respondedoras
With disease	0	6	10	12.230	17.00	36	8.03593	normo+altas respondedoras

Best cut-off estimations with 0.95 confidence limits -----

	test.values	Sensitivity	Se.inf.cl	Se.sup.cl	Specificity	Sp.inf.cl	Sp.sup.cl	PLR	PLR.inf.cl	PLR.sup.cl
Max. Accuracy	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Max. DOR	17	0.2727	0.1858	0.3812	0.9861	0.9254	0.9975	19.62	2.78	138.59
Min. Error rate	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Max. Accuracy area	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Max. Sens+Spec	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Max. Youden	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Se=Sp	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Min. ROC distance	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Max. Efficiency	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51
Min. MCT	7	0.7403	0.6326	0.8251	0.7500	0.6391	0.8356	2.96	1.94	4.51



Un valor de 7 predice la baja respuesta con una sensibilidad del 74% y una especificidad del 75%. O dicho de otro modo, si utilizamos un punto de corte de 7, el RFA discriminaría correctamente la baja respuesta del total de pacientes bajas respondedoras en un 74% de ocasiones, y discriminaría correctamente la normo y/o alta respuesta del total de pacientes normo-altas respondedoras en un 75% de los casos. El área bajo la curva es de 0.8010, y por tanto la capacidad predictiva para baja respuesta del RFA se debe considerar buena.

Modelo 2: Variable Respuesta = BajaCancelada vs Restot
 Variable Explicativa = RFA

En este caso, valoramos la capacidad del RFA para discriminar entre las pacientes con baja respuesta canceladas del resto (bajas respondedoras no canceladas, normorespondedoras y altas respondedoras).

Sample size: 149
 Sample prevalence: 0.7987
 Population prevalence: 0.7987 - same as sample prevalence if not informed
 Informed Cost - cost (FN)/cost (FP): 1

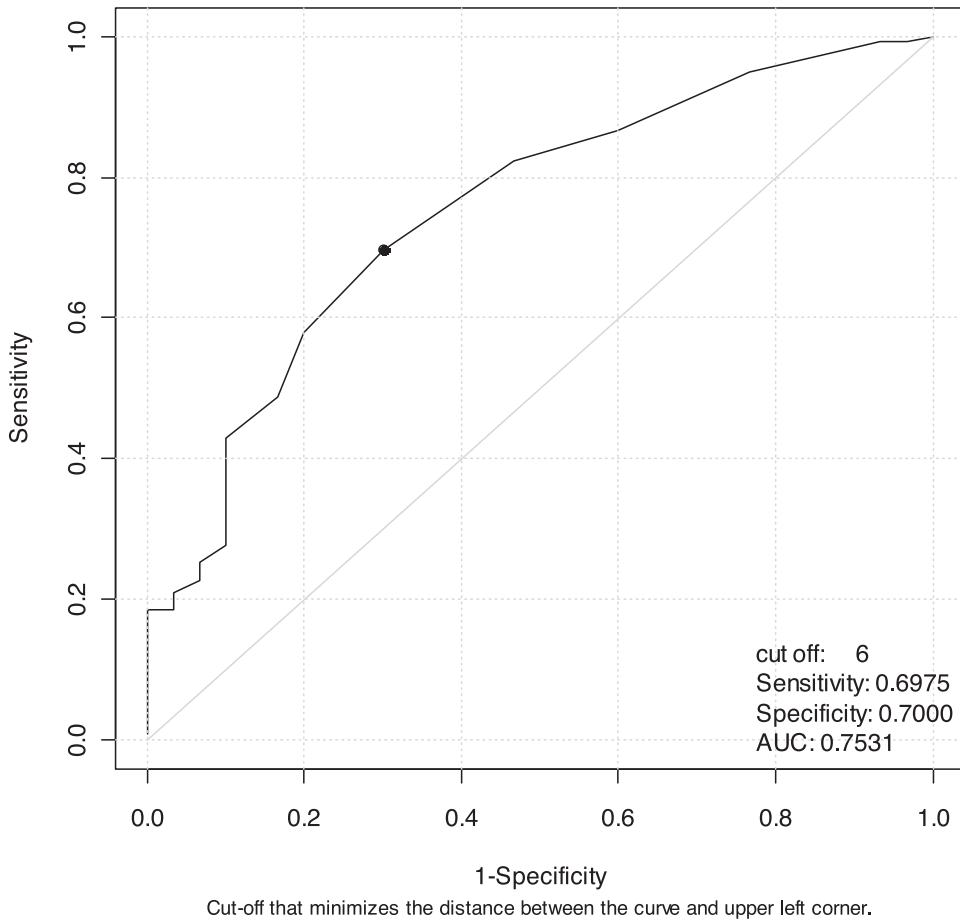
Non-parametric AUC (trapezoidal method) and its 0.95 confidence limits (DeLong method)
 Area under ROC curve: **0.7531** [0.6778 - 0.8284]

Test summary-----

	Min.	1st	Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	SD
Overall summary	0		5	7	9.067	11.0	36	7.29185
Without disease	0		3	4	5.000	6.0	16	3.64833
With disease	0		5	7	10.090	12.5	36	7.62577

Best cut-off estimations with 0.95 confidence limits -----

	test.values	Sensitivity	Se.inf.cl	Se.sup.cl	Specificity	Sp.inf.cl	Sp.sup.cl	PLR	PLR.inf.cl	PLR.sup.cl
Max.Accuracy	2	0.9916	0.9539	0.9985	0.0667	0.0185	0.2132	1.06	0.94	1.19
Max.DOR	2	0.9916	0.9539	0.9985	0.0667	0.0185	0.2132	1.06	0.94	1.19
Min.Error rate	2	0.9916	0.9539	0.9985	0.0667	0.0185	0.2132	1.06	0.94	1.19
Max.Accuracy area	6	0.6975	0.6098	0.7728	0.7000	0.5212	0.8334	2.32	1.33	4.06
Max.Sens+Spec	6	0.6975	0.6098	0.7728	0.7000	0.5212	0.8334	2.32	1.33	4.06
Max.Youden	6	0.6975	0.6098	0.7728	0.7000	0.5212	0.8334	2.32	1.33	4.06
Se=Sp	6	0.6975	0.6098	0.7728	0.7000	0.5212	0.8334	2.32	1.33	4.06
Min.ROC distance	6	0.6975	0.6098	0.7728	0.7000	0.5212	0.8334	2.32	1.33	4.06
Max.Efficiency	2	0.9916	0.9539	0.9985	0.0667	0.0185	0.2132	1.06	0.94	1.19
Min.MCT	3	0.9496	0.8944	0.9767	0.2333	0.1179	0.4093	1.24	1.00	1.54



Un valor de corte de 6 se asocia con una sensibilidad del 69% y una especificidad del 70%. El área bajo la curva correspondiente es de 0.7531. Observamos un área bajo la curva menor respecto al modelo anterior, así como la sensibilidad y especificidad asociadas.

Modelo 3: Variable Respuesta = Baja vs Normo+Alta
 Variable Explicativa = RFA + EDAD

Asociamos al RFA la edad como variable explicativa y comparamos baja respuesta con normo y alta.

En este modelo, aplicamos otra función de R para el cálculo de curvas ROC. En este caso, primero realizamos la regresión logística y después obtenemos la ROC.

La salida de la regresión logística es la siguiente:

```
Logistic regression predicting BajavsNormoAlta
              crude OR(95%CI)    adj. OR(95%CI)  P(Wald's test)  P(LR-test)
RFA (cont. var.) 1.22 (1.12,1.34)  1.2(1.09,1.31) < 0.001         < 0.001

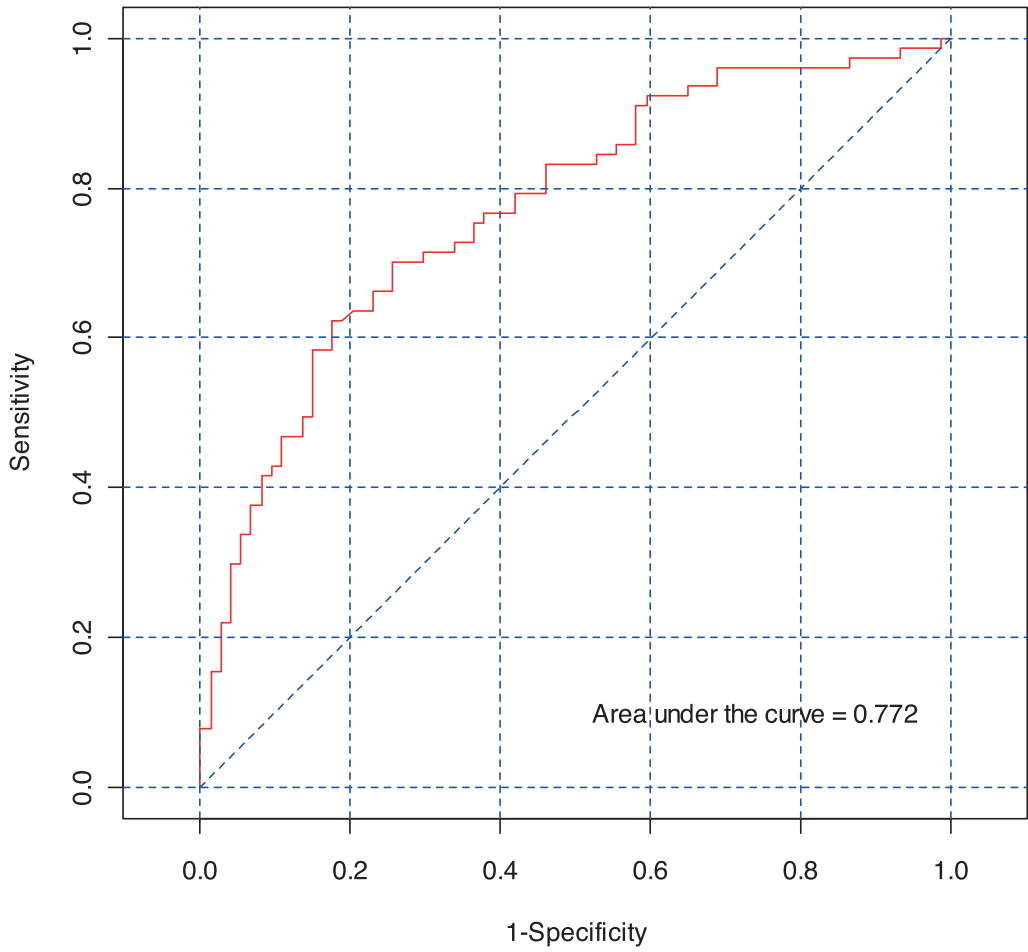
edad (cont. var.) 0.84 (0.77,0.92)  0.91 (0.83,1)  0.056          0.051

Log-likelihood = -81.3719
No. of observations = 147
AIC value = 168.7437
```

Nos indica que tanto el RFA como la EDAD son variables relacionadas significativamente con la variable respuesta aunque la EDAD está al límite de la significación al 5% ($p=0.051$).

La curva ROC no indica cut-off porque tenemos dos variables explicativas pero sí tenemos el valor del área bajo la curva que nos permite comparar con el modelo 4:

BajavsNormoAlta ~ HAM + edad



3.3.5 RELACIÓN HAM VS RESPUESTA

Presentamos de igual manera varios modelos de curvas ROC, con HAM como variable explicativa, para estimar el valor de la variable respuesta en cada caso.

Modelo 4: Variable Respuesta = Baja vs Normo+Alta
Variable Explicativa = HAM

Para este análisis se crea una nueva variable indicadora (factor) que toma el valor 0 para las pacientes del grupo *baja respuesta* y el valor 1 para el resto (*alta y normo respuesta*).

Sample size: 153

Sample prevalence: 0.5033

Population prevalence: 0.5033 - same as sample prevalence if not informed

Informed Cost - cost(FN)/cost(FP): 1

Non-parametric AUC (trapezoidal method) and its 0.95 confidence limits (DeLong method)

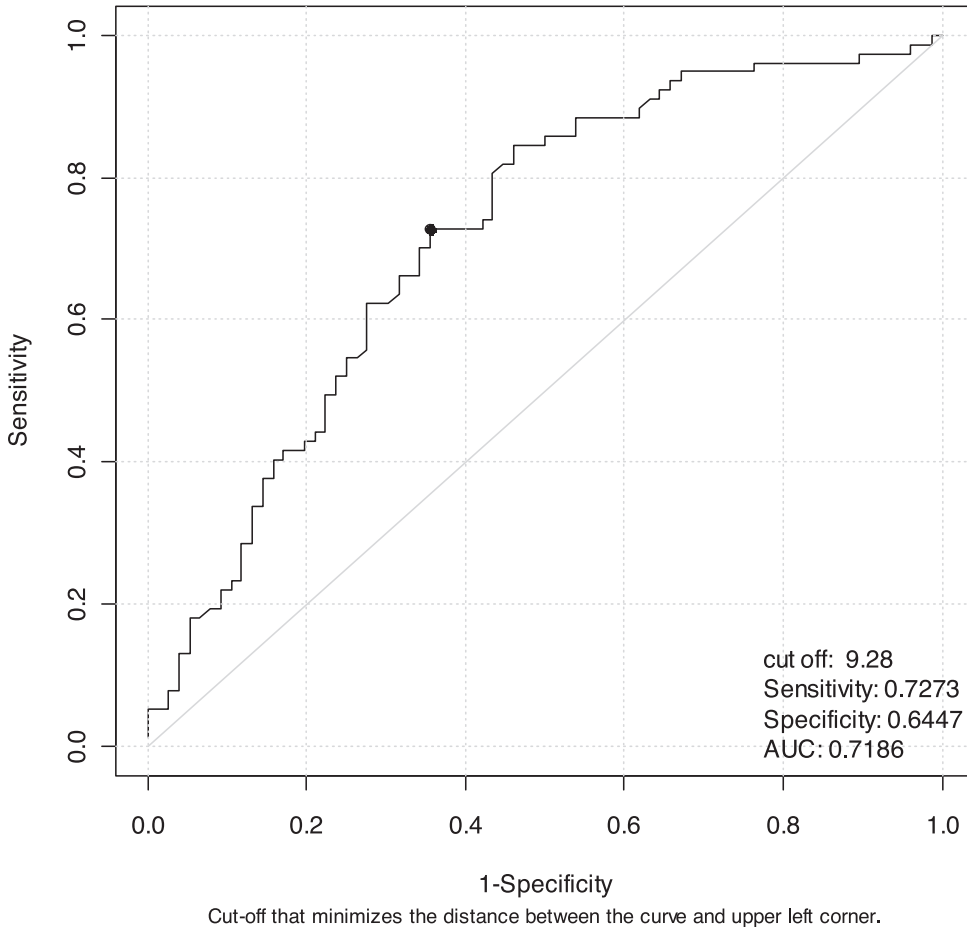
Area under ROC curve: **0.7186 [0.6376 - 0.7997]**

Test summary-----

	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.	SD
Overall summary	0.3607	5.480	10.00	13.350	18.04	60.96	11.75120
Without disease	0.3607	3.598	6.57	9.763	11.68	46.70	9.44264
With disease	0.4329	7.900	12.48	16.890	20.78	60.96	12.75325

Best cut-off estimations with 0.95 confidence limits -----

	test.values	Sensitivity	Se.inf.cl	Se.sup.cl	Specificity	Sp.inf.cl	Sp.sup.cl	PLR	PLR.inf.cl	PLR.sup.cl
Max. Accuracy	7.13	0.8442	0.7471	0.9085	0.5395	0.4282	0.6469	1.83	1.40	2.40
Max. DOR	4.60	0.9481	0.8739	0.9796	0.3289	0.2338	0.4406	1.41	1.18	1.69
Min. Error rate	7.13	0.8442	0.7471	0.9085	0.5395	0.4282	0.6469	1.83	1.40	2.40
Max. Accuracy area	9.28	0.7273	0.6188	0.8142	0.6447	0.5326	0.7430	2.05	1.47	2.87
Max. Sens+Spec	7.13	0.8442	0.7471	0.9085	0.5395	0.4282	0.6469	1.83	1.40	2.40
Max. Youden	7.13	0.8442	0.7471	0.9085	0.5395	0.4282	0.6469	1.83	1.40	2.40
Se=Sp	10.00	0.6623	0.5512	0.7580	0.6579	0.5460	0.7546	1.94	1.37	2.75
Min. ROC distance	9.28	0.7273	0.6188	0.8142	0.6447	0.5326	0.7430	2.05	1.47	2.87
Max. Efficiency	7.13	0.8442	0.7471	0.9085	0.5395	0.4282	0.6469	1.83	1.40	2.40
Min. MCT	7.13	0.8442	0.7471	0.9085	0.5395	0.4282	0.6469	.83	1.40	2.40



Un punto de corte de 9.28 pmol/l se asocia con una sensibilidad del 72% y una especificidad del 64% para la detección de pacientes con baja respuesta. El área bajo la curva es 0.7186. Por tanto, podemos interpretar que la probabilidad de que la HAM clasifique correctamente a dos pacientes seleccionadas al azar, una con baja respuesta y otra con respuesta normal o alta, sería casi del 72%. En términos estadísticos, esta área bajo la curva se considera aceptable.

Modelo 5: Variable Respuesta = BajaCancelada vs Resto
 Variable Explicativa = HAM

Analizamos la capacidad de la HAM para discriminar entre las pacientes con baja respuesta cancelada del resto (baja respuesta no cancelada, normo y alta respuesta).

Sample size: 153
 Sample prevalence: 0.7974
 Population prevalence: 0.7974 - same as sample prevalence if not informed
 Informed Cost - cost(FN)/cost(FP): 1

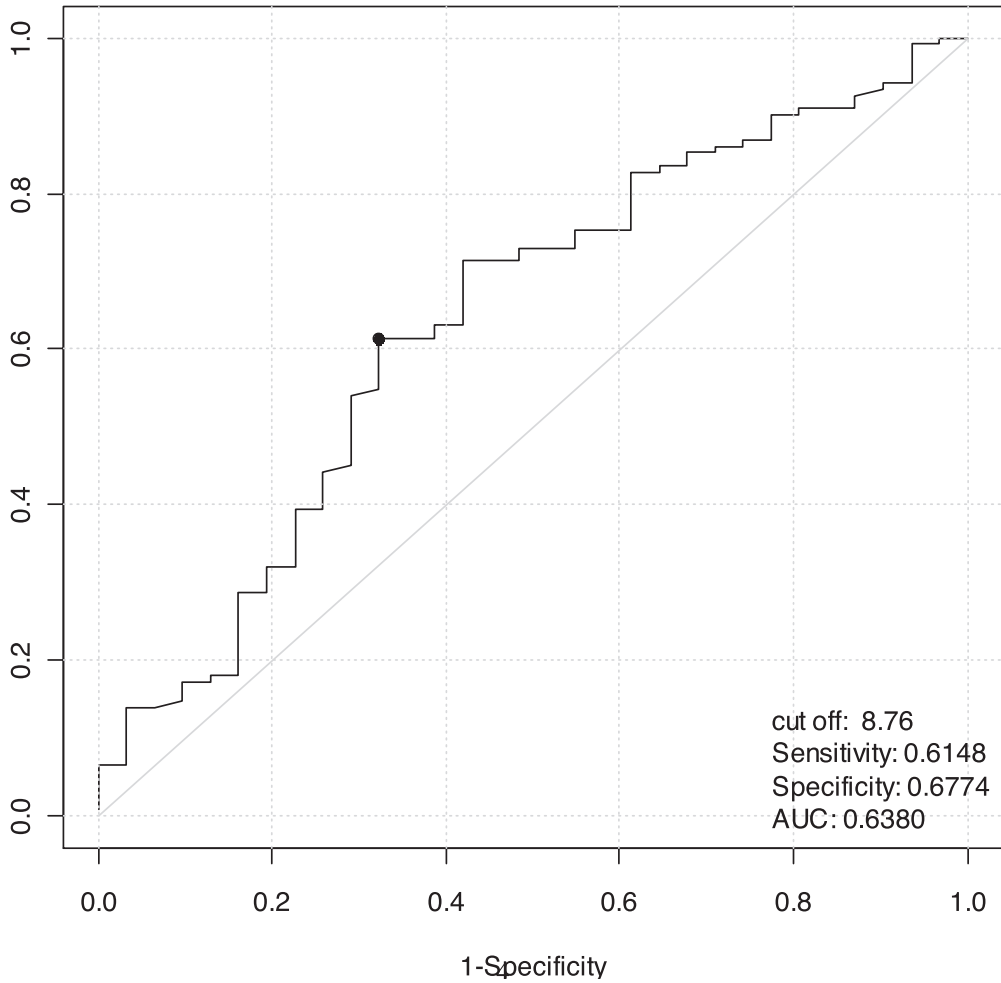
Non-parametric AUC (trapezoidal method) and its 0.95 confidence limits (DeLong method)
 Area under ROC curve: 0.638 [0.5261 - 0.7499]

Test summary-----

Min. 1st Qu. Median Mean 3rd Qu. Max. SD
 Overall summary 0.3607 5.480 10.0 13.350 18.04 60.96 11.75120
 Without disease 0.3607 3.724 6.4 9.674 12.12 38.80 9.02205
 With disease 0.4329 6.131 10.9 14.280 19.15 60.96 12.20445

Best cut-off estimationswith 0.95 confidence limits -----

	test.values	Sensitivity	Se.inf.cl	Se.sup.cl	Specificity	Sp.inf.cl	Sp.sup.cl	PLR	PLR.inf.cl	PLR.sup.cl
Max. Accuracy	0.4328571	1.0000	0.9695	1.0000	0.0323	0.0057	0.1619	1.03	0.97	1.10
Max. DOR	0.7214286	0.9918	0.9550	0.9986	0.0645	0.0179	0.2072	1.06	0.95	1.19
Min. Error rate	0.4328571	1.0000	0.9695	1.0000	0.0323	0.0057	0.1619	1.03	0.97	1.10
Max. Accuracy area	8.7600000	0.6148	0.5262	0.6964	0.6774	0.5014	0.8143	1.91	1.13	3.24
Max. Sens+Spec	7.1300000	0.7131	0.6273	0.7859	0.5806	0.4077	0.7358	1.70	1.10	2.62
Max. Youden	7.1300000	0.7131	0.6273	0.7859	0.5806	0.4077	0.7358	1.70	1.10	2.62
Se=Sp	8.4000000	0.6148	0.5262	0.6964	0.6129	0.4382	0.7627	1.59	1.00	2.53
Min. ROC distance	8.7600000	0.6148	0.5262	0.6964	0.6774	0.5014	0.8143	1.91	1.13	3.24
Max. Efficiency	0.4328571	1.0000	0.9695	1.0000	0.0323	0.0057	0.1619	1.03	0.97	1.10
Min. MCT	0.4328571	1.0000	0.9695	1.0000	0.0323	0.0057	0.1619	1.03	0.97	1.10



Un valor de corte de 8.76 pmol/l se asocia con una sensibilidad del 61% y una especificidad del 67%. El área bajo la curva correspondiente es de 0.6380. Observamos un área bajo la curva menor respecto al modelo anterior, así como la sensibilidad y especificidad asociadas.

MODELO 6: VARIABLE RESPUESTA = BAJA VS NORMO+ALTA
 VARIABLE EXPLICATIVA = HAM + EDAD

Asociamos a la HAM la edad como variable explicativa y comparamos baja respuesta con normo y alta.

En este modelo, aplicamos otra función de R para el cálculo de curvas ROC. En este caso, primero realizamos la regresión logística y después obtenemos la ROC.

La salida de la regresión logística es la siguiente:

Logistic regression predicting BajavsNormoAlta

	crude OR(95%CI)	adj. OR(95%CI)	P(Wald's test)	P(LR-test)
HAM (cont. var.)	1.08 (1.04,1.13)	1.08 (1.04,1.13)	< 0.001	< 0.001
edad (cont. var.)	0.84 (0.77,0.92)	0.85 (0.77,0.93)	< 0.001	< 0.001

Log-likelihood = -86.9472

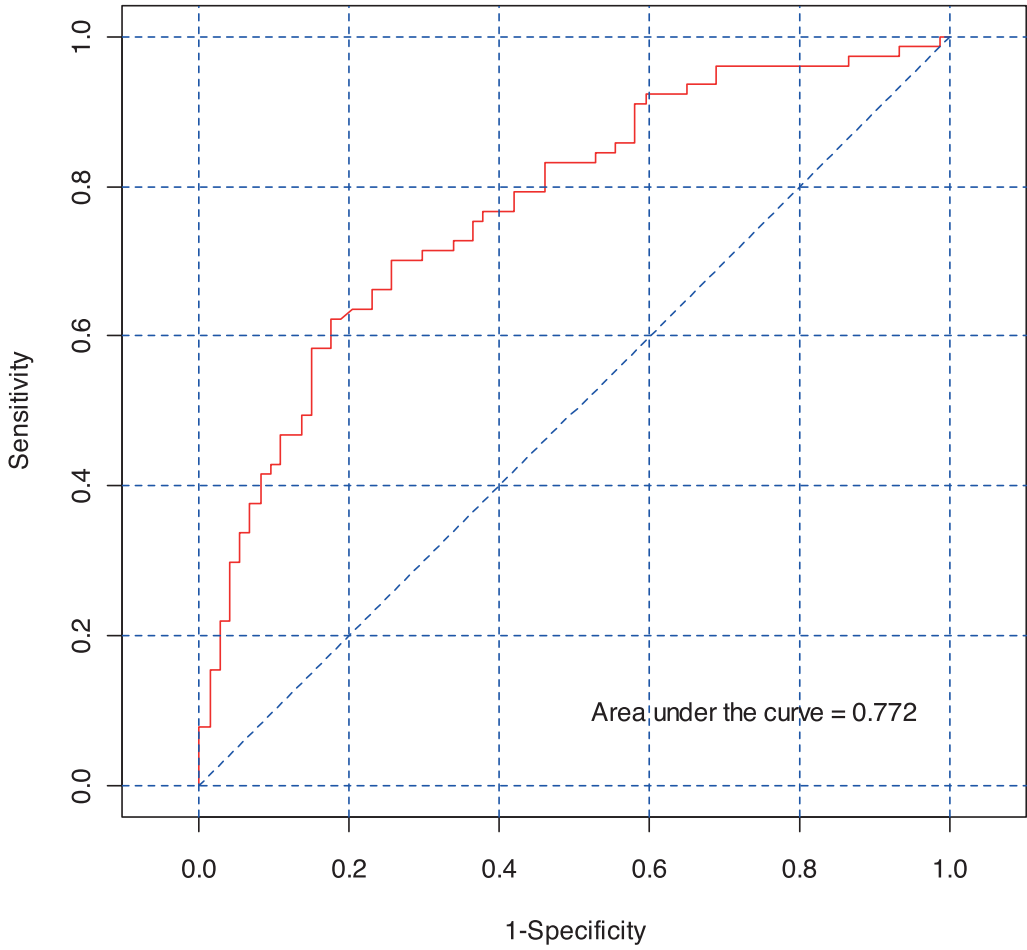
No. of observations = 151

AIC value = 179.8943

Nos indica que tanto la HAM como la EDAD son variables relacionadas significativamente con la variable respuesta.

La curva ROC no indica cut-off porque tenemos dos variables explicativas pero sí tenemos el valor del área bajo la curva que nos permite comparar con el modelo 4:

BajavsNormoAlta ~ HAM + edad



3.3.6 RECUENTO FOLÍCULOS ANTRALES VERSUS HAM

Aplicando una regresión lineal simple tratando de explicar el RFA a partir de los valores de HAM observamos:

Análisis de regresión lineal

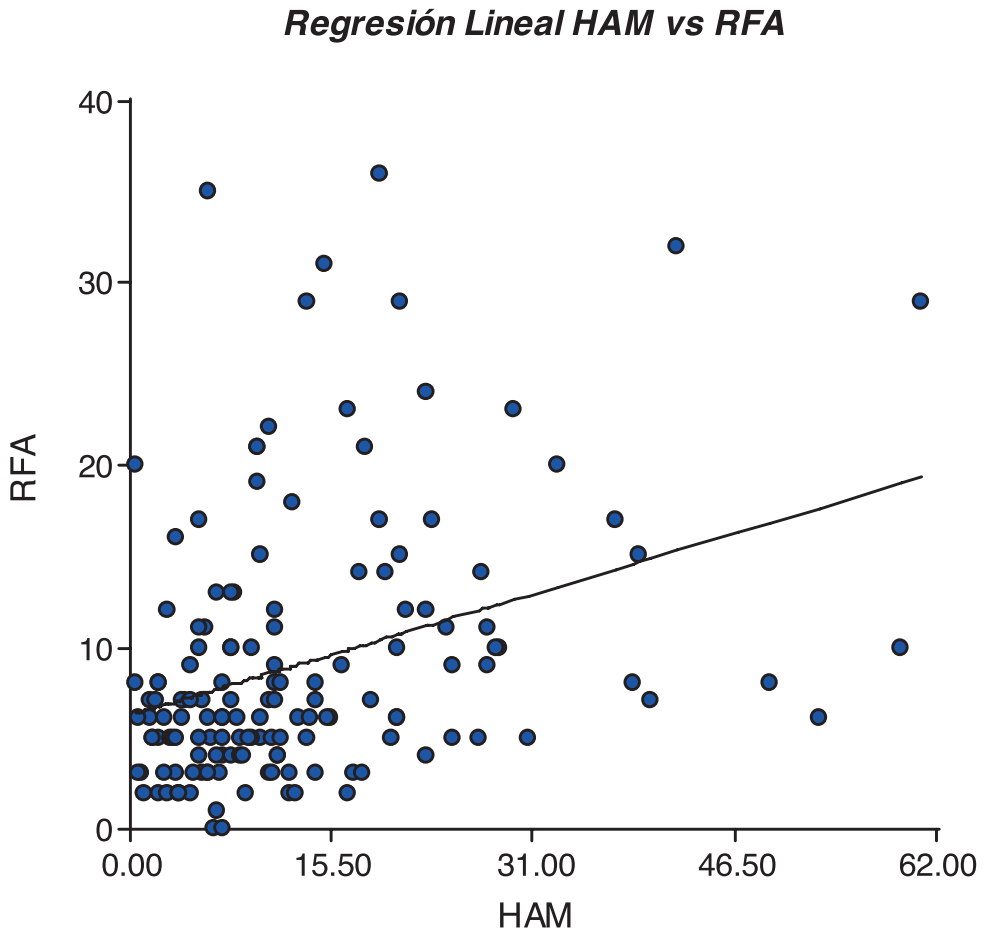
Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
RFA	148	0.12	0.11	49.28	995.66	1004.65

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	Cp	Mallows
const	6.25	0.86	4.55	7.95	7.26	<0.0001		
HAM	0.21	0.05	0.12	0.31	4.38	<0.0001	20.03	

Al realizar la regresión lineal obtenemos una relación significativa entre HAM y RFA, $p < 0.0001$, con un $R^2 = 0.12$, es decir, la varianza de HAM explicada por RFA es del 12% (es un buen ajuste).

Gráficamente:



Se evidencia que existe una relación directa y lineal entre los valores de HAM y el recuento de folículos antrales. A mayores valores de HAM mayor RFA y viceversa. Ambas coordenadas sirven, claramente, para conocer la respuesta y, por tanto, la reserva.

3.3.7 RELACIÓN RFA+HAM VERSUS RESPUESTA

Modelo 9: Variable Respuesta = Baja vs Normo+Alta
Variable Explicativa = RFA + HAM

Como hemos visto anteriormente, existe una relación lineal directa positiva entre la variable HAM y el RFA. Nos planteamos entonces si su asociación puede mejorar la capacidad predictiva de cada una por separado.

En este modelo, aplicamos otra función de R para el cálculo de curvas ROC. En este caso, primero realizamos la regresión logística y después obtenemos la ROC.

La salida de la regresión logística es la siguiente:

Logistic regression predicting BajavsNormoAlta

	crude OR(95%CI)	adj. OR(95%CI)	P(Wald's test)	P(LR-test)
RFA (cont. var.)	1.24 (1.13,1.36)	1.21 (1.1,1.32)	< 0.001	< 0.001
HAM (cont. var.)	1.08 (1.04,1.13)	1.05 (1.01,1.1)	0.019	0.011

Log-likelihood = -79.3298

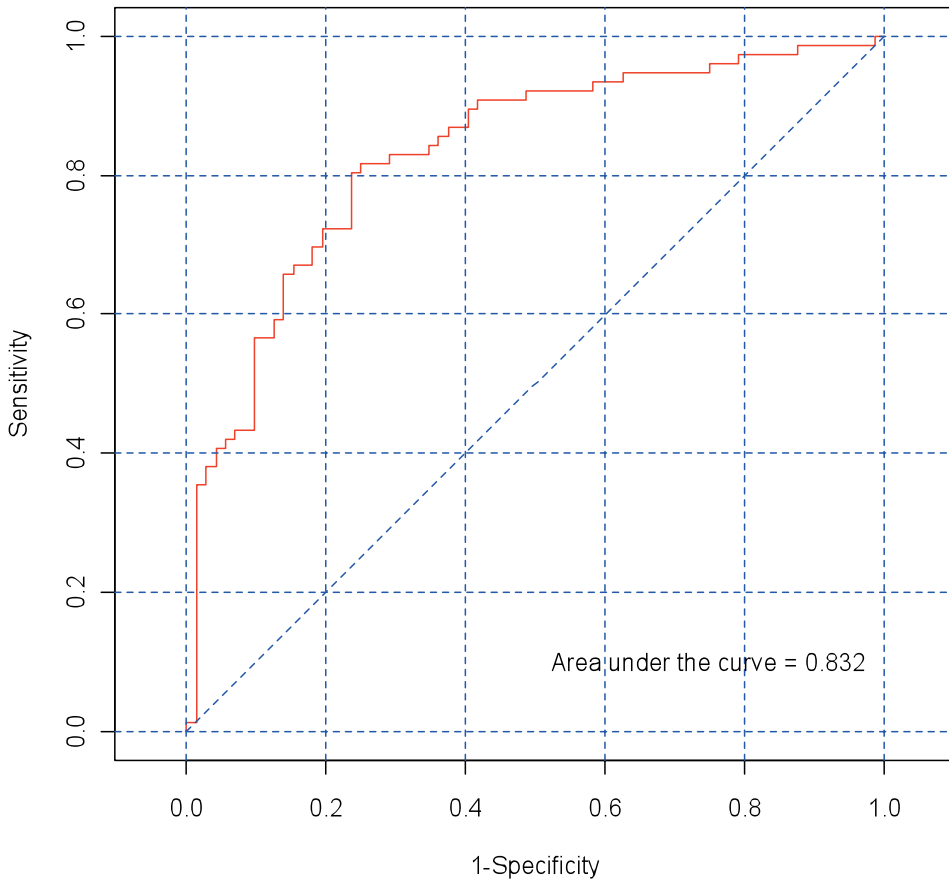
No. of observations = 148

AIC value = 164.6597

Nos indica que tanto el RFA como la HAM son variables relacionadas significativamente con la variable respuesta, es decir, HAM está explicando una parte de la variabilidad que no explica RFA sobre el nivel de respuesta.

La curva ROC no indica cut-off porque tenemos dos variables explicativas pero sí tenemos el valor del área bajo la curva que nos permite comparar con los modelos anteriores.

BajavsNormoAlta ~ HAM + RFA



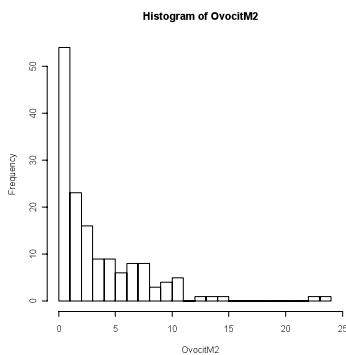
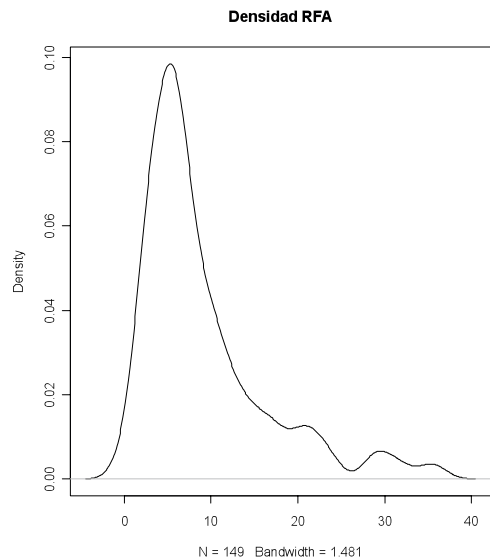
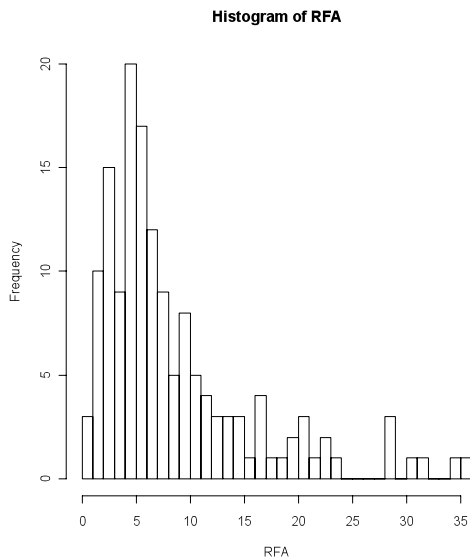
Observamos un área bajo la curva mayor que para el RFA y la HAM por separado. Nos indica que ambas variables predicen mejor la baja respuesta si las utilizamos conjuntamente.

3.4 RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES RFA Y HAM CON LOS OVOCITOS EN METAFASE 2

3.4.1. RECUENTO FOLÍCULOS ANTRALES VERSUS OVOCITOS EN METAFASE 2 OBTENIDOS

En este caso queremos comparar dos variables categóricas.

El RFA toma valores en el intervalo [0,36] con la mediana (segundo cuartil) en 7, es decir, el 50% de los datos de esta variable son menores o iguales a 7. El primer y el tercer cuartil son 5 y 11 (25% y 75%).



OvocitM2 toma valores en el intervalo [0,24] con la mediana (segundo cuartil) en 2, es decir, el 50% de los datos de esta variable son menores o iguales a 2. El primer cuartil y el tercero son 1 y 6 (25% y 75%).

OvocitM2	Embriones												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
Nº Pacientes	37	18	24	16	9	9	6	8	8	3	4	5	1
	1	1	1	1									

Hemos aplicado una regresión lineal para ver si existe una relación de este tipo entre las dos variables.

Obtenemos:

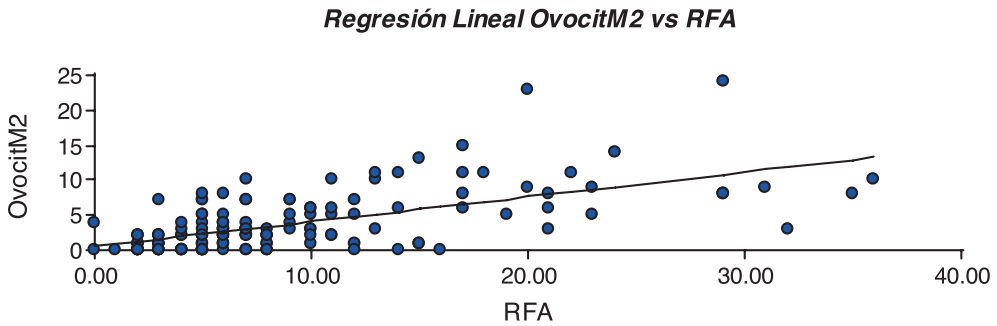
Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
OvokitM2	145	0.38	0.38	11.56	763.16	772.09

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.52	0.44	-0.35	1.39	1.18	0.2395	
RFA	0.35	0.04	0.28	0.43	9.44	<0.0001	89.46

Del análisis deducimos que sí existe relación lineal positiva entre estas variables, que dicha relación es significativa ($p < 0.0001$) y que existe un buen ajuste ($R^2 = 0.38$).



3.4.2. HAM VERSUS OVOCITOS EN METAFASE 2 OBTENIDOS

Aplicando una regresión lineal simple tratando de explicar los ovocitos metafase 2 obtenidos a partir de los valores de HAM que disponíamos, obtenemos:

Análisis de regresión lineal

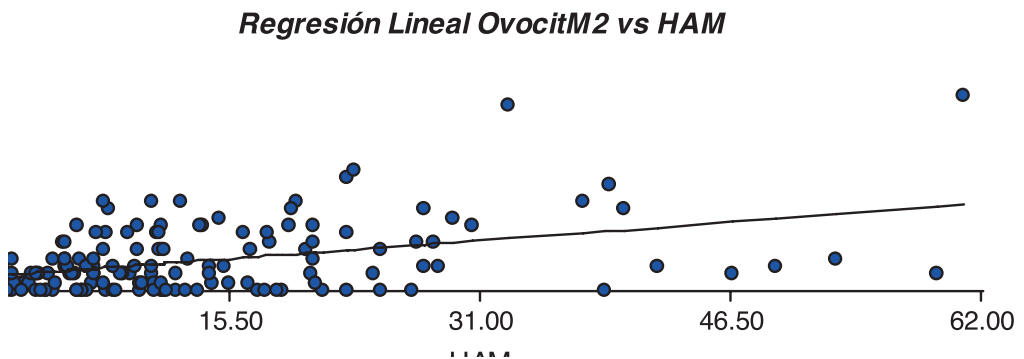
Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
OvokitM2	149	0.17	0.16	15.62	827.30	836.31

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	1.74	0.48	0.79	2.69	3.64	0.0004	
HAM	0.15	0.03	0.09	0.20	5.47	<0.0001	30.71

Del análisis se deduce que existe relación lineal positiva entre estas variables, $p < 0.0001$.

Gráficamente:



3.4.3 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE HAM, RFA Y EDAD CON LOS OVOCITOS EN METAFASE 2 MEDIANTE REGRESIÓN DE POISSON

En este apartado vamos a estimar los valores de ovocitos en metafase 2 u ovocitos maduros (OVOMAD), a partir de los valores de HAM, RFA y Edad, pero aplicando en este caso regresiones de Poisson.

Comenzamos ajustando regresiones individuales para ver el efecto de cada variable de forma independiente sobre OVOMAD y acabaremos con una regresión múltiple de Poisson para ver la influencia de cada una ajustada por las demás.

NOTA: En el modelo Poisson Log-Lineal ajustamos $\log \mu = \alpha + \beta x$ y por tanto, una vez estimados los parámetros, $\mu = \exp(\alpha + \beta x)$

REGRESIÓN POISSON SIMPLE: OVOMAD vs HAM

Realizamos una regresión de poisson considerando HAM como variable independiente y OVOMAD como variable dependiente (de interés). Obtenemos:

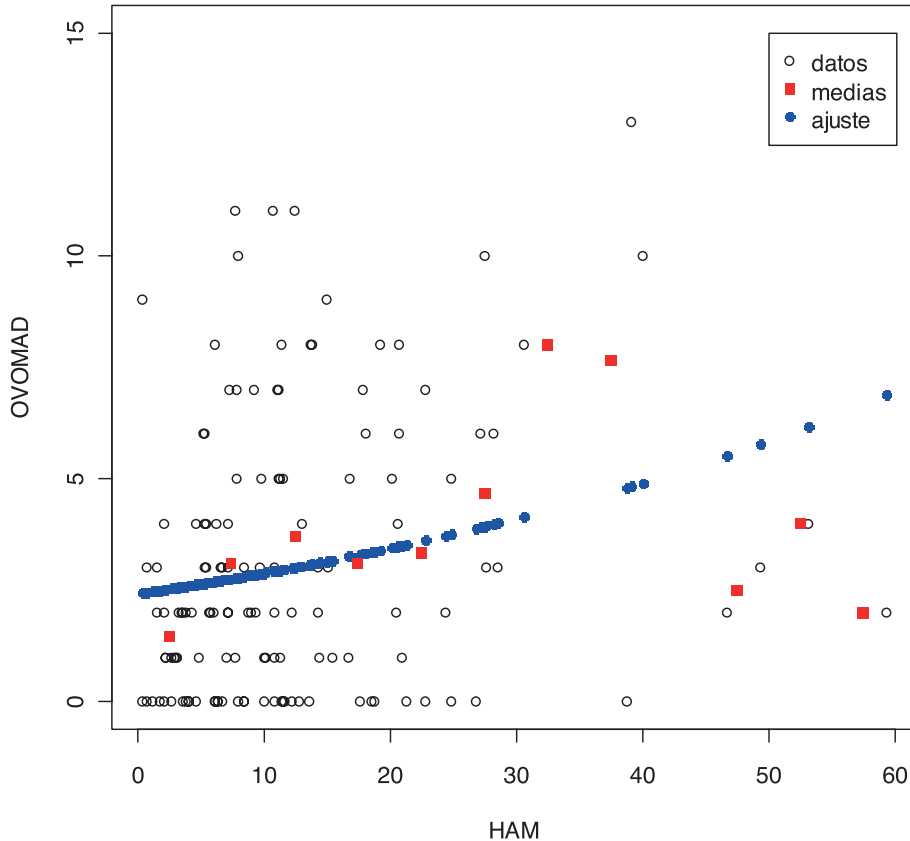
```
Coefficients:
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) 0.886580   0.074434  11.911 < 2e-16
HAM          0.017579   0.003773   4.659 3.18e-06
Analysis of Deviance Table (Type III tests)
Response: OVOMAD
      LR Chisq Df Pr(>Chisq)
HAM    19.279  1  1.129e-05
```

Comprobamos que existe una relación estadísticamente significativa entre los valores de HAM y el número de ovocitos maduros obtenidos.

En este caso, los valores de OVOMAD se estiman por:

$$\text{OVOMAD} = \exp(0.886580 + 0.017579 \cdot \text{HAM})$$

En la siguiente gráfica mostramos los datos originales, medias y ajuste:



REGRESIÓN POISSON SIMPLE: OVOMAD vs RFA

Realizamos una regresión de poisson considerando RFA como variable independiente y OVOMAD como variable dependiente (de interés). Obtenemos:

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	0.543831	0.081426	6.679	2.41e-11
RFA	0.060800	0.005567	10.922	< 2e-16

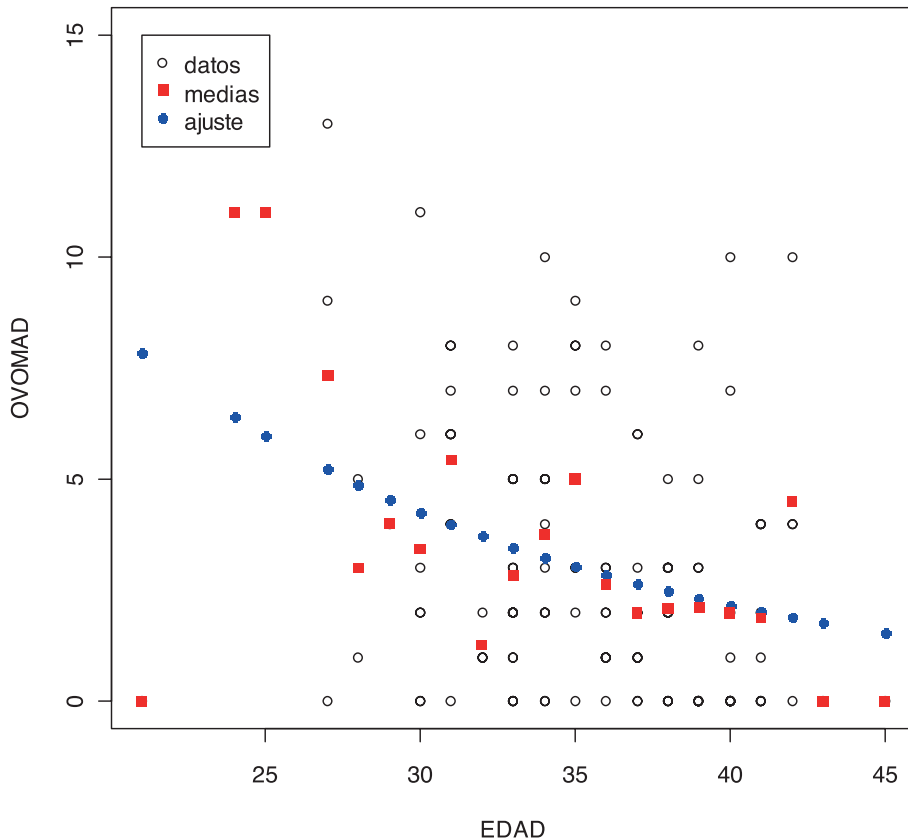
Analysis of Deviance Table (Type III tests)

Response: OVOMAD

	LR	Chisq	Df	Pr(>Chisq)
RFA	96.38	1	< 2.2e-16	

Comprobamos que existe una relación estadísticamente significativa entre los valores de RFA y el número de ovocitos maduros obtenidos.

En la siguiente gráfica mostramos los datos originales, medias y ajuste:



REGRESIÓN POISSON MÚLTIPLE: OVOMAD vs HAM+RFA+EDAD

Realizamos una regresión múltiple de poisson considerando HAM, RFA y EDAD como variables independientes y OVOMAD como variable dependiente. Obtenemos:

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	1.418287	0.475136	2.985	0.00284
HAM	0.017043	0.004100	4.157	3.22e-05
RFA	0.052809	0.006531	8.086	6.15e-16
EDAD	-0.030031	0.012602	-2.383	0.01717

Analysis of Deviance Table (Type III tests)

Response: OVOMAD

	LR	Chisq	Df	Pr(>Chisq)
HAM	15.447	1	8.486e-05	
RFA	57.959	1	2.676e-14	
EDAD	5.583	1	0.01813	

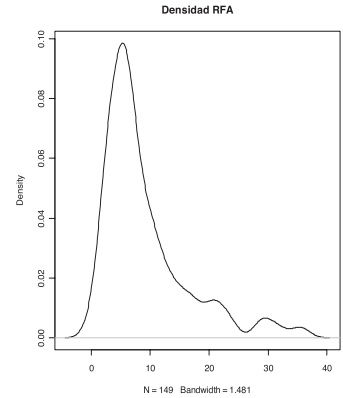
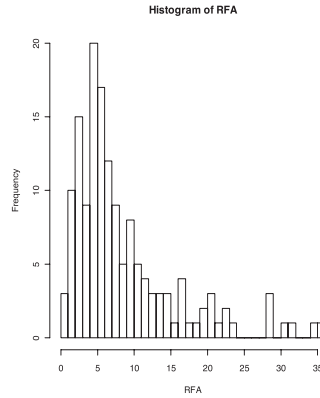
De este análisis se deduce que las 3 variables están relacionadas significativamente con los valores de OVOMAD y que las 3 siguen estando relacionadas con OVOMAD incluso estando las otras en el modelo. Es decir, si un p-valor es <0.05 indica que esa variable está explicando una parte significativa de la variable de interés que no están contando las otras y, por tanto, el ajuste será significativamente mejor. En este caso, no podemos presentar gráfica de ajuste porque tenemos 4 dimensiones.

3.5 RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES RFA Y HAM CON LA CALIDAD EMBRIONARIA

3.5.1. RFA VERSUS CALIDAD EMBRIONARIA OBTENIDA (EMBRIONES GRADO 1 Y GRADO 2)

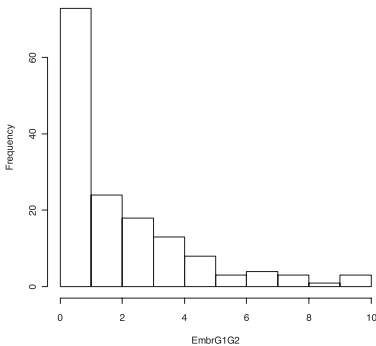
En este caso hemos comparado, igualmente, dos variables categóricas.

RFA toma valores en el intervalo [0,36] con la mediana (segundo cuartil) en 7, es decir, el 50% de los datos de esta variable son menores o iguales a 7. El primer y el tercer cuartil



son 5 y 11 (25% y 75%).

Histogram of EmbrG1G2



EmbrG1G2 toma valores en el intervalo [0,10] con la mediana (segundo cuartil) en 2, es decir, el 50% de los datos de esta variable son menores o iguales a 2. El primer cuartil y el tercero son 0 y 3 (25% y 75%).

EmbrG1G2	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Embriones	9	10							
Nº pacientes	49	24	24	18	13	8	3	4	3

1

Al aplicar una regresión lineal para ver si existe una relación de este tipo entre las dos variables, obtenemos:

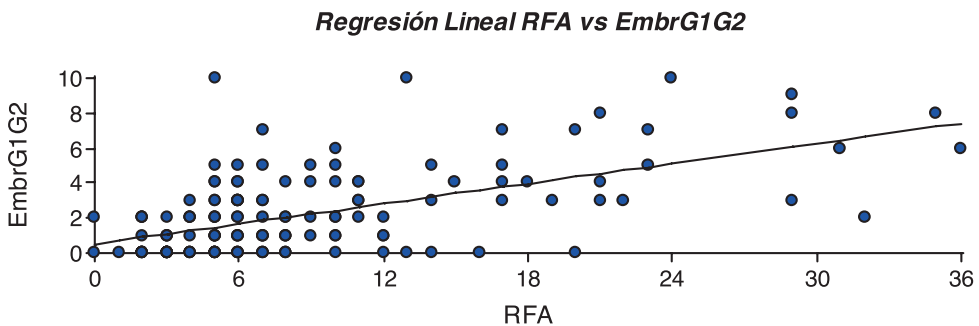
Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
EmbrG1G2	144	0.34	0.34	4.02	608.00	616.91

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.51	0.26	1.6E-03	1.03	1.98	0.0493	
RFA	0.19	0.02	0.15	0.24	8.59	<0.0001	74.29

Del análisis deducimos que sí existe relación lineal positiva entre estas variables. Gráficamente:



También hemos aplicado un test de correlación de Kendall que mide la asociación entre variables que no deben ser normalmente distribuidas. Está basado en rangos.

Obtenemos:

```

Kendall's rank correlation tau

data: RFA and EmbrG1G2

z = 6.6351, p-value = 3.243e-11

alternative hypothesis: true tau is not equal to 0

sample estimates:

tau

0.4122623
    
```

Este test también nos señala una correlación positiva y significativa entre las dos variables.

3.5.2. HAM VERSUS CALIDAD EMBRIONARIA OBTENIDA (EMBRIONES GRADO 1 Y GRADO 2)

Aplicando una regresión lineal simple tratando de explicar calidad embrionaria obtenida (EmbrG1G2) a partir de los valores de HAM, observamos:

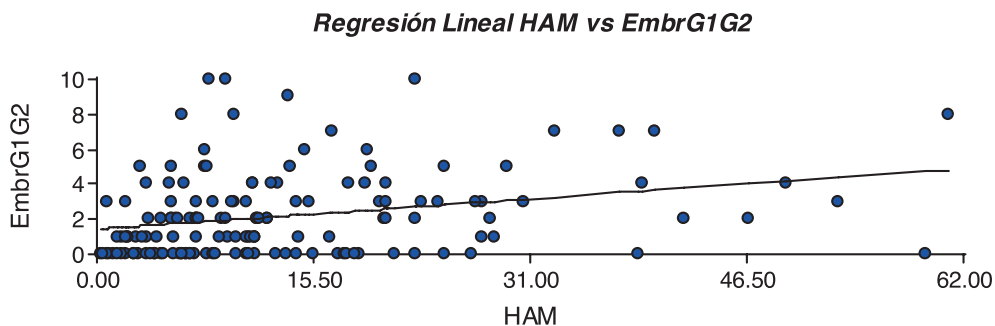
Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
EmbrG1G2	148	0.08	0.07	5.54	672.42	681.42

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	1.44	0.29	0.87	2.01	5.02	<0.0001	
HAM	0.06	0.02	0.02	0.09	3.45	0.0007	12.83

Del análisis se deduce que también existe relación lineal positiva entre estas variables. Gráficamente:



Hemos observado para la HAM que existe una relación lineal positiva y significativa los ovocitos maduros y con la calidad embrionaria. Este resultado es lógico si tenemos en cuenta que valores de HAM mayores están presentes en mujeres más jóvenes, que presentan mejor reserva ovárica y por tanto mayor número de ovocitos disponibles para ser recuperado, y de mayor calidad.

Hemos de tener en cuenta que el análisis mediante regresiones lineales únicamente nos indica si existe relación lineal y si ésta es significativa. No podemos

concluir mediante este análisis si los valores de HAM predicen el número de ovocitos maduros que se obtendrán o la calidad de los embriones obtenidos. Como discutiremos más adelante, la mayoría de autores han determinado que la HAM no es útil para conocer los ovocitos maduros y/o la calidad embrionaria que obtendremos en una paciente que se somete a un tratamiento de reproducción asistida.

3.6. RESULTADOS GESTACIONALES Y OBSTÉTRICOS FINALES

VARIABLE	RESULTADOS (%)	COMENTARIOS
Embarazos ectópicos	2 / 23 (8,69%)	En España 1/120 = 0,8%
Abortos	4 /23 (17,3%)	Medial en España 11%
TOTAL GESTACIONES	23 /153 (15%) NORMO 13 (56,5%) BAJA 10 (43,4%)	Tasa muy baja en relación tasas FIV/ICSI del HC en general (42%)

En total hubo 23 gestaciones en curso, lo que significa una tasa del 15%, realmente muy baja que hace pensar dos situaciones:

- Las parejas deben conocer, perfectamente, que los resultados son muy mediocres especialmente si se comparan con otras técnicas de Reproducción Asistida (ovodonación)

- Que, incluso ante circunstancias tan adversas hemos tenido gestaciones con evolución normal (solo 17, equivalente al 11,1%). Por tanto no estamos capacitados, como hubiéramos deseado y era nuestra intención al iniciar esta tesis, a negar las técnicas de Reproducción Asistida a pacientes con altas probabilidades de tener una baja respuesta.

Curiosamente un 43% de ellos se logró en pacientes consideradas bajas respondedoras

- El hecho de lograr una gestación no significa una evolución normal. El 26% de las que quedaron gestantes sufrieron un aborto (4 casos, 17,3%) o un embarazo ectópico (2 casos, 8,69%). Ambos índices son muy superiores a los que acontecen en gestaciones espontáneas

¿Existen diferencias significativas en los valores de HAM entre gestación y no gestación?

En este caso, incluimos un conjunto de 76 pacientes del total de 153. La edad media de este grupo es 35 años, con una edad mínima de 29 y máxima de 45. La división por grupos respuesta es la siguiente:

- Baja respuesta: 53 pacientes.

- Normorespuesta: 22 pacientes.
- Alta respuesta: 1.

Realizamos un análisis de la varianza:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HAM	76	4.4E-04	0.00	92.51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.43	1	3.43	0.02	0.8861
Gest	3.43	1	3.43	0.02	0.8861
Error	7773.25	47	165.39		
Total	7776.69	48			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=7.52802

Error: 165.3884 gl: 47

Gest	Medias	n	
NO	14.00	59	A
SI	14.55	17	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0.05$)

No detectamos diferencias significativas entre el valor de *HAM* en las mujeres con *Gest*=Si y las mujeres con *Gest*=No.

Hemos visto que no detectamos diferencias en los valores de *HAM* entre los dos niveles de *Gest*, pero ¿puede que existan diferencias en algún grupo de edad?

Para ello aplicamos un análisis de la varianza con dos factores (*Gest* y *GrupEdad*) junto a su interacción. La significación de este componente nos contestará la pregunta.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HAMok	76	0.02	0.00	87.65

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HAMok	76	0.05	0.00	94.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	408.00	5	81.60	0.48	0.7920
GrupEdad	13.57	2	6.78	0.04	0.9612
Gest	69.07	1	69.07	0.40	0.5289
GrupEdad*Gest	363.73	2	181.86	1.06	0.3549
Error	7368.68	43	171.36		
Total	7776.69	48			

La significación de la interacción es $p=0.3549$ (>0.05), por tanto no hallamos diferencias en los niveles de HAM entre pacientes con gestación y no gestación aunque incluyamos la edad en la interacción.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Con el incremento de la edad de la mujer se produce la disminución de su capacidad reproductiva debido a la reducción del pool de folículos ováricos y de la calidad de los ovocitos (La Marca y Volpe, 2006). En las últimas décadas se han propuesto numerosos parámetros con la finalidad de conocer la Reserva Ovárica (RO), parámetros conocidos como test de Reserva Ovárica (TRO).

En el campo de la Reproducción humana, para la obtención de resultados satisfactorios, es necesaria la valoración de la RO previamente a planificar el tratamiento adecuado. El TRO ideal debería permitirnos identificar mujeres que tienen una probabilidad de embarazo después de un ciclo FIV cercana a zero como consecuencia de su reducida RO. La exclusión de estas parejas de las TRA podría reducir costes al sistema sanitario. Además se podrían evitar tratamientos inútiles, riesgos quirúrgicos, stress y la decepción de las parejas (La Marca *et al.*, 2010b). Por otro lado, el valor predictivo de los TRO no es absoluto, y en consecuencia presentan resultados falsos positivos y falsos negativos. Especialmente los resultados falsos positivos pueden tener consecuencias negativas en la vida de las parejas, ya que estaríamos negando un tratamiento FIV a una mujer que no presenta baja RO. Es más, ha sido ampliamente demostrado que muchas mujeres bajas respondedoras consiguen embarazarse y tener un hijo sano (Klinkert *et al.*, 2004; Van der Gaast *et al.*, 2006). En particular, aquellas bajas respondedoras de edad más joven tienen un pronóstico diferente comparadas con aquellas de mayor edad (Lashen *et al.*, 1999; Ulug *et al.*, 2003). Por el contrario, la identificación de altas respondedoras antes del inicio del tratamiento, permitirá elegir el protocolo más apropiado y reducir efectos secundarios ligados a éste, como el síndrome de hiperestimulación ovárica. Con todo ello, debemos definir los objetivos que con estos TRO perseguimos: (i) aconsejar a las pacientes sobre los riesgos y beneficios del tratamiento; (ii) reducir el coste sanitario denegando el tratamiento a parejas de mal pronóstico; (iii) individualizar las estrategias terapéuticas a seguir.

Durante años, la edad y los niveles en día +3 de FSH y LH han sido usadas como indicadores de la respuesta ovárica a TRA (Patrelli *et al.*, 2012). Como factor pronóstico del potencial ovárico, la edad cronológica tiene un valor limitado, pues

mujeres de la misma edad pueden encontrarse en diferentes estadios en el proceso de depleción folicular. Como sabemos, existe un amplio rango de edad a la cual se produce el inicio de la menopausia, que representa la depleción folicular total (Ruma Satwik *et al.*, 2012). La FSH basal es el test más usado como screening de RO (Loverro *et al.*, 2003), sin embargo, se ha comprobado que un incremento en los niveles de FSH ocurre tardíamente en la secuencia de eventos asociados al envejecimiento ovárico (Klein *et al.*, 1996). Así este incremento tendrá un limitado uso clínico como marcador de RO (Bancsi *et al.*, 2000). Predicciones para baja respuesta son sólo obtenidas con valores extremos de FSH (Bancsi *et al.*, 2003). En el estudio que hemos realizado sobre el valor predictivo de la FSH para la respuesta ovárica, obtuvimos valores de sensibilidad y especificidad bajos, y un amplia varianza de los datos, lo que nos permite concluir que no debemos recomendar su determinación seriada.

Recientemente, varios investigadores reportaron la efectividad del RFA y el volumen ovárico en la predicción de la respuesta ovárica a la estimulación hormonal (Bancsi *et al.*,

2002; Chang *et al.*, 1998). Ellos manifestaron que el RFA proporciona mejor información pronóstica acerca de la aparición de baja respuesta tras estimulación ovárica, que la edad o la FSH. No obstante, la interpretación ecográfica es subjetiva y puede no ser consistente (Muttukrishna *et al.*, 2004). Además requiere de ecógrafos de alta resolución y la valoración por el mismo observador para ser más preciso como TRO.

Los test dinámicos consumen tiempo, precisan de un intenso trabajo, son más caros, y no existe un acuerdo sobre sus criterios de valoración. No añaden información a la obtenida por los test estáticos (Satwik *et al.*, 2012). Por tanto, persiste la necesidad de establecer un adecuado test para la predicción del potencial reproductivo individual, un marcador endocrino que pueda ser usado sin sesgos.

Recientemente, un nuevo marcador endocrino, la hormona antimülleriana (HAM), ha sido evaluado por varios grupos de trabajo. Los niveles de HAM tienen una buena correlación con la medida del número de folículos antrales por ecografía (De Vet *et al.*, 2002; Van Rooij *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003b) y se cree que pueden ser la mejor representación del declive gradual de la capacidad reproductiva

de mujeres fértiles (Van Rooij *et al.*, 2004; Van Rooij *et al.*, 2005). La HAM se ha posicionado como un marcador preciso de baja respuesta a la hiperestimulación ovárica con gonadotrofinas en un ciclo FIV (Van Rooij *et al.*, 2002; Hazout *et al.*, 2004; Fanchin *et al.*, 2005). Basándonos en estos hallazgos, podemos afirmar que la HAM puede llegar a ser un marcador frecuentemente aplicado en el campo de la medicina reproductiva.

Una de las ventajas más resaltadas de la HAM es el hecho de que sus niveles se muestran estables ante la influencia de distintos factores como el uso de anticonceptivos hormonales, el ciclo menstrual, y el embarazo (Streuli *et al.*, 2009), y por tanto su medición se puede realizar en cualquier momento del ciclo. En mujeres diagnosticadas de síndrome de ovario poliquístico que han utilizado durante largo tiempo anticonceptivos orales y en las que se produce una significativa reducción del volumen ovárico, no aparece modificación de los niveles de HAM (Streuli *et al.*, 2007).

En los últimos años se han publicado trabajos que ponen en duda que los niveles de HAM sean estables durante el ciclo. Ya en el año 2000 se publicó un trabajo realizado en mujeres entre 22 y 35 años, que encontró variaciones significativas en los valores de HAM a lo largo del ciclo, siendo más bajos en la fase lútea (Cook *et al.*, 2000). En 2006 y 2008 dos artículos describieron que los niveles de HAM fluctuaban durante el ciclo menstrual, encontrando niveles significativamente más bajos en la fase lútea temprana, y más altos en la fase folicular temprana (Lahlou *et al.*, 2006; Wunder *et al.*, 2008a). Ambos estudios utilizaron como técnica de medición el “Diagnostic Systems Laboratories (DSL) (Webster, TX) Kit”, mientras que la mayoría de las publicaciones que no mostraban cambios durante el ciclo en los niveles de HAM usaron el otro Kit comercializado, el “Beckman-Coulter Immunotech (BC) (Fullerton Tx) (Streuli *et al.*, 2007; Hekenkamp *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2006a y 2007), a excepción de Tsepelidis *et al.*, que realizaron un estudio prospectivo en mujeres normoovuladoras, y no hallaron variaciones significativas en los niveles de HAM durante el ciclo, realizando mediciones mediante el DSL (Tsepelidis *et al.*, 2007). Un estudio posterior determinó que las diferencias entre los estudios que mostraban (Lahlou *et al.*, 2006; Wunder *et al.*, 2008a) o no mostraban (Streuli *et al.*, 2007; Hekenkamp *et al.*, 2006) fluctuaciones de la HAM, no se debían al tipo de ensayo utilizado. También hallaron en dicho estudio una disminución en

los valores de HAM inmediatamente después de la ovulación, aunque concluyeron que ésta fue despreciable y clínicamente no significativa (Streuli *et al.*, 2009). El mecanismo por el que se produce este descenso no ha sido elucidado. En este trabajo proponen como hipótesis la presencia de un mecanismo oculto que interfiera en el reconocimiento de los valores séricos de la HAM después de la ovulación. Este mecanismo podría tratarse de la liberación de receptores solubles de HAM en sangre, que producirían un falso descenso de ésta. Sin embargo, en los dos últimos estudios que observaron un descenso periovulatorio en los niveles de HAM, las máximas fluctuaciones fueron menores o iguales a las observadas entre ciclos menstruales distintos (Streuli *et al.*, 2007). Es decir que la fluctuación de los niveles de HAM encontrada en la fase lútea temprana, no era mayor que las diferencias encontradas entre niveles de HAM medidos en fases foliculares de dos ciclos distintos. Mínimas fluctuaciones en los niveles séricos de HAM pueden estar relacionados con un crecimiento continuo no cíclico de los folículos de pequeño tamaño (La Marca, 2006a). Los resultados del último trabajo de Streuli *et al.* confirmaban que tanto el método DSL como el BC podían ser utilizados para la medición de la HAM, y que ésta se podía realizar en cualquier momento del ciclo, aún en pacientes que tomaran anticonceptivos hormonales. Sin embargo, con la reciente compra por parte de Beckman Coulter de todas las patentes y el establecimiento de un único ensayo, el AMH Generation II, cabría esperar mayor homogeneidad en los resultados (Nelson *et al.*, 2012). La precisión de dicho ensayo fue demostrada por Wallace *et al.* (Wallace *et al.*, 2011). Dos recientes artículos vuelven a poner en discusión la estabilidad de la HAM durante el ciclo. En 2010 Sowers *et al.* documentaron un significativo incremento en los niveles de HAM entre los días 2 a 7 del ciclo, y ofrecían una nueva explicación acerca de las discrepancias alrededor de la HAM durante el ciclo menstrual. En el estudio de Sowers, observaron la existencia de dos patrones menstruales para la HAM, los cuales fueron denominados por el autor como “aging ovary” y “younger ovary”. El patrón de “ovario en envejecimiento” incluía pacientes con ciclos más cortos, valores de inhibina B menores y niveles de HAM más bajos y con escasa variación durante el ciclo. En contraste, el patrón de “ovario más joven” presentaba niveles más altos de HAM con una significativa variación los días 2 a 7 del ciclo, sugiriendo que para mujeres con HAM > 1 ng/ml, la interpretación de los niveles de esta hormona estaba supeditada al día del ciclo

menstrual en que se obtenía la muestra. El comportamiento del ovario no estaba relacionado con la edad cronológica pero sí con la edad ovárica, cómo indicaban los niveles más altos de HAM e inhibina B en el segundo patrón (Sowers *et al.*, 2010). El último estudio publicado ha sido este año, y describe cambios significativos en los niveles de HAM por día de ciclo, fase del ciclo, y entre las fases folicular y lútea, en mujeres con ciclos menstruales normales y que presentaban al menos un valor de HAM indicativo de reserva ovárica adecuada. El nivel de HAM era más alto en la fase folicular temprana comparado con la fase lútea tardía y era más alto en las muestras obtenidas previas a la ovulación que posteriores. Estas variaciones modificaban la clasificación clínica de respuesta ovárica de estas pacientes en más de la mitad de los casos (Hadlow *et al.*, 2013). Sin embargo, el estudio sólo incluye 12 pacientes, lo que sugiere que estos hallazgos deben ser interpretados con cautela, a falta de realizar estudios con mayor tamaño muestral. Hadlow *et al.* proponen una tercera explicación para las discrepancias entre los estudios, el manejo de las muestras de sangre. Los niveles de HAM han sido considerados relativamente estables a lo largo del ciclo menstrual, incluyendo estudios con muestras congeladas (La Marca *et al.*, 2006a), pero un reciente artículo (Rustamov *et al.*, 2012) aumentó la preocupación sobre la estabilidad de la HAM al reportar un incremento alrededor del 20% en muestras congeladas después de 5 días. Otros (Kumar *et al.*, 2010) publicaron que existía una mínima variación en las muestras congeladas a - 20°C durante 7 días. La variación más significativa parece ocurrir cuando todas las muestras de sangre son dejadas a temperatura ambiente (Rustamov *et al.*, 2012; Fleming *et al.*, 2012). El uso de tubos de suero con gel separador, la rápida separación del suero de las células y su posterior almacenamiento a 4°C proporciona una fiable estabilidad durante más de 5 días (Fleming *et al.*, 2012).

De confirmarse la no estabilidad de los valores de la HAM a lo largo del ciclo menstrual, ésta perdería una de sus principales ventajas con respecto al resto de marcadores de reserva ovárica. De momento, la solidez de esta afirmación puede ponerse en duda. Según el trabajo de Streuli en 2007, las fluctuaciones observadas durante el ciclo no eran mayores que las observadas entre ciclos distintos. La mayoría de los estudios citados presentan un discreto tamaño muestral, incluyen pacientes menores de 35 años con ciclos normales y con alguna evidencia para tener una reserva ovárica adecuada. Por ello, estos hallazgos pueden no ser aplicables en

otros grupos de pacientes. Precisamos de estudios que incluyan grupos de mayor tamaño y mujeres con ciclos irregulares, oligomenorrea o amenorrea, que nos ayuden a clarificar y cuantificar los cambios en los niveles de HAM a lo largo del ciclo. Asimismo, requerimos una mayor homogeneidad en los materiales y métodos utilizados, que evitaría las discrepancias entre estudios que hemos observado.

Algunos estudios encontraron que los niveles de HAM descendían durante la estimulación ovárica mediante FSH (La Marca *et al.*, 2010b; Patrelli *et al.*, 2012). La reducción de los niveles de la HAM durante la estimulación ovárica controlada puede ser debida al efecto negativo, directo o indirecto, de la FSH sobre la secreción ovárica de la HAM (La Marca *et al.*, 2010b). Además, durante la administración de FSH exógena se produce un incremento de los niveles de estradiol, el cual ha sido implicado en un mecanismo de regulación a la baja de la HAM y de los receptores tipo II de la hormona, AMHRII mRNA (La Marca *et al.*, 2006; Patrelli *et al.*, 2012). La estimulación con FSH induce el crecimiento folicular y por lo tanto la pérdida de su producción de HAM, y ésta es probablemente la principal razón para la reducción de sus niveles. Así, concluimos que su medida para predecir la respuesta ovárica debe ser realizada previamente al tratamiento con FSH, como realizamos en nuestro trabajo. Actualmente, Patrelli y cols. están llevando a cabo un estudio prospectivo que pretende analizar la conveniencia de revalorar la HAM a los sesenta días de la estimulación ovárica, para determinar si el descenso en sus niveles es transitorio o no. En el caso de que no lo fuera, con cada ciclo de FIV observaríamos una reducción de la RO y ello nos debería hacer reconsiderar el máximo número de estimulaciones que podríamos realizar sin provocar una menopausia temprana.

En un interesante estudio llevado a cabo en 2005, se evaluaron y compararon los distintos TRO en una población de mujeres con capacidad reproductiva normal en el transcurso de cuatro años (van Rooij *et al.*, 2005). Los autores definían cuatro requerimientos que debía cumplir el marcador ideal del descenso de la función reproductiva. Primero, debía estar biológicamente relacionado con el pool de folículos/oocitos. En segundo lugar, el marcador debía estar claramente asociado con la edad. Tercero, debía mostrar un cambio con el tiempo, preferiblemente desde los treinta años hasta los cincuenta, y no sólo durante el periodo de transición a la menopausia. Por último, la variación individual de la media debía ser consistente, es decir que el nivel por encima o por debajo de la media para cada edad, debía

permanecer igual en el tiempo. Se halló que el RFA no cambió con respecto al tiempo, mientras que la HAM, FSH e inhibina B variaron significativamente. Sin embargo, sólo la HAM mostró un declive longitudinal en su media, tanto en mujeres menores de 35 años, como en mayores de 40. La HAM fue el marcador que mejor cumplía los criterios descritos, por ello concluían que la HAM es quien mejor reflejaba el declive del pool folicular con la edad. El RFA cumplía las características de marcador ideal de RO, excepto la presencia de un descenso con el tiempo, lo cual pudo ser debido a la variabilidad interobservador. La FSH, estradiol e inhibina B, en cambio no se mostraban tan eficaces en los distintos parámetros estudiados.

Ya en 2002, otro grupo de trabajo estudió un conjunto de mujeres en dos periodos distintos y el intervalo entre las dos visitas varió desde 1.1 a 7.3 años. Se observó una reducción en los valores medios de HAM alrededor del 38%, mientras el número de folículos antrales y los niveles de FSH e inhibina B no cambiaron (de Vet *et al.*, 2002).

Los niveles séricos de HAM muestran una reducción durante la vida reproductiva de la mujer (de Vet *et al.*, 2002). Valores indetectables después de la menopausia espontánea han sido reportados. La ovariectomía bilateral en mujeres con ciclos regulares se asocia con la desaparición de los niveles de HAM en 3-5 días, lo cual demuestra que sus niveles séricos son exclusivamente de origen ovárico (Patrelli *et al.*, 2012). La HAM es un marcador endocrino que refleja la transición de los folículos primordiales restantes a folículos en crecimiento. Disminuye gradualmente en los cinco años previos al final del periodo menstrual, quizás representando un factor biológico clave durante la transición a la menopausia (Patrelli *et al.*, 2012; Sowers *et al.*, 2008). Los niveles de HAM en la fase folicular temprana resultan del pool de folículos que empezaron a producirla ya intraútero y esta producción es independiente de las gonadotropinas. Esto la convierte en un marcador único, que proporciona una perspectiva no disponible con los actuales marcadores séricos y ecográficos (Seifer *et al.*, 2002). Se postula como el mejor indicador de la salud ovárica, y así se convierte en un parámetro crucial para valorar la respuesta a los tratamientos de fecundación in vitro.

Este estudio prospectivo fue realizado con la finalidad de evaluar la eficacia de la HAM como marcador predictivo de RO y respuesta a Técnicas de Reproducción asistida. Para ello, 153 pacientes con antecedentes de dos o más fallos a TRA fueron

incluidas. Analizamos la relación entre edad, FSH, LH, 17-b estradiol, RFA y HAM con la variable respuesta ovárica, definida por el número de ovocitos recuperados tras la estimulación ovárica. A su vez, analizamos la relación entre el RFA y la HAM, y entre cada uno de ellos con la calidad de los ovocitos, la calidad embrionaria y los resultados reproductivos.

Realizamos un primer análisis con la intención de demostrar que la HAM y el recuento de ovocitos recuperados se comportaban de igual manera en los distintos grupos de edad. Encontramos que a menor edad y mayor concentración de HAM, mayor era la respuesta, es decir, el número de ovocitos recuperados. Al comparar ovocitos recuperados y HAM por grupos de edad la dispersión no mostraba significación estadística, lo cual nos permitía comparar ambas variables. El mismo análisis realizamos con el RFA, obteniendo igual resultado.

Encontramos que la edad media de las mujeres del grupo bajas respondedoras era significativamente mayor que los grupos normo y alta, como tantos otros autores (Nardo *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2007; Satwik *et al.*, 2012). No hallamos diferencias de edad entre las bajas respondedoras no canceladas y las canceladas, por ello podemos afirmar que la edad es un parámetro clínico de interés en reserva ovárica sólo para bajas respondedoras con/sin cancelación. Existe una relación lineal negativa entre HAM y edad.

Por otro lado detectamos diferencias en los niveles de HAM entre los grupos respuesta, excepto entre bajas canceladas y no canceladas. Por ello nos preguntamos si estas diferencias se debían sólo a la edad, o realmente la variable respuesta está relacionada con la HAM. Para ello estudiamos diferencias entre niveles de respuesta ajustados por la edad. Como ya vimos el nivel alta se comportaba de distinta manera. Explicamos este resultado debido a un valor de HAM excesivamente alto en una de las diez pacientes altas respondedoras, probablemente consecuencia de un error de laboratorio. Si eliminábamos el nivel alta, la relación entre la HAM y la edad era la misma para las mujeres normo y bajas respondedoras (incluidas bajas no canceladas y canceladas). Eliminando la edad encontramos diferencias entre normo y bajas respondedoras ($p=0.0023$), confirmando los resultados que otros autores hallaron previamente (La Marca y Volpe, 2006b; Fiçicioglu *et al.*, 2006; Patrelli *et al.*, 2012). La HAM se comporta como un predictor de respuesta independiente de la edad (Nelson *et al.*, 2007). Sin embargo no hallamos diferencias entre bajas no canceladas

y canceladas ($p=0.8824$). Nelson y cols. en un estudio en el que incluyeron 340 pacientes sometidas a su primer ciclo FIV sí encontraron que los valores de HAM en las pacientes canceladas eran significativamente más bajos que en el resto de categorías. No obstante, demostraron que la HAM se mostraba pobremente eficaz como test de screening para ciclos cancelados e incluso para baja respuesta, debido a una superposición en la distribución de los valores de HAM en mujeres con respuesta normal (Nelson *et al.*, 2007). En nuestro estudio incluimos pacientes con antecedentes de fallos a TRA, con el objetivo de identificar aquellas que realmente tenían muy bajas probabilidades de éxito. De haberlo hecho, la HAM nos permitiría rechazar un nuevo tratamiento a estas pacientes.

Realizando el mismo análisis con el RFA los resultados fueron similares: la relación entre RFA y la edad es la misma en los distintos niveles de respuesta y existen diferencias significativas entre cada grupo, excepto entre bajas canceladas y no canceladas.

Una proporción de mujeres (2-30%) que van a ser sometidas a una estimulación ovárica controlada, experimentan baja respuesta (Hendriks *et al.*, 2005), para lo cual no existe una definición universal. Varios criterios han sido utilizados para caracterizar la baja respuesta. El número de folículos desarrollados y el número de ovocitos recuperados son dos de los más importantes. El número propuesto varía entre los diferentes autores, que han propuesto rangos entre 3 a menos de 5 folículos el día de la administración de la HCG y desde 3 a menos de 5 ovocitos recuperados tras la punción ovárica (Tarlatzis *et al.*, 2003). Más lógicamente, baja respuesta se ha considerado si el ciclo es cancelado debido a una inadecuada respuesta ovárica a la estimulación. De cualquier manera, independientemente de la definición utilizada, las pacientes con baja respuesta presentan resultados gestacionales peores que pacientes de la misma edad pero respuesta normal (La Marca *et al.*, 2010b).

Van Rooij (Van Rooij *et al.*, 2002) fue uno de los primeros en describir un alto grado de correlación entre la HAM y el número de ovocitos recuperados. Los valores cut-off para baja respuesta reportados por distintos estudios varían desde 0.1 a 2 ng/ml, como también varía su valor predictivo para baja respuesta, presentando rangos de sensibilidad y especificidad entre 44-97% y 41-100%, respectivamente (La Marca *et al.*, 2010b). Esta variabilidad se explica por las diferencias en el diseño de los estudios: tamaño muestral, criterios de baja respuesta, prevalencia de bajas

respondedoras en la muestra, lo cual tiene una clara relación con el número de pacientes mayores, y según algunos autores por el uso de diferentes variantes de ensayo de laboratorio para medir la HAM (Nakhuda, 2008; Seifer and Maclaughlin, 2007). No todos los estudios han obtenido una sensibilidad (>75%) y especificidad óptimas (>85%) (La Marca *et al.*, 2010b). Un valor cut-off más definitivo para determinar una respuesta baja, sería lo deseable. Lo que se espera de este valor cut-off es que distinga con una precisión cercana al 100% una baja respondedora de una que no lo es. Más precisamente, ninguna mujer con potencial para una buena respuesta debería ser clasificada como baja respondedora si tal categorización la privara de ser incluida en un ciclo FIV. ¿Por qué rechazar a una mujer que tiene buenas posibilidades de gestación? Ésta es la premisa en la cual los valores cut-off de HAM son estudiados.

Si consideramos baja respuesta como enfermedad positiva, un verdadero positivo sería una baja respondedora correctamente clasificada y un verdadero negativo una normorespondedora correctamente clasificada. Un falso negativo sería una paciente baja respondedora erróneamente clasificada como normal y un falso positivo una paciente normorespondedora erróneamente clasificada como baja respuesta. Estadísticamente interesaría que un test tuviera un número de falsos positivos cercano a cero, lo que equivaldría a tener una especificidad cercana al 100%. Sin embargo, una alta especificidad compromete la sensibilidad e incrementa el número de individuos con potencial para baja respuesta reclutados “erróneamente” para un FIV, incrementando así los ciclos cancelados o con escasos ovocitos recuperados. Por tanto, nuestro test debería compensarse con un buen valor de sensibilidad que permita tener un aceptable número de falsos negativos. Obtuvimos un valor cut-off de 9.28 pmol/l (=1.29 ng/ml) y un área bajo la curva de 0.7186, que se corresponden con un valor moderado de especificidad (64%) y a su vez con una aceptable sensibilidad (72%). Nuestros valores se encuentran dentro del rango con los de la mayoría de autores revisados, aunque la mayoría de ellos presenta mejor sensibilidad y/o especificidad (La Marca *et al.*, 2010b; Nardo *et al.*, 2009; Satwik *et al.*, 2012; Gnoth *et al.*, 2008; Kwee *et al.*, 2008; Fiçiciouglu *et al.*, 2006). Nuestros resultados demostraron una asociación entre HAM y el RFA, algo lógico si recordamos que la HAM refleja el pool de folículos ováricos (de Vet *et al.*, 2002; Fiçiciouglu *et al.*, 2006). Ambas coordenadas sirven claramente para conocer

la respuesta y por tanto la reserva ovárica. La mayoría de autores han reportado similar valor predictivo para baja respuesta para ambos (van Disseldorp *et al.*, 2010; Broer *et al.*, 2009; Panchal and Nagori, 2012). La Marca y cols publicaron en 2010 una revisión de estudios (La Marca *et al.*, 2010b). Sólo Fiçicioglu *et al.* (2006) y McIlveen *et al.* (2007) concluyeron que HAM era mejor que el RFA, mientras que otros dos estudios encontraron al RFA superior (Eldar-Geva *et al.*, 2005; Kwee *et al.*, 2007). Del mismo modo, un estudio reciente halló que el RFA era el mejor y el único parámetro independiente entre otros marcadores, incluida la HAM, para predecir baja respuesta ovárica (Mutlu *et al.*, 2013). En nuestro estudio el RFA parece tener mejor capacidad predictiva para baja respuesta que la HAM, aunque no estudiamos diferencias significativas entre ambas curvas ROC. Un valor cut-off de 7 se asocia con un área bajo la curva de 0.8010, una sensibilidad del 74% y una especificidad del 75%. Sin embargo, cabe decir que el RFA está sujeto a una variabilidad interobservador, debido a la duración del examen ecográfico, la experiencia del ecografista, el equipo utilizado y la RO esperada en función de la edad de la paciente.

Ningún estudio previo ha analizado el valor predictivo de la HAM junto al RFA. Sólo Muttukrishna y cols observaron que el valor acumulado usando la determinación de FSH, Estradiol, inhibina B, HAM, el RFA y la edad daba el mejor valor predictivo para identificar bajas respondedoras (Mutturkrishna *et al.*, 2005). Nosotros calculamos una nueva curva ROC para la unión de ambos marcadores y obtuvimos una mayor área bajo la curva (0.832). La unión de ambos mejora por tanto la precisión de cada uno por separado. Ambas son variables relacionadas significativamente con la respuesta, y por tanto HAM está explicando una parte de la variabilidad sobre el nivel de respuesta que no explica el RFA, y viceversa. De igual manera, la edad parece mejorar la capacidad predictiva para baja respuesta tanto de la HAM (área bajo la curva: 0.772) como del RFA (área bajo la curva: 0.81), aunque en este caso tampoco estudiamos diferencias significativas entre curvas ROC. Lo que también queda claro tras nuestro estudio, es que HAM y RFA presentan mejor valor predictivo para respuesta ovárica que el Estradiol, la FSH y la prolactina, que cómo vimos carecen de valor en la práctica clínica para conocer la respuesta ovárica.

Nuestro estudio trataba de encontrar si la HAM podía discernir entre las pacientes con baja respuesta canceladas del resto. Hemos visto que no hallamos

diferencias significativas entre los valores de HAM entre bajas respondedoras y bajas respondedoras canceladas. Tratamos de calcular una nueva curva ROC que nos mostrara el valor predictivo de la HAM en este punto. Obtuvimos un área bajo la curva y unos valores de sensibilidad y especificidad bajos (área bajo la curva: 0.638; cut off: 8.76 pmol/l; sensibilidad: 61%; especificidad: 67%). Por tanto, no parece que nuestra hormona distinga con la precisión idónea entre las pacientes con baja respuesta canceladas, del resto. Tampoco con el RFA obtuvimos resultados satisfactorios en este sentido. Un estudio realizado por el Hospital Clínic de Barcelona en 2005 halló que un valor umbral de 4.9 pmol/l discriminaba entre pacientes canceladas y las que continuaban el tratamiento de fertilidad (área bajo la curva: 0.81; sensibilidad: 53%; especificidad: 96%). Además observó que los niveles de HAM obtenidos el día 5 del ciclo durante la estimulación ovárica con gonadotrofinas eran mejor predictores de ciclo cancelado que los niveles basales de HAM. Sin embargo, la capacidad predictiva de la HAM el día 5 no era mejor que la proporcionada por el estradiol obtenido el mismo día (Peñarrubia *et al.*, 2005). Y cómo podemos comprobar, obtuvieron un alto valor de especificidad, a expensas de un muy bajo valor de sensibilidad y un bajo valor umbral.

El estatus de la reserva ovárica incluye tanto la cantidad como la calidad del pool de folículos ováricos. Por tanto, la HAM podría no sólo reflejar el aspecto cuantitativo de la respuesta ovárica, si no también el cualitativo. Algunos autores han encontrado una correlación positiva significativa entre los niveles de HAM y la calidad ovocitaria (Ebner *et al.*, 2006; Lekamge *et al.*, 2007; Irez *et al.*, 2011), aunque algunos de ellos realizando mediciones de HAM en líquido folicular (Cupisti *et al.*, 2007; Fanchin *et al.*, 2007). Otros sin embargo no confirmaron dicha relación (Lie Fong *et al.*, 2008). Del análisis realizado en este trabajo, deducimos que existe una relación lineal significativa entre la HAM y los ovocitos en metafase II. Hemos realizado el mismo análisis pero mediante una regresión de Poisson, obteniendo de igual manera que existe una relación significativa entre los valores de HAM y el número de ovocitos maduros. El mismo resultado hemos encontrado para el RFA y la edad. Es lógico pensar que pacientes de menor edad presentarán mayor número de folículos ováricos y de mejor calidad, y como vimos estas pacientes presentan mayores valores de HAM y de RFA.

Aunque los estudios en líquido folicular parecen indicar que la HAM puede ser útil en la predicción de la calidad de los ovocitos y embriones y en los resultados gestacionales, no podemos afirmar lo mismo para los niveles séricos de HAM. Hasta el momento son pocos los estudios que concluyen que los niveles de HAM en sangre puedan dar una información relevante acerca de los ovocitos, la calidad embrionaria y los resultados gestacionales (La Marca *et al.*, 2010b). Silberstein y cols (2006) encontraron que la HAM medida el día de la administración de la HCG se correlacionaba significativamente con la calidad embrionaria, permitiendo distinguir entre los embriones de alta y baja calidad. En consecuencia niveles más altos de HAM se relacionaban con una mayor tasa de implantación, pero no con una mejor tasa de embarazos (Silberstein *et al.*, 2006). Un estudio más reciente concluía que tanto la HAM como el RFA eran buenos predictores del número de embriones de buena calidad disponibles para transfer y/o congelación (Majumder *et al.*, 2010). Otros estudios sin embargo no han hallado una correlación significativa entre los embriones obtenidos y/o transferidos y los valores basales de HAM (Lie Fong *et al.*, 2008; Riggs *et al.*, 2011; Patrelli *et al.*, 2012). Así los valores de HAM parecen no ser un buen marcador de calidad embrionaria (La Marca *et al.*, 2010b). Nosotros encontramos una relación lineal positiva y significativa entre la HAM, y el RFA, con la calidad embrionaria. Sin embargo, mediante este análisis de regresión lineal no podemos concluir que la HAM sea un marcador predictivo de calidad embrionaria, ya que no hemos analizado si los valores de HAM se correlacionan significativamente con los embriones de mejor calidad. Simplemente hemos observado una tendencia positiva que nos muestra que a mayores niveles de HAM, mayor es el número de embriones G1G2, aunque observamos que esta línea se aproxima a cero y existe una amplia variabilidad en los datos obtenidos, por lo que el modelo es incapaz de detectar una relación entre estas variables.

La gran mayoría de los estudios que investigaron el valor de la HAM en la predicción de la gestación tras un tratamiento de FIV, reportaron que la medida de dicha hormona no es útil en la predicción del éxito gestacional (Gnoth *et al.*, 2008; Fişcioglu *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2010b; Patrelli *et al.*, 2012). Sólo pocos estudios aportaron un valor de cut-off significativo que fuera capaz de distinguir entre embarazo y no embarazo. Cabe recalcar que sólo dos de estos estudios fueron prospectivos (Eldar-Geva *et al.*, 2005; Elgindy *et al.*, 2008), pero limitados por un pequeño

número de sujetos (n=56 y 33, respectivamente). Contrariamente el estudio más largo (n=109) que concluyó que la HAM podía ser predictiva de gestación presentaba un diseño retrospectivo (Lekamge *et al.*, 2007). Sin embargo como consecuencia de la relación entre los valores séricos de HAM y la respuesta cuantitativa a la estimulación ovárica, mujeres con bajos niveles de HAM presentaban menos ovocitos recuperados y generaban por tanto menor número de embriones, culminando en una tasa de gestación que resultaba la mitad que la tasa hallada para las pacientes con niveles altos de HAM (Lekmage *et al.*, 2007). Así el índice más alto de embarazos observado en el grupo de pacientes con niveles altos de HAM, cuando comparabas con aquellos con niveles bajos, podía ser explicado en base a un incremento de los ovocitos disponibles (La Marca *et al.*, 2010b). Otro estudio encontró mejor poder discriminatorio para la predicción de no embarazo para los test dinámicos del citrato de clomifeno y el EFFORT respecto a la HAM (Kwee *et al.*, 2008).

Encontramos un estudio que muestra relación entre los niveles de HAM y el índice de nacimientos tras un tratamiento FIV (Nelson *et al.*, 2007). En este amplio estudio prospectivo que incluía 340 pacientes se demostró que la tasa de nacimientos se incrementaba con el aumento de los niveles basales de HAM. Sin embargo, esto fue válido sólo para mujeres con niveles de HAM <7.8 pmol/l. Por encima de este valor la HAM no discriminaba entre nacimientos o no. Según los autores la relación entre el incremento de la HAM y los nacimientos probablemente refleja la fuerte correlación entre la HAM y los ovocitos recuperados, como se observa en dicho estudio, la HAM no es un predictor independiente de nacimiento tras la incorporación de los ovocitos recuperados en el modelo (Nelson *et al.*, 2007). Altos niveles de HAM han sido asociados con mejores índices de gestación por algunos (Eldar-Geva *et al.*, 2005), congruente con una correlación con el número de ovocitos maduros y subsecuentemente con el de embriones disponibles para transferir (Hazou *et al.*, 2004). La observación de que la HAM no predice los nacimientos independientemente de los ovocitos recuperados indica que la HAM no predice la calidad de los ovocitos o embriones (Nelson *et al.*, 2007). Nosotros no encontramos diferencias en los niveles de HAM entre pacientes con gestación y no gestación, aunque incluyéramos la edad en la interacción.

El valor predictivo de la respuesta ovárica cualitativa en TRA permanece controvertido respecto a la HAM. Como hemos visto, la evidencias sugieren que

su relación puede ser únicamente indirecta y relacionada con una fuerte correlación entre los valores de HAM y la respuesta ovárica cuantitativa a la estimulación controlada. Además los malos resultados en cuanto a su poder discriminatorio de gestación y/o nacimientos pueden ser atribuidos a otros factores que influyen en la fertilidad humana tales con el factor masculino y factores endometriales.

En conclusión, en base a los resultados obtenidos en este estudio podemos afirmar que la HAM es un marcador predictivo eficaz de reserva ovárica y de respuesta a técnicas de reproducción asistida. La HAM ha demostrado mejor valor predictivo para baja respuesta que la FSH, el estradiol y la Prolactina. El RFA determina la baja respuesta mejor que la HAM, pero la unión de ambos mejora el potencial predictivo de cada uno por separado, por lo tanto, la utilización conjunta de ambos marcadores parece ser la mejor herramienta en el ámbito de la reproducción asistida para la predicción de la respuesta que cabe esperar en una paciente sometida a TRA, y que por tanto nos permitirá programar e individualizar el tratamiento más adecuado. La HAM no permite distinguir con exactitud las pacientes con más probabilidades de tener un ciclo cancelado, y por tanto no podemos denegar un tratamiento de fertilidad a ninguna paciente en función de sus valores. La unificación de valores de referencia para identificar las bajas respondedoras sería lo deseable. De momento, seguiremos utilizando la HAM como información útil previa a un tratamiento de fertilidad, que nos acercará a la reserva ovárica de cada paciente, y nos permitirá aconsejar sobre las posibilidades de éxito tras FIV.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Las diferencias en la HAM entre los niveles de respuesta han sido claramente significativas.
2. Las diferencias entre baja y normo respondedoras evidencian una correlación estadísticamente significativa de extraordinario interés clínico.
3. La HAM en altas respondedoras muestra valores mucho más elevados, por lo que puede emplearse como predictiva. No hemos hallado diferencias de HAM entre pacientes con baja respuesta canceladas y pacientes con baja respuesta no canceladas.
4. La variable edad no influye en la relación entre HAM y respuesta si excluimos el nivel *Alta*, por tanto la variable respuesta sí está relacionada con la HAM.
5. Detectamos también diferencias significativas de RFA entre los niveles de respuesta. No detectamos diferencias entre pacientes con baja respuesta canceladas y pacientes con baja respuesta no canceladas. La variable edad no influye en la relación entre RFA y respuesta.
6. La relación de la HAM con el RFA muestra una significación estadística clara. A valores más bajos de HAM menor el número de folículos antrales observados con modo sonoAVC. Esta relación señala que ambos parámetros son reflejo de la “reserva ovárica existente”.
7. Podemos considerar hoy, de acuerdo a nuestros resultados, valores de referencia para HAM $\leq 1,3$ ng equivalentes a 10 pmol/l. La sensibilidad y especificidad obtenidas son moderadamente buenas.
8. El valor predictivo de la HAM para la detección de ciclos cancelados es bajo.

9. El RFA presenta mejor valor predictivo que la HAM para la detección de baja respuesta. Pero también presenta bajo valor para la detección de ciclos cancelados.
10. El uso conjunto de la HAM y el RFA mejora su valor predictivo.
11. La edad mejora el valor predictivo tanto de la HAM como del RFA para baja respuesta.
12. La relación de la HAM y RFA con la Prolactina y 17β -Estradiol ha mostrado que estas carecen de significación. Deben ser eliminadas de los protocolos de inducción permaneciendo solo como parte integrante del estudio basal de la esterilidad.
13. La capacidad de la FSH para discriminar entre normo y baja respuesta es reducida, si la comparamos con la HAM y el RFA. Más aún, si bien por encima de un valor límite de 10 UI ha habido 2 falsos positivos, el número de mujeres no embarazadas con valores de normalidad es alto. La FSH (excepción hecha de los estudios basales de la esterilidad) carece de valor, para la reserva.
14. Existe una relación estadísticamente significativa entre los valores de HAM y RFA y el número de ovocitos maduros obtenidos. Se aprecia que son predictivas de madurez ovocitaria.
15. La salida de la regresión lineal con la calidad de los embriones G1 G2 muestra que la recta para la *relación entre la HAM y la calidad embrionaria G1 G2*, es ajustada, casi horizontal. Con tanta variabilidad, el modelo es incapaz de detectar una relación entre estas variables.
16. El análisis estadístico de la *relación entre el RFA y la calidad embrionaria G1 G2* no muestra diferencias significativas, ya que existe gran variabilidad en los datos obtenidos. Por tanto carece de valor predictivo.
17. No hemos detectado diferencias significativas entre mujeres que quedan y no quedan gestantes en la *relación entre la HAM, RFA y pronóstico reproductivo*. No son predictivos.

18. Proponemos a la HAM y el RFA como únicos parámetros a determinar para el estudio de la reserva ovárica. Valores muy bajos (1,15 ng/ml = 10 pmol/l) podrían emplearse como predictivos, e informar de las mínimas posibilidades de éxito del tratamiento. Con valores inferiores a 1 ng/ml cabría recomendar directamente otras alternativas reproductivas (ovorrecepción).
19. El hecho de que con valores muy bajos de HAM y RFA hayamos tenido embarazos no permite como hubiéramos deseado, negar la FIV a quien la solicite, aún a sabiendas de lo que presumiblemente acontecerá. La pareja deberá estar perfectamente informada.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALMOG B, SHEHATA F, SUISSA S, HOLZER H, SHALOM-PAZ E, LA MARCA A, MUTTUKRISHNA S, BLAZAR A, HACKETT R, NELSON SM, CUNHA-FILHO JS, ELДАР-GEVA T, MARGALIOETH EJ, RAINE-FENNING N, JAYAPRAKASAN K, MCILVEEN M, WUNDER D, FREOUR T, NARDO LG, BALASCH J, PEÑARRUBIA J, SMEENK J, GNOTH C, GODEHARDT E, LEE TH, LEE MS, LEVIN I, GAMZU R, TULANDI T. Age-related normograms of serum antimüllerian hormone levels in a population of infertile women: a multicenter study. *Fertil Steril.* 2011;95:2359-63.
- ABMA JC, CHANDRA A, MOSHER WD, PETERSON LS AND PICCININO LJ. FERTILITY, family planning, and women's health: new data from the 1995 National Survey of Family Growth. *Vital Health Stat* 1997; 23:1-114.
- AVRIL C. Antral follicle count and oocyte quality. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006;35(5, Part 2). 2S42-3.
- BAKER TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. London Biol. J.* 1963;158:417-433.
- BANCSI LF, MUIJS AM, DEN OUDEN CT, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, et al. Basal follicle stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000;73: 552-7.
- BANCSI LF, BROCKMANS F, EIJKEMANS M, DE JONG F, HABBEMA D, et al. Predictors in poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77: 328-36.
- BANCSI LF, BROEKMANS FJ, MOL BW, HABBEMA JD, TE VELDE ER. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: A meta-analysis. *Fertil Steril.* 2003;79:1091-100.
- BARAD DH, WEGHOFER A, GLEICHER N. Comparing anti-Müllerian hormone (AMH) and follicle-stimulating hormone (FSH) as predictors of ovarian function. *Fertil Steril.* 2009;91(4 Suppl): 1553-1555.
- BLOCK E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Variations at different ages. *Acta Anat.* 1952;14:108-123.

- BLUMENFELD Z, HAIM N. Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. *Ann Med.*1997; 29:199-206.
- BONILLA-MUSOLES F. Embriología y Anatomía del ovario. *Rev Esp Obstet Ginecol* 1974a;31: 675-714.
- BONILLA-MUSOLES F, RENAU J, HERNANDEZ-YAGO J, TORRES JV. How do oocytes disappear?. *Arch.Gynaekol.* 1974b;218,:233-241.
- BONILLA-MUSOLES F, DOLZ M, RAGA F, MORENO J. *Reproducción Asistida: manejo clínico*. Panamericana. Madrid. 2009.
- BONILLA-MUSOLES, F; CASTILLO, JC; CABALLERO, O; PEREZ-PANADES, J; RAGA, F; BONILLA JR., F; ABAD DE VELASCO L, DOLZ, M. ¿Es posible predecir la reserva ovárica mediante la hormona antimülleriana (HAM) y el recuento de folículos antrales (RFA) en pacientes con fallo previo de técnicas de reproducción asistida (TRA)?. *Rev. Iberoam. Fértil* 2010a;27:97-112.
- BONILLA-MUSOLES F; CASTILLO JC; CABALLERO O; RAGA F; BONILLA JR.F; DOLZ M. Hormona anti-Mülleriana: un marcador directo predictivo en reproducción asistida; I- Envejecimiento ovárico. *Rev. Iberoam. Fertil.* 2010b;27:5-12.
- BONILLA-MUSOLES F; CASTILLO JC; CABALLERO O; RAGA F; BONILLA JR.F; DOLZ M. Hormona anti-Mülleriana: II- Situación actual. *Rev. Iberoam. Fertil.* 2010c;27:13-31.
- BONILLA-MUSOLES F, DOLZ M, MORENO J, RAGA F. El envejecimiento ovárico en Reproducción asistida: manejo clínico. Editores. Panamericana. Madrid. 2010d; 179-205.
- BOOMSMA CM, MACKLON NS. What can the clinician do to improve implantation?. *Reprod Biomed Online* 2006;13:845-855.
- BROEKMANS FJ, KWEE J, HENDRIKS DJ, MOL BW, LAMBALK CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:685-718.
- BROEKMANS FJ, VISSER JA, LAVEN JSE, BROER S, THEMME APN, FAUSER BC. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol. Metabolims.* 2008;19:340-347.
- BROEKMANS FJ, DE ZIEGLER D, HOWLES CM, GOUGEON A, TREW G, OLIVENNES F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril.* 2010; 94: 1044-51.

- BROER SL, MOL BW, HENDRIKS D, BROEKMANS FJ. The role of anti-Mullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2009;91:705-714.
- BUKMAN A, HEINEMAN MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Human Reprod Update*. 2001;7:581- 590.
- CASAÑ EM, RAGA F, BONILLA-MUSOLES F, POLAND ML. Human oviductal gonadotrophin-releasing hormone: Possible implications in Fertilization, early embryonic development and implantation. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2000;85:1377-1381.
- CASTELO-BRANCO CA, DEL RIO M, COLODRÓN M. Fallo ovárico prematuro. En: *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. Cabero, L and Cabrillo E (Ed.). Panamericana Publsh. Madrid, 2003, Vol II, 1344-1350.
- CHANG MY, CHIANG CH, CHIU TH, HSIEH TT, SOONG YK. The antral follicle count predicts the outcome of pregnancy in a controlled ovarian hyperstimulation/ intrauterine insemination program. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:12-7.
- CHUI DK, PUGH ND, WALKER SM, GREGORY L, SHAW RW. Follicular vascularity—the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an invitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod* 1997;12:191-6.
- COOK CL, SIOW Y, TAYLOR S, FALLAT ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859-61.
- COULAM CB, STRINGFELLOW N, HOEFNAGEL D. Evidence for a genetic factor in the etiology of the premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1983;40:693-695.
- COULAM CB, ADAMSON SC, ANNEGERS JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 1986;67:604-606.
- COSTELLO MF, SHRESTHA SM, SJOBLUM P, et al. Power Doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:359-65.
- CUKURCAM S, BETZENDAHL I, MICHEL G, VOGT E, HEGELE-HARTUNG C, LINDENTHAL B, EICHENLAUB-RITTER U. Influence of follicular fluid meiosis-activating sterol on aneuploidy rate and precocious chromatid segregation in aged mouse oocytes. *Hum Reprod.* 2007;22:815-28.
- CUPISTI S, DITTRICH R, MUELLER A, STRICK R, STIEGLER E, BINDER H, BECKMANN

- MW, STRISSEL P. Correlations between anti-Müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res* 2007;12:604–608.
- DE VET A, LAVEN JS, DE JONG FH, THEMME AP, FAUSER BC (2002) Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 77: 357– 62.
- DUMESIC DA, LESNICK TG, STASSART JP, BALL GD, WONG A, ABBOTT DH. Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 2009;92:217-21.
- DURLINGER AL, GRUIJTERS MJ, KRAMER P, KARELS B, INGRAHAM HA, NACHTIGAL MW, UILENBROEK JT, GROOTEGOD JA, THEMME AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2002;143:1076-84.
- EBNER T, SOMMERGRUBER M, MOSER M, SHEBL O, SCHREIER-LECHNER E, TEWS G. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Human Reprod*. 2006; 8:2022-2026.
- ELDAR-GEVA T, BEN-CHETRIT A, SPITZ IM, RABINOWITZ R, MARKOWITZ E, MIMONI T, GAL M, ZYLBER-HARAN E, MARGALIOTH EJ. Dynamic assays of inhibin B, anti-müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005;20:3178–3183.
- ELGINDY, E.A, EL-HAIEG DO, EL-SEBAEY A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil. Steril*. 2008;89:1670–1676.
- FADDY MJ, GOSDEN RG, GOUGEON A, RICHARDSON SJ, NELSON JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life.: implications for forecasting menopause. *Human Reprod* 1992;7:1342-1346.
- FANCHIN R, SCHONAUER LM, RIGHINI C, FRYDMAN N, FRYDMAN R, TAIEB J. Serum anti-Müllerian dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Human Reprod* 2003a;18:328-332.

- FANCHIN R, SCHONAUER LM, RIGHINI C, GUIBOURDENCHE J, FRYDMAN R, TAIEB J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003b;18:323–327.
- FANCHIN R, MENDEZ DH, LOUAFI N, ACHOUR N, FRYDMAN R, TAIEB J. Dynamics of serum anti-Mullerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2005a;20:747–751.
- FANCHIN R, LOUAFI N, MÉNDEZ LOZANO DH, FRYDMAN N, FRYDMAN R, TAIEB J. Per-follicle measurements indicate that anti-müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2005b;84:167–173.
- FANCHIN R, TAIEB J, LOZANO DH, DUCOT B, FRYDMAN R, BOUYER J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005c; 20:923 – 927.
- FANCHIN R, MENDEZ DH, FRYDMAN N, GOUGEON A, DI CLEMENTE N, FRYDMAN R, TAIEB J. Anti-Müllerian Hormone concentrations in the follicular fluid of preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1796-1802.
- FASOULIOTIS SJ, SIMON A AND LAUFER N. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:357–373.
- FIŞICIOĞLU C, KUTLU, T, BAGLAM, E, BAKACAK, Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil.Steril.* 2006;85:592-596.
- FLEMING R, DESHPANDE N, TRAYNOR I, YATES RW. Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod.* 2006;21:1436–1441.
- FLEMING R, FAIRBAIRN C, BLANEY C, LUCAS D, GAUDOIN M. Stability of AMH measurement in blood and avoidance of proteolytic changes. *Reprod Biomed Online.* Published online November 21, 2012.
- FREOUR T, MASSON D, MIRALLIE S, JEAN M, BACH K, DEJOIE T, BARRIERE P. Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod*

Biomed Online 2008;16:96–102.

GROOME NP, ILLINGWORTH PJ, O'BRIEN M, et al. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. Clin Endocrinol 1994;40:717–23.

GROOME NP, ILLINGWORTH PJ, O'BRIEN M, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1401–5.

GNOTH C, SCHURING AN, FRIOL K, TIGGES J, MALLMANN P, GODEHARDT E. Relevance of anti-müllerian hormone measurement in a routine IVF program. Human Reprod. 2008;23:1359-1365.

GOSDEN RG: Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis?. Human Reprod Update 2004;10:193-195.

HADLOW N, LONGHURST K, McCLEMENTS A, NATALWALA J, BROWN SJ, MATSON PL. Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response. Fertil Steril 2013;99:1791-7.

HAZOUT A, BOUCHARD P, SEIFER DB, AUSSAGE P, JUNCA AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. Fertil Steril 2004; 82:1323–1329.

HEHENKAMP WJ, LOOMAN CW, THEMEN AP, DE JONG FH, TE VELDE ER, BROEKMANS FJ. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:4057–63.

HENDRIKS DJ, MOL BW, BANCISI LF, TE VELDE ER, BROEKMANS FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. Fertil Steril 2005; 83:291 – 301.

HENDRIKS DJ, KWEE J, MOL BW, TEVELDE ER, BROEKMANS FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: A comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. Fertil Steril 2007;87:764-75.

HOEK A, SCHOEMAKER J, DREXHAGE HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. Endocr Rev 1997;18:107-134.

IREZ T, OCAL P, GURALP O, CETIN M, AYDOGAN B, SAHMAY S. Different serum anti-Müllerian

- hormone concentrations are associated with oocyte quality, embryo development parameters and IVF-ICSI outcomes. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;248:1295-301.
- JEE BC, KU SY, SUH CS, KIM KC, LEE WD, KIM SH. Anti-Müllerian hormone and inhibin B levels at ovulation triggering day can predict the number of immature oocytes retrieved in in vitro fertilization cycles. *J Korean Med Sci.* 2008;23:657-61.
- JIRGE PR. Ovarian reserve tests. *J Hum Reprod Sci.* 2011 Sep;4(3):108-13.
- JONSON J, CANNING J, KANEKO T, PRU JK, TILLY JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004;428:145-150.
- KAIPIA A, HSUEH AJ. Regulation of ovarian follicle atresis. *Ann Rev Physiol* 1997;59:349-363.
- KIM SH, KU SY, JEE BC, SUH CS, MOON SY, LEE JY. Clinical significance of transvaginal color Doppler ultrasonography of the ovarian artery as a predictor of ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:103–12.
- KLEIN NA, ILLINGWORTH PJ, GROOME NP, MCNEILLY AS, BATTAGLIA DE, SOULES MR. 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;81:2742–5.
- KLINKERT ER, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, TE VELDE ER. A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1247–1253.
- KLINKERT ER, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, HABBEMA JD, TE VELDE ER. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:611–615.
- KUPESIC S, KURJAK A, BJELOS D, VUJISIC S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 2003;79:190–7.
- KUMAR A, KALRA B, PATEL A, McDAVID L, ROUDEBUSH WE. Development of a second generation anti-Müllerian hormone (AMH) ELISA. *J Immunol Method* 2010;362:51-9.
- KWEE J, SCHATS R, McDONNELL J, SCHOEMAKER J, LAMBALK CB. The clomiphene

- citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2006;85:1714-22.
- KWEE J, ELTING ME, SCHATS R, McDONNELL J, LAMBALK CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:9-17.
- KWEE J, SCHATS R, MC DONNELL J, TEMEN A, DE JONG F, LAMBALK C. Evaluation of anti-müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2008;90:737-743.
- La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-Mullerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004a;9:2738–2741.
- LA MARCA A, ORVIETO R, GIULINI S, JASONNI VM, VOLPE A, DE LEO V. Mullerian-inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics. *Fertil Steril* 2004b;82:970–972.
- LA MARCA A, STABILE G, CARDUCCI ARTENISIO A, VOLPE A. Serum anti-müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006a;21:3103-7.
- LA MARCA A, VOLPE A. Anti Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?. *Clin. Endocrinol*. 2006b;64:603-610.
- LA MARCA A, GIULINI S, TIRELLI A, BERTUCCI E, MARSELLA T, XELLA S, ET AL. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007;22:766–71.
- LA MARCA A, BROEKMANS FJ, VOLPE A, FAUSER BC, MACKLON NS. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?. *Hum Reprod*. 2009; 24:2264-75.
- LA MARCA A, SIGHINOLFI G, GIULINI S, TRAGLIA M, ARGENTO C, SALA C, MASCIULLO C, VOLPE A, TONIOLO D. Normal serum concentrations of anti-Müllerian hormone in women with regular menstrual cycles. *Reprod Biomed Online*. 2010a; 21:463-469.
- LA MARCA A, SIGHINOLFI D, RADIC C, ARGENTO E, BARALDI A, CARDUCCI ARTENSIO G, ET AL. Anti-Müllerian hormona (AHM) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reprod Update* 2010b;16:113-30.

- LAHLOU N, CHABBERT-BUFFET N, GAINER E, ROGER M, BOUCHARD P, VA29I4 STUDY GROUP. Diphasic pattern of anti-mullerian hormone (AMH) in ovulatory cycles as evidenced by means of an ultra-sensitive assay: new insights into ovarian function. *Fertil Steril* 2006;86(Suppl):S11.
- LASHEN H, LEDGER W, LOPEZ-BERNAL A, BARLOW D. Poor responders to ovulation induction: is proceeding to in-vitro fertilization worthwhile?. *Hum Reprod* 1999;14:964–969.
- LASS A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? *Hum Reprod* 2004;19:467–9.
- LEE TH, LIU CH, HUANG CC, WU YL, SHIH YT, HO HN, YANG YS, LEE MS. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod* 2008;23:160–167.
- LEKAMGE DN, BARRY M, KOLO M, LANE M, GILCHRIST RB, TREMELLEN KP. Anti-Müllerian hormone as a predictor of IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2007;14:602–610.
- LIE FONG S, BAART EB, MARTINI E, SCHIPPER I, VISSER JA, THEMME AP, DE JONG FH, FAUSER BJ, LAVEN JS. Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality?. *Reprod Biomed Online* 2008;16:664–670.
- LOVERRO G, NAPPI L, MEI L, GIACOMOANTONIO L, CARRIERO C, ET AL. Evaluation of functional ovarian reserve in 60 patients. *Reprod Biomed Online* 2003;7:200–4.
- MAHESHWARI A, FOWLER P, BHATTACHARYA S. Assessment of ovarian reserve-should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod* 2006;21:2729-35.
- MAJUMDER K, GELBAYA TA, LAING I, NARDO LG. The use of anti-Müllerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;150:166-70.
- MCILVEEN M, SKULL JD, LEDGER WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod* 2007;22:778–785.
- MENKEN J, TRUSELL J, LARSEN U. Age and Infertility. *Science* 1986;233:1389-1394.
- MOAWAD NS, GIBBONS H, LIU J, LAZEBNIK N. Comparison of 3- and 2-Dimensional

- Sonographic Techniques for counting ovarian follicles. *J. Ultrasound Med.* 2009;28:1281-1288.
- MUASHER SJ, OEHNINGER S, SIMONETTI S, ET AL. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1988;50:298–307.
- MUTLU MF, ERDEM M, ERDEM A, YILDIZ S, MUTLU I, ARISOY O, OKTEM M. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-müllerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:657-65.
- MUTTUKRISHNA S, SUHARJONO H, MCGARRIGLE H, SATHANANDAN M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone Markers of ovarian response in IVF/ICSI patients?. *Brit.J.Obstet.Gynaecol* 2004;111:1248-1253.
- MUTTUKRISHNA S, MCGARRIGLE H, WAKIM R, KHADUM I, RANIERI DM, SERHAL P. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology?. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* 2005;112:1384-1390.
- NAKHUDA GS. The role of mullerian inhibiting substance in female reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:257–264.
- NARDO LG, GELBAYA TA, WILKINSON H, ROBERTS SA, YATES A, PENBERTON P, LAING Y. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;90:1-8.
- NARDO LG, GELBAYA TA, WILKINSON H, ROBERTS SA, YATES A, PEMBERTON P, LAING I. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;92:1586-93.
- NASSERI A, MUKHERJEE T, GRIFO JA, NOYES N, KREY L, COPPERMAN AB. Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertil Steril* 1999;71:715–8.
- NAVOT D, DREWS MR, BERGH PA, GUZMAN I, KARSTAEDT A, SCOTT RT JR, GARRISI GJ, HOFMANN GE. Age related decline in female fertility is not due to diminishing capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil. Steril* 1994;61:97-101.

- NELSON, S.M, YATES RW, FLEMMING R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles—implications for individualization of therapy. *Hum. Reprod.* 2007;22:2414–2421.
- NELSON SM, YATES RW, LYALL H, JAMIESON M, TRAYNOR I, GAUDOI M, MITCHELL P, AMBROSE P, FLEMING R. Anti-müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Human Reprod.* 2009;24:867-875.
- NELSON SM, ANDERSON RA, BROEKMANS FJ, RAINE-FENNING N, FLEMING R, LA MARCA A. Anti-müllerian hormone: clairvoyance or crystal clear? *Hum Reprod* 2012;27:631-6.
- PANCHAL S, NAGORI CH. Comparison of anti-mullerian hormone and antral follicle count for assessment of ovarian reserve. *J Hum Reprod* 2012;5:274-278.
- PATRELLI TS, GIZZO S, SIANESI N, LEVATI L, PEZZUTO A, ET AL. (2012) Anti-Müllerian Hormone Serum Values and Ovarian Reserve: Can It Predict a Decrease in Fertility after Ovarian Stimulation by ART Cycles? *PLoS ONE* 7(9): e44571. doi:10.1371/journal.pone.0044571.
- PELLICER A, BALLESTER MJ, SERRANO MD, MIR A, SERRA V, REMOHI J, BONILLA-MUSOLES F. A etiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile women with normal basal FSH levels. *Human Reprod.* 1994;9:906-911.
- PELLICER A, ALBERT C, MERCADER A, BONILLA-MUSOLES F, REMOHI J, SIMON C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1B, Interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 1999a;71:482-489
- PELLICER A, RUBIO C, VIDAL F, REMOHI, J. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999b;71:1033-1039.
- PEÑARRUBIA J, FABREGUES F, MANAU D, CREUS M, CASALS G, CASAMITJANA R, CARMONA F, VANRELL JÁ, BLASCH J. Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005; 20:915–922.

- PEÑARRUBIA J, GARCÍA-VELASCO JA, REMOHÍ J. Etiología y teorías sobre baja respuesta. En Cuadernos de Medicina Reproductiva. Adalia Ed. Madrid. 2007;13:9-21.
- POPOVIC-TODOROVIC B, LOFT A, BREDKJAEER HE, BANGSBØLL S, NIELSEN IK, ANDERSEN AN. A prospective randomized clinical trial comparing an individual dose of recombinant FSH based on predictive factors versus a 'standard' dose of 150 IU/day in 'standard' patients undergoing IVF/ICSI treatment. Hum Reprod 2003;18:2275–2282.
- RAINE-FENNING N, JAYAPRAKASAN K, CLEWES J, JOERGNER I; BONAKI SD; CHAMBERLAIN S; ET AL.. SonoAVC: a novel method of automatic volume calculation. Ultrasound Obstet Gynecol 2008;31:691-696.
- RIGGS R, KIMBLE T, OEHNINGER S, BOCCA S, ZHAO Y, LEADER B, STADTMAUER L. Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. Fertil Steril. 2011;95:410-2.
- ROBERTS JE, SPANDORFER S, FASOULIOTIS SJ, KASHYAP S, ROSENWAKS Z. Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. Fertil Steril 2005;83:37–41.
- ROBSON SJ, BARRY M, NORMAN RJ. Power Doppler assessment of follicle vascularity at the time of oocyte retrieval in in vitro fertilization cycles. Fertil Steril 2008;90:2179–82.
- RUSTAMOV O, SMITH A, ROBERT SA, YATES AP, FITZGERALD C, KRISHNAN M, ET AL. Anti-müllerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. Human Reprod 2012;27:3085-91.
- SATWIK R, KOCHHAR M, GUPTA SM, MAJUMDAR A. Anti-mullerian hormone cut-off values for predicting poor ovarian response to exogenous ovarian stimulation in *in-vitro* fertilization. J Hum Reprod Sci. 2012 May-Aug; 5(2): 206–212.
- SCHEFFER GJ, BROCKMANS FJM, DORLAND M, HABBEMA JD, LOOMAN CW, TE VELDE ER. Antral follicle counts by transvaginal sonography are related to age in women with proven natural fertility. Fertil Steril 1999;72:845-851.
- SCOTT RT, LEONARDI MR, HOFMANN GE, ILLIONS EH, NEAL GS, NAVOT D. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population. Obstet Gynecol 1993;82(4, Part 1):539–44.

- SEIFER DB, LAMBERT-MESSERLIAN G, HOGAN JW, GARDINER AC, BLAZAR AS, BERCK CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997;67:110–4.
- SEIFER DB, MACLAUGHLIN DT, CHRISTIAN BP, FENG B, SHELDEN RM. Early follicular serum müllerian inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002;77:468–471.
- SEIFER DB, MACLAUGHLIN DT. Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance. *Fertil Steril* 2007;88:539 – 546.
- SEIFER DB, GOLUB ET, LAMBERT-MESSERLIAN G, BENNING L, ANASTOS K, WATTS DH, COHEN MH, KARIM R, YOUNG MA, MINKOFF H, GREENBLATT RM. Variations in serum müllerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women. *Fertil Steril* 2009;92:1674-1678.
- SHERMAN BM, WALLACE RB, TRELOAR AD. The menopausal transition: endocrinological and epidemiological considerations. *J. Biosoc. Sci. Suppl.* 1979;6:19-35.
- SHRESTHA SM, COSTELLO MF, SJOBLOM P, ET AL. Power Doppler ultrasound assessment of follicular vascularity in the early follicular phase and its relationship with outcome of in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:161–9.
- SILBERSTEIN T, MACLAUGHLIN DT, SHAI I, TRIMARCHI JR, LAMBERT-MESSERLIAN G, SEIFER DB, KEEFE DL, BLAZAR AS. Mullerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod.* 2006; 21:159-63.
- SINGER T, BARAD DH, WEGHOFFER A, GLEICHER N. Correlation of antimüllerian hormone and baseline follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 2009;91:2616-2619.
- SMEENK JM, SWEEP FC, ZIELHUIS GA, KREMER JA, THOMAS CM, BRAAT DD. Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2007, 87, 223-226
- SOWERS MR, EYVAZZADEH AD, MCCONNELL D, YOSEF M, JANNAUSCH ML, ET AL. Mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93: 3478–83.
- SOWERS M, MCCONNELL D, GAST K, ZHENG H, NAN B, MCCARTHY JD, ET AL.

- Anti-müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2010;94:1482-6.
- SPIRA A. The decline of fecundity with age. *Raturitas* 10 (Suppl),2008;15–22
- STREULI I, FRAISSE T, PILLET C, IBECHÉOLE V, BISCHOF P, DE ZIEGLER D. Serum AMH levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril*. Published online October 3, 2007.
- STREULI I, FRAISSE T, CHAPRON CH, BIJAOUI G, BISCHOF P, DE ZIEGLER D. Clinical uses of anti-Müllerian hormone assays: pitfalls and promises. *Fertil Steril* 2009;91:226–30.
- SYROP CH, DAWSON JD, HUSMAN KJ, SPARKS AE, VAN VOORHIS BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 1999;14:1752–6.
- TARIN JJ, RUIZ A; MIRÓ F, BONILLA-MUSOLS F, PELLICER A. Failed in vitro fertilization of human oocytes: a cytogenetic analysis. *Fertil Steril* 1991; 56:290-295.
- TARLATZIS BC, ZEPYRIDIS L, GRIMBIZIS G, BONTIS J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Human Reprod Update*. 2003;9:61-76.
- TE VELDE ER AND PEARSON PL. The variability of female reproductive aging. *Hum Reprod Update* 2002;8:141–154.
- TEMPLETON A, MORRIS JK AND PARSLAW W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment [see comments]. *Lancet* 1996;348:1402–1406.
- THOMAS FH, TELFER EE, FRASER HM. Expression of anti-Müllerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary *in vivo* is influenced by suppression of gonadotrophin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol*. 2009, 148:2273-2281.
- TOMOVA A, DEEPINDER F, ROBEVA R, KIRILOV G, MECHANDIJEV Z, KUMANOV P. Anti-Müllerian hormone in women with polycystic ovary syndrome before and after therapy with metformin. *Horm Metab Res*. 2011;43:723-7.
- TREMELLEN KP, KOLO M, GILMORE A, LEKAMGE DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2005;45:20–24.
- TSEPELIDIS S, DEVREKER F, DEMEESTERE I, FLAHAUT A, GERVY C, ENGLERT Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo ovulatory women. *Human Reprod* 2007;22:1837-40.
- ULUG U, BEN-SHLOMO I, TURAN E, ERDEN HF, AKMAN MA, BAHCELI M. Conception

- rates following reproduction in poor responder patients: A retrospective study in 300 consecutive cycles. *Reprod Biomed Online* 2003;6:439-443.
- VAN BLERKMON J, ANTCZAK M, SCHRADER R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod.* 1997;12:1047-55.
- VAN DER GAAST MH, EIJKEMANS MJ, VAN DER NET JB, DE BOER EJ, BURGER CW, VAN LEEUWEN FE, FAUSER BC, MACKLON NS. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online* 2006;13:476-480.
- VAN DER STEGE JG AND VAN DER LINDEN PJ. Useful predictors of ovarian stimulation response in women undergoing in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52,43-46.
- VAN DISSELDORP J, LAMBALK CB, KWEE J, LOOMAN CW, EIJKEMANS MJ, FAUSER BC, ET AL. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod.* 2010;25:221-7.
- VAN ROOIJ, I.A, BROEKMANS FJ, TE VELDE ER, FAUSER BC, BANCSE LF, TE JONG FH, TEMEN AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 2002;17:3065-3071.
- VAN ROOIJ IA, TONKELAAR I, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, SCHEFFER GJ, DE JONG FH, TEMEN AP, TE VELDE ER. Anti-müllerian hormona is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause.* 2004;11:601-606.
- VAN ROOIJ IA, BROEKMANS FJ, SCHEFFER GJ, LOOMAN CW, HABBEMA JD, ET AL. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005;83: 979-87.
- VENTURA SJ, MOSHER WD, CURTIN SC, ABMA JC AND HENSHAW S. Trends in pregnancy rates for the United States 1976-97: an update. *Natl Vital Stat Rep* 2001;49:1-9.
- WALLACE AM, FAYE SA, FLEMING R, NELSON SM. A multicentre evaluation of the new Beckman Coulter anti-müllerian hormone immunoassay (AMH Gen II). *Ann Clin Biochem* 2011;48:370-3.
- WEENEN C, LAVEN JS, VON BERGH AR, CRANFIELD M, GROOME NP, VISSER JA, KRAMER P, FAUSER BC, THEMME AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle

recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.

WEINSTEIN M, WORD AJ AND CHANG MC. Age patterns in fecundability. In Gray R, Leridon H and Spira A (eds) *Biomedical and Demographic Determinants of Reproduction*. Clarendon Press, Oxford, pp. 1993;209-220.

WOOD JW. Fecundity and natural fertility in humans. *Oxf Rev Reprod Biol* 1989;11,61–109.

WUNDER DM, BERSINGER NA, YARED M, KRETSCHMER R, BIRKHAUSER MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril* 2008a;89:927-33.

WUNDER DM, GUIBOURDENCHE J, BIRKHÄUSER MH, BERSINGER NA. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2008b;90:2203-22101.

