

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado en Biotecnología “Infertilidad femenina, masculina y técnicas de reproducción asistida”

“MODULACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE LOS RECEPTORES DE FSH Y DE ANDRÓGENOS EN LAS CÉLULAS FOLICULARES EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA OVÁRICA DEBIDA A LA PREPARACIÓN FOLICULAR”

TESIS DOCTORAL

Presentada por

Mercedes Monterde Estrada

Dirigida por

Prof. D. Antonio Pellicer Martínez

Dr. D. Raúl Gómez Gallego

Valencia 2014



Prof. D. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, Presidente del Instituto Valenciano de Infertilidad y Director del Área de Salud de la Mujer en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. **Mercedes Monterde Estrada**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid y Postgraduada en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida por la Universidad de Valencia, ha realizado íntegramente el trabajo de investigación titulado “*MODULACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE LOS RECEPTORES DE FSH Y DE ANDRÓGENOS EN LAS CÉLULAS FOLICULARES EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA OVÁRICA DEBIDA A LA PREPARACIÓN FOLICULAR*” bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal para optar al grado de doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, expido y firmo la presente certificación en Valencia a 8 de Septiembre de 2014.

Fdo. Prof. D. Antonio Pellicer Martínez



Dr. D. Raúl Gómez Gallego, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, Miembro del Instituto Universitario IVI e investigador del programa Miguel Servet en el Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

CERTIFICA:

Que Dña. **Mercedes Monterde Estrada**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid y Postgraduada en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida por la Universidad de Valencia, ha realizado íntegramente el trabajo de investigación titulado “*MODULACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE LOS RECEPTORES DE FSH Y DE ANDRÓGENOS EN LAS CÉLULAS FOLICULARES EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA OVÁRICA DEBIDA A LA PREPARACIÓN FOLICULAR*” bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal para optar al grado de doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, expido y firmo la presente certificación en Valencia a 8 de Septiembre de 2014.

Fdo. Dr. D. Raúl Gómez Gallego

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Laboratorio FIV del Servicio de Ginecología y Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario i Politènic La Fe de Valencia y en los laboratorios del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

A mis padres, por todo su apoyo y amor

A Raúl, por hacerme feliz a su vera

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de dedicar unas líneas de agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante esta época de mi vida. Debo reconocer lo difícil que resulta a veces expresar la gratitud que se siente hacia todos aquellos que me habéis ofrecido vuestra ayuda y apoyo. Disculparme de antemano por si hubiera alguien que al buscarse, no se encuentre entre las siguientes líneas. Por ello, a todas y cada una de las personas que habéis sido partícipes directa e indirectamente en el transcurso del desarrollo de este trabajo, os estoy sumamente agradecida.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi Director de Tesis, el Profesor D. Antonio Pellicer Martínez, la confianza depositada en mí. Muchas gracias por darme la oportunidad de trabajar junto a usted e iniciarme en la investigación. Mi más absoluta y sincera admiración tanto por su calidad humana como por su labor científica. Ha sido muy gratificante aprender con usted, transmitiendo continuamente su interés por la investigación aplicada al ámbito clínico, y proporcionando toda su ayuda y colaboración.

A mi Co-director de Tesis, el Dr. Raúl Gómez Gallego. Muchas gracias por codirigir el presente trabajo y orientarme aportando tu perspectiva científica, que tan positiva ha sido para mí.

Quisiera dar las gracias a todo el personal clínico del Servicio de Ginecología y de Reproducción Humana del Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia.

Gracias a todo el equipo médico del Grupo Acreditado de Investigación en Medicina Reproductiva, de quien he podido aprender.

Agradecer muy especialmente al equipo de embriólogos del Laboratorio FIV. Muchísimas gracias a todos por toda vuestra atención y respeto ante mi cantinela constante de “me lo llevo”. Agradeceros vuestra colaboración y ayuda, así como el interés demostrado hacia mí. Muchas gracias a todos, porque en ocasiones, me habéis cuidado. A Pedro, muchas gracias por ofrecerte a ayudarme, por tus consejos y ánimos, y por considerarme una más del equipo. Es admirable tu bondad y tu entera disponibilidad. A Juanvi y a Cris, muchas gracias por vuestras enseñanzas y por vuestra atención conmigo. A Marina, Patri e Irene, gracias por vuestra colaboración siempre que os la he pedido. A Inma, no pierdas ese carácter docente. A Nacho, no pierdas ese carácter andaluz.

A todo el equipo de enfermeras, auxiliares y técnicos de Laboratorio. Quisiera dar las gracias personalmente a Carmen, Rosa Ángela y Tere; así como a Elisa y a Estrella, por vuestra total colaboración cuando había alguna paciente del estudio. Sois un ejemplo de profesionalidad y superación constante. A Mercedes, gracias por la positividad que transmites y por cuidarme.

A M^a José, por la tranquilidad que reflejas, se agradece compartir un momento contigo.

A Inmaculada y Bienvenido, por vuestra atención y amabilidad hacia conmigo.

A César y a Alicia. Me alegra haber participado en el ensayo clínico que habéis dirigido y haber podido aprender de vosotros. No perdáis ese interés científico que tenéis.

A Sonia. Muchas gracias por dejarme aprender de tí, y por todo lo que me has enseñado. Te agradezco los momentos en los que me has escuchado, y por aconsejarme.

Gracias al Dr. Carlos Simón, y a todo el equipo de FIVI, de quien también he aprendido. Quisiera especialmente dar las gracias a los “seniors” Paco, Irene, Felip y Patri, que nos enseñáis a introducirnos en la investigación. A Sebas, Amparo y Alicia, por vuestra ayuda siempre que os la he pedido. A los “juniors” Ana, Claudia, Isa, Juanma, Aymara, Tamara y Leslie. Ha sido un placer haber aprendido con vosotros y haber compartido con vosotros estos años de aprendizaje científico.

A Carmen Rubio Lluesa, por tu bondad y porque siempre me has tendido la mano.

A Carmen Algueró, por las horas compartidas delante del citómetro. Muchas gracias por tu dedicación. A Laura y Angie, que tomaron tu relevo, gracias por vuestra atención y explicaciones teórica.

Quisiera dar las gracias a las compañeras del laboratorio que he tenido durante estos años, a pesar de que algunas ya no estéis. A Estrella, por tu complicidad. A Arancha, por tu inocencia. A Bea, compañera, enhorabuena por alcanzar tu sueño. A Lucy Lu, gracias por aconsejarnos no sólo de ciencia sino también de la vida. A Carmen, siempre moderna y aportando un toque “chic” al laboratorio, eres un ejemplo de superación y de constancia. A Anna, por tu bondad y tu compañerismo. Ejemplo de sabiduría e inteligencia, que nos transmites tranquilidad. Todo mi ánimo y apoyo en tu inicio en la investigación. A Jessica, por tu amistad, tu disposición a ayudar e interés en aprender. Gracias por la chispa de alegría que siempre tienes. Titi, no dejes de sonreír, y confía más en ti; eres muy buena. A

Horten, no sólo compañera sino amiga. No se me ocurre mejor persona que tú para haber compartido esta última etapa. Gracias de todo corazón por todo lo que me has enseñado, ayudado, escuchado y aconsejado durante estos años. Por ser tan trabajadora, constante y estar siempre dispuesta a ayudarnos. Ojalá pronto alcances aquello por lo que estás luchando, y que lo podamos compartir juntas.

A Tomás; por tu atención con todas nosotras y buscarnos siempre la mejor solución.

A todas y cada una de las pacientes que participaron en el ensayo clínico Follprim. Sin su participación y su colaboración, este trabajo no se hubiera podido realizar. Sé que algunas alcanzaron su sueño de la maternidad; y deseo que el resto, así lo haga. De igual modo, reconocer la participación de aquellas mujeres que deciden participar en los diferentes proyectos y ensayos clínicos del Servicio de Ginecología y Reproducción Humana, pues sin ellas, sería menor la investigación científica realizada.

También dar las gracias especialmente a M^a Luisa y Ana, con las que he disfrutado, más de la mitad de nuestra vida juntas, de su amistad. Ójala sigamos compartiendo buenos e importantes momentos por muchos años más. Porque sois un apoyo muy importante para mí, y siempre habéis estado a mi lado, sin importar cuanta distancia nos separase. A Juanma, porque también siempre has estado ahí, ofreciéndome tu amistad. A Miguel, amigo fiel y leal. Contigo aprendí el verdadero significado de la palabra convivir. Y nenico, quisiera decirte que fuiste el mejor compañero que pude tener. A Ainhoa, compañera, quién nos iba a decir que después de conocernos mientras estudiábamos en Madrid, nos encontraríamos años después en Valencia. Me alegra haber compartido esta etapa contigo, que tú también has experimentado. Que tu entusiasmo e interés científico no decaiga. A Empar, Vero, Rosa y Vanesa; que em vareu oferir la vostra amiatat desde un principi. Xiques, moltíssimes gràcies per vostra amiatat i recolçament.

A mis abuelos. A mi yayo Pepe, por lo que hubiera disfrutado al tener este libro entre tus manos. A mi yayo Arturo, porque creo que estaría muy orgulloso de mí. A mis yayas Teresa y Esther, por el tiempo que no he podido estar con ellas durante esta última etapa.

A los pilares fundamentales de mi vida, mis padres, Arturo y Ana. A vosotros os debo lo que soy. Sois para mí un ejemplo de constancia, esfuerzo, sacrificio, dedicación y trabajo, que siempre me habéis dado todo lo que he necesitado. Muchas gracias por aceptar

y respetar mis decisiones, por escucharme, apoyarme y guiarme, por todo vuestro amor. Papá, Mamá, gracias por cuidarme día a día a pesar de la distancia. Os quiero con todo mi corazón.

A Raúl. Vida, a veces pienso que tuve que volver de donde me fui tan sólo para encontrarte. Darte las gracias por cuidarme, por todo tu apoyo y ánimo recibido, por tu comprensión y por quererme. Tú que consigues arrancarme una sonrisa, a tu lado soy feliz. Me emociona pensar que ójala muy pronto podamos comenzar una nueva etapa juntos. Porque a tu vera quiero seguir diciéndote *quiero que sepas que sí*.

I. INTRODUCCIÓN.....	- 23 -
1.1.- REGULACIÓN NEUROHORMONAL DE LA FUNCIÓN OVÁRICA	- 23 -
1.2.- LOCALIZACIÓN TISULAR Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE LAS GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS Y DE LOS ANDRÓGENOS	- 25 -
1.2.1.- Regulación de la expresión génica del receptor de la gonadotropina hipofisaria FSH	- 25 -
1.2.2.- Regulación de la expresión génica del receptor de la gonadotropinahipofisaria LH	- 27 -
1.2.3.- Regulación de la expresión génica del receptor de los andrógenos	- 28 -
1.3.- IMPLICACIÓN DE LAS GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS, DE LOS ANDRÓGENOS Y DE SUS RESPECTIVOS RECEPTORES EN LA FUNCIÓN OVÁRICA	- 30 -
1.3.1.- Participación de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH durante el proceso de la foliculogénesis.....	- 30 -
1.3.2.- Participación de FSHR y LHR/LHCGR en el proceso de la esteroidogénesis ovárica.....	- 32 -
1.3.3.- Participación del receptor de andrógenos en la función ovárica	- 35 -
1.4.- PRESENTACIÓN HISTÓRICA DE LA BAJA RESPUESTA OVÁRICA	- 36 -
1.4.1.- Definición de paciente baja respondedora	- 36 -
1.4.2.- Prevalencia de la baja respuesta ovárica	- 39 -
1.4.3.- Etiología de la respuesta ovárica inadecuada.....	- 39 -
1.4.3.1.- Reserva ovárica disminuida	- 39 -
1.4.3.2.- Alteraciones en la angiogénesis folicular y ovárica.....	- 41 -
1.4.3.3.- Disminución de factores intraováricos moduladores de la acción de la FSH.....	- 41 -
1.4.3.4.- Presencia de inhibidores selectivos que interfieren en la acción ovárica de la FSH.....	- 42 -
1.4.3.5.- Presencia de anticuerpos que afectan a la función ovárica	- 42 -
1.4.3.6.- Descenso de la cantidad de FSHR	- 43 -
1.4.3.7.- Actividad aromatasa potencialmente reducida	- 43 -
1.4.4.- Pronóstico de la baja respuesta ovárica	- 43 -
1.4.4.1.- Edad reproductiva avanzada.....	- 44 -

1.4.4.2.- <i>Parámetros clínicos predictores de una respuesta ovárica potencialmente disminuida</i>	- 44 -
1.4.4.3.- <i>Determinaciones séricas hormonales de FSH, E₂ e inhibina B en condiciones basales</i>	- 47 -
1.4.4.4.- <i>Niveles séricos inadecuados de P₄ y AMH</i>	- 47 -
1.4.4.5.- <i>Reducidas concentraciones intrafoliculares de los factores intraováricos IGF-1, GnSAF y VEGF</i>	- 48 -
1.4.4.6.- <i>Historia previa de cancelación de ciclo</i>	- 49 -
1.5.- PAUTAS TERAPÉUTICAS ENSAYADAS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA OVÁRICA	- 49 -
1.5.1.- <i>Modificación de la pauta de las gonadotropinas administradas</i>	- 50 -
1.5.1.1.- <i>Administración de elevadas dosis de gonadotropinas</i>	- 50 -
1.5.1.2.- <i>Empleo de gonadotropinas recombinantes en lugar de urinarias</i>	- 50 -
1.5.1.3.- <i>Administración de gonadotropinas durante la fase lútea previa</i>	- 51 -
1.5.1.4.- <i>Suplementación de LHr durante la estimulación ovárica controlada</i> ..	- 51 -
1.5.2.- <i>Uso del ciclo natural y seminatural</i>	- 52 -
1.5.3.- <i>Modificación en las pautas de los análogos de la GnRH</i>	- 52 -
1.5.3.1.- <i>Protocolo con agonistas de la GnRH</i>	- 52 -
1.5.3.2.- <i>Protocolo con antagonistas de la GnRH</i>	- 54 -
1.5.4.- <i>Tratamientos adyuvantes</i>	- 56 -
1.5.4.1.- <i>Co-administración de citrato de clomifeno</i>	- 56 -
1.5.4.2.- <i>Suplementación de la hormona del crecimiento</i>	- 57 -
1.5.4.3.- <i>Administración adyuvante de L-arginina</i>	- 57 -
1.5.4.4.- <i>Suplementación de ácido acetilsalicílico</i>	- 58 -
1.5.5.- <i>Androgenización del entorno folicular</i>	- 58 -
1.5.5.1.- <i>Inhibidores de la enzima aromataasa</i>	- 59 -
1.5.5.2.- <i>Administración de esteroides adrenocorticales</i>	- 61 -
1.5.5.3.- <i>Administración de testosterona transdérmica</i>	- 63 -
1.5.6.- <i>Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada para la mejora de la sincronización folicular</i>	- 65 -
1.5.6.1.- <i>Suplementación de estrógenos durante la fase lútea previa</i>	- 65 -

1.5.6.2- Administración de ACOs durante la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada	- 67 -
1.6.- IMPLICACIÓN DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES DE LAS GONADOTROPINAS Y DE LOS ANDRÓGENOS EN LA RESPUESTA OVÁRICA DE LAS PACIENTES BAJAS RESPONDEDORAS .	- 69 -
1.6.1.- Participación de FSHR y LHR/LHCGR en la baja respuesta ovárica	- 69 -
1.6.2.- Participación de AR en la modulación de la cantidad de FSHR y LHR/LHCGR	- 71 -
1.7.- PARTICIPACIÓN DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS EN LA RESPUESTA OVÁRICA DE LAS PACIENTES BAJAS RESPONDEDORAS	- 72 -
1.8.- JUSTIFICACIÓN DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO.....	- 73 -
II. HIPÓTESIS.....	- 79 -
III. OBJETIVOS.....	- 83 -
3.1.- OBJETIVO GENERAL	- 83 -
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 83 -
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 87 -
4.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL	- 87 -
4.2.- DESCRIPCIÓN PORMENORIZADA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	- 88 -
4.2.1.- Población de estudio y selección de pacientes.....	- 88 -
4.2.2.- Selección e inclusión de pacientes en la primera fase.....	- 88 -
4.2.3.- Inclusión de pacientes en la segunda fase	- 89 -
4.2.4- Cálculo del tamaño muestral.....	- 90 -
4.3.- PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA PAUTADO EN LAS DOS FASES DE ESTUDIO	- 91 -
4.4.- ESTRATEGIAS DE PREPARACIÓN FOLICULAR ENSAYADAS DURANTE LA FASE LÚTEA PREVIA AL CICLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA	- 92 -
4.4.1.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante la administración de testosterona transdérmica	- 93 -

4.4.2.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante la administración de 17β -E ₂ micronizado transdérmico	- 94 -
4.4.3.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante la administración de ACOs conjugados con valerato de E ₂ ..	- 95 -
4.5.- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO ATENDIENDO A CRITERIOS CLÍNICOS Y BIOLÓGICOS	- 97 -
4.5.1- Criterios clínicos para la evaluación de la respuesta ovárica	- 97 -
4.5.1.1.- <i>Determinaciones séricas analíticas</i>	- 98 -
4.5.1.2.- <i>Evaluación del grado madurativo ovocitario, de la fecundación y de la calidad embrionaria</i>	- 98 -
4.5.1.3.- <i>Resultado clínico del ciclo de estimulación ovárica controlada</i>	- 99 -
4.5.2.- Criterios biológicos para el estudio de la respuesta ovárica	- 99 -
4.6.- METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS DETERMINADOS EN LA TESIS DOCTORAL	- 100 -
4.6.1.- Obtención del líquido folicular procedente del aspirado folicular	- 100 -
4.6.2.- Preaislamiento de las células de la granulosa luteinizadas putativas presentes en el líquido folicular	- 101 -
4.6.3.- Cuantificación de las células potenciales de la granulosa luteinizadas mediante la detección de FSHR y AR con la técnica de citometría de flujo	- 102 -
4.6.4.- Obtención de las células del cumulus de los COC recuperados	- 113 -
4.6.5.- Análisis cuantitativo de la expresión relativa de los genes FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	- 115 -
4.6.5.1.- <i>Aislamiento de ARN de las células del cumulus</i>	- 115 -
4.6.5.2.- <i>Análisis de la cantidad y calidad del ARN extraído</i>	- 116 -
4.6.5.3.- <i>Transcripción reversa en ADN complementario</i>	- 117 -
4.6.5.4.- <i>Cuantificación fluorescente a tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa</i>	- 118 -
4.6.6- Determinaciones analíticas de FSH, LH, A ₄ , P ₄ , T, y E ₂ en líquido folicular	- 123 -
4.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROCESAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS	- 126 -

4.7.1.- Estadística descriptiva de las variables de estudio	- 127 -
4.7.2.- Estadística analítica de las variables analizadas	- 127 -
V. RESULTADOS	- 131 -
5.1.- FASE I: EVALUACIÓN CLÍNICA Y BIOLÓGICA DEL RENDIMIENTO OVÁRICO EN PACIENTES CON SOSPECHA DE RESPUESTA OVÁRICA INADECUADA	- 131 -
5.1.1.- Identificación de las pacientes con baja respuesta ovárica confirmada	- 131 -
5.1.2.- Evaluación clínica de la estimulación ovárica controlada y de resultado del ciclo en las pacientes bajas y normo-respondedoras durante la fase I	- 132 -
5.1.3.- Determinación del porcentaje de células de la granulosa luteinizadas potenciales que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de expresión de dichos receptores en las pacientes bajas y normo-respondedoras	- 135 -
5.1.4.- Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus de las pacientes bajas y normo-respondedoras	- 137 -
5.1.5.- Determinación de los niveles hormonales de FSH, LH, A ₄ , P ₄ , T y E ₂ en líquido folicular en las pacientes bajas y normo-respondedoras	- 140 -
5.2.- FASE II: ANÁLISIS COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO OVÁRICO EN TÉRMINOS CLÍNICOS Y BIOLÓGICOS, DE LAS PACIENTES VERDADERAS BAJAS RESPONDEDORAS SOMETIDAS A PREPARACIÓN FOLICULAR RESPECTO A SU RESPUESTA OVÁRICA DURANTE EL CICLO DE ESTIMULACIÓN PREVIO SIN PREPARACIÓN FOLICULAR (FASE I).....	- 141 -
5.2.1.- Evaluación de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular con andrógenos	- 141 -
5.2.1.1- <i>Parámetros clínicos de la estimulación ovárica controlada y de resultado de ciclo.....</i>	- 142 -
5.2.1.2- <i>Parámetros biológicos de la estimulación ovárica controlada.....</i>	- 145 -
5.2.1.2.1- <i>Determinación del porcentaje de células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de estos receptores.....</i>	- 145 -
5.2.1.2.2.- <i>Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus</i>	- 148 -

5.2.1.2.3.- <i>Determinación de las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular</i>	- 151 -
5.2.2.- <i>Evaluación de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular con estrógenos</i>	- 152 -
5.2.2.1.- <i>Parámetros clínicos de la estimulación ovárica controlada y de resultado de ciclo</i>	- 153 -
5.2.2.2.- <i>Parámetros biológicos de la estimulación ovárica controlada</i>	- 156 -
5.2.2.2.1.- <i>Determinación del porcentaje de células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de estos receptores</i>	- 156 -
5.2.2.2.2.- <i>Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus</i>	- 159 -
5.2.2.2.3.- <i>Determinación de las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular</i>	- 161 -
5.2.3.- <i>Evaluación de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular con gestágenos combinados con estrógenos</i>	- 163 -
5.2.3.1.- <i>Parámetros clínicos de la estimulación ovárica controlada y de resultado de ciclo</i>	- 164 -
5.2.3.2.- <i>Parámetros biológicos de la estimulación ovárica controlada</i>	- 167 -
5.2.3.2.1.- <i>Determinación del porcentaje de células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de estos receptores</i>	- 167 -
5.2.3.2.2.- <i>Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus</i>	- 170 -
5.2.3.2.3.- <i>Determinación de las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular</i>	- 172 -
VI. DISCUSIÓN	- 179 -
VII. CONCLUSIONES	- 199 -
VIII. BIBLIOGRAFÍA	- 203 -
IX. ANEXOS	- 237 -

ANEXO 1 - 237 -
ANEXO 2 - 241 -

- A₄**: Androstenediona (del inglés *4-Androstenedione*)
- aa**: Aminoácido
- Ac**: Anticuerpo
- AcHE**: acetilcolinesterasa (del inglés *Acetylcholinesterase*)
- ACO**: Anticonceptivo oral combinado
- ADN**: Ácido desoxirribonucleico
- ADNc**: Ácido desoxirribonucleico complementario
- Ala**: Alanina
- AMH**: Hormona antimülleriana (del inglés *Anti Müllerian hormone*)
- AMPc**: Adenosín monofosfato cíclico
- AR**: Receptor de andrógenos (del inglés *Androgen receptor*)
- AR**: Gen que codifica el receptor de andrógenos
- AR⁺/CD45⁺/IP⁺**: Células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan el receptor de andrógenos
- ARKO**: Modelo animal deficiente en el receptor de andrógenos (del inglés *Androgen-receptor knockout model*)
- ARN**: Ácido ribonucleico
- ARNasa**: Ribonucleasa
- ARNm**: Ácido ribonucleico mensajero
- ASA**: Ácido acetil salicílico (del inglés *Acetylsalicylic acid*)
- Asn**: Asparagina
- BSA**: Albúmina sérica bovina (del inglés *Bovine serum albumin*)
- CC**: Citrato de clomifeno (del inglés *Clomiphene citrate*)
- CCCT**: Prueba de estimulación con citrato de clomifeno (del inglés *Clomiphene citrate challenge test*)
- COC**: Complejo cumulu-corona-ovocito (del inglés *cumulus oophorus cells*)
- Ct**: Ciclo umbral (del inglés *Threshold cycle*)
- CYP11A1**: Proteína de clivaje de la cadena lateral de colesterol (del inglés *Cholesterol side-chain cleavage enzyme*)
- CYP11A1**: Gen que codifica a la proteína de clivaje de la cadena lateral de colesterol

LISTA DE ABREVIATURAS

- CYP19A1:** Enzima aromatasa (del inglés *Aromatase*)
- CYP19A1:** Gen que codifica la aromatasa
- DEPC:** Dietilpírocarbonato (del inglés *Diethylpyrocarbonate*)
- DHEA:** Dehidroepiandrosterona (del inglés *Dehydroepiandrosterone*)
- DHEA-S:** Sulfato de Dehidroepiandrosterona (del inglés *Dehydroepiandrosterone-sulfate*)
- DNasa:** Desoxirribonucleasa
- E₂ (17β-E₂):** Estradiol
- E₃:** Estrona
- EDTA:** Ácido etileno-diamino-tetra-acético (del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EFORT:** Test funcional de la reserva ovárica mediante estimulación con FSH (del inglés *Exogenous FSH ovarian reserve test*)
- EIA:** Técnica de inmunoensayo enzimático (del inglés *Enzyme immunoassay*)
- ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- EOC:** Estimulación ovárica controlada
- FIV:** Fecundación *in vitro*
- FL:** Canal de fluorescencia (del inglés *Flow cytometry channel*)
- FSC:** Detector de luz dispersada hacia delante (del inglés *Forward scatter*)
- FSH:** Hormona estimulante de folículos (del inglés *Follicle stimulating hormone*)
- FSHr:** Hormona folículo estimulante recombinante (del inglés *Recombinant follicle stimulating hormone*)
- FSHR:** Receptor de la hormona estimulante de folículos (del inglés *Follicle stimulating hormone receptor*)
- FSHR:** Gen que codifica el receptor de la hormona estimulante de folículos
- FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺:** Células de la granulosa luteinizadas que expresan el receptor de FSH
- FSHu:** Hormona folículo estimulante urinaria (del inglés *Urinary follicle stimulating hormone*)
- GAST:** Prueba de estimulación con agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (del inglés *GnRH agonist stimulation test*)
- GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas (del inglés *Gonadotropin-releasing hormone*)

- GnSAF:** Factor atenuante del aumento de gonadotropinas (del inglés *Gonadotrophin surge-attenuating factor*)
- hCG:** Hormona coriónica humana (del inglés *Human chorionic gonadotropin*)
- HDL:** Lipoproteína de alta densidad (del inglés *High density lipoprotein cholesterol*)
- HG:** Hormona del crecimiento (del inglés *Growth hormone*)
- hMG:** Gonadotropina menopáusica humana (del inglés *Human menopausal gonadotropin*)
- HRP:** Peroxidasa de rábano picante (del inglés *Horseradish peroxidase*)
- 3 β -HSD:** Enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa (del inglés *3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase*)
- 17 β -HSD:** Enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (del inglés *17 β -hydroxysteroid dehydrogenase*)
- ICSI:** Inyección intracitoplasmática de un único espermatozoide (del inglés *Intracitoplasmatic sperm injection*)
- IGF-1:** Factor de crecimiento insulinoide de tipo I (del inglés *Insuline like growth factor type I*)
- IMC:** Índice de masa corporal
- InsP₃:** Inositol 1,4,5-trifosfato
- IP:** Ioduro de propidio
- IUI:** Inseminación intrauterina
- kb:** kilobase
- LDL:** Lipoproteína de baja densidad (del inglés *Low density lipoprotein cholesterol*)
- LH:** Hormona luteinizante (del inglés *Luteinizing hormone*)
- LHR/LHCGR:** Receptor de la hormona luteinizante (del inglés *Luteinizing hormone receptor*)
- LHR/LHCGR:** Gen que codifica el receptor de la hormona luteinizante
- MI:** Metafase de la primera división meiótica
- MII:** Metafase de la segunda división meiótica
- M-MLV:** Virus de la leucemia murina de Moloney (del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*)
- P₄:** Progesterona (del inglés *Progesterone*)
- PBS:** Tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate buffered saline*)

LISTA DE ABREVIATURAS

PBS-BSA: Albúmina sérica bovina disuelta en tampón fosfato salino

PC: Ficoeritrina-cianina (del inglés *Phycoerythrin-cyanine*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase chain reaction*)

p/v: Peso/volumen

QF-RT- PCR: Cuantificación fluorescente a tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Quantitative fluorescence real time polymerase chain reaction*)

RFA: Recuento de folículos antrales

RT: Retrotranscripción reversa (del inglés *Reverse transcription*)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa (del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

Ser: Serina

SHBG: Globulina transportadora de hormonas sexuales (del inglés *Sex hormone-binding globulin*)

SOP: Síndrome de ovarios poliquísticos

SSC: Detector de luz dispersada lateralmente (del inglés, *Side scatter*)

StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (del inglés *Steroidogenic acute regulatory protein*)

T: Testosterona (del inglés *Testosterone*)

Thr: Threonina

T libre: Testosterona libre

TRA: Técnicas de reproducción asistida

UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

UI: Unidades internacionales

UR: Unidades relativas

VG: Vesícula germinal

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés *Vascular endothelial growth factor*)

v/v: Volumen/volumen

RESUMEN

Las mujeres infértiles susceptibles de presentar una inadecuada respuesta ovárica a los protocolos de estimulación ovárica controlada representan uno de los principales desafíos en la práctica clínica diaria. Fundamentalmente se debe a la compleja identificación *a priori* de estas pacientes, en base a unos parámetros clínicos íntimamente relacionados con la reserva ovárica disminuida. Asimismo, a pesar de existir numerosas pautas terapéuticas consideradas en el manejo clínico de la paciente con baja respuesta ovárica, no se ha consensado aquella de mayor efectividad sobre el rendimiento ovárico.

Las terapias adyuvantes a los protocolos de estimulación ovárica controlada persiguen mejorar la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras, promoviendo la sincronización folicular durante el reclutamiento de los folículos en proliferación. Bajo este postulado, han ofrecido resultados clínicos esperanzadores, terapias basadas en la androgenización del entorno folicular y/o la manipulación del ambiente intraovárico durante la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada. Se hipotetiza que amen de favorecer el reclutamiento folicular, la eficacia de estas terapias radica en su capacidad para amplificar la sensibilidad de las células de la granulosa de los folículos maduros a la FSH.

En la actualidad se desconoce con exactitud cual de las terapias adyuvantes empleadas en la práctica clínica, redundan en una notable mejora de la respuesta ovárica y si éstas se asocian realmente con un incremento de la sensibilidad folicular. Con esta premisa se planteó el presente trabajo de tesis doctoral, en el que se compararon la eficacia de tres estrategias adyuvantes de preparación folicular sobre la mejora del rendimiento ovárico. En concreto, se ensayó la temprana administración de testosterona transdérmica, de 17β -E₂ micronizado transdérmico y de ACOs conjugados con valerato de E₂.

Como parámetros biológicos asociados al hipotético incremento que pudiera acontecer en la sensibilidad a la FSH, se evaluó la cantidad de receptores existentes en las células de la granulosa, el perfil de la expresión relativa en las células del cumulus de los genes codificantes de los principales receptores y enzimas implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica; así como los niveles hormonales en líquido folicular.

La suplementación temprana con ACOs conjugados con valerato de E₂, a pesar de mejorar moderadamente la cantidad y calidad ovocitaria recuperada, no fue significativamente eficaz sobre la mejora del rendimiento ovárico.

Por el contrario, la preparación folicular mediante la administración temprana de andrógenos, ofreció unas adecuadas tasas clínicas e incrementó significativamente la expresión relativa del receptor de andrógenos en las células del cumulus. En tanto que con la suplementación lútea de estrógenos, se alcanzó un desarrollo folicular y ovocitario estadísticamente superior.

La mejora del rendimiento ovárico obtenido con dichas estrategias de preparación folicular, sin embargo no se correspondió con un incremento de ninguno de los parámetros biológicos asociados al posible aumento de la sensibilidad folicular a la FSH a estudio.

Los datos obtenidos sugieren que la baja respuesta ovárica podría no ser debida a una disminución de los receptores celulares y enzimas implicados en la función ovárica, sino a una desregulación funcional y/o alterada sensibilidad de los mismos.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1.- Regulación neurohormonal de la función ovárica

El eje hipotálamo hipofisario gonadal constituye la entidad funcional que regula la acción ovárica implicada en los procesos neuroendocrinológicos de la mujer, tales como la diferenciación folicular, maduración ovocitaria, ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Buffet and Bouchard, 2001).

El principal mensajero hipotalámico responsable de la función gonadal, es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH es un decapeptido sintetizado por las neuronas secretoras ubicadas en la placoda olfatoria. Los cuerpos celulares de dichas neuronas se localizan fundamentalmente en el interior del núcleo arcuato del hipotálamo mediobasal y en el área preóptica del hipotálamo anterior (Yen et al., 2001).

La GnRH secretada por el hipotálamo es transportada a través de los axones ubicados en el tracto tuberoinfundibular hacia la eminencia mediana, donde es liberada en la circulación del sistema portal, alcanzando el lóbulo anterior de la pituitaria o adenohipófisis (Longo et al., 2011) (*Figura 1*). Este sistema portal hipofisario favorece la comunicación química desde el hipotálamo a la adenohipófisis mediante el transporte de las hormonas liberadoras y de inhibición hipotalámicas al lóbulo anterior hipofisario (Eckert, 2002).

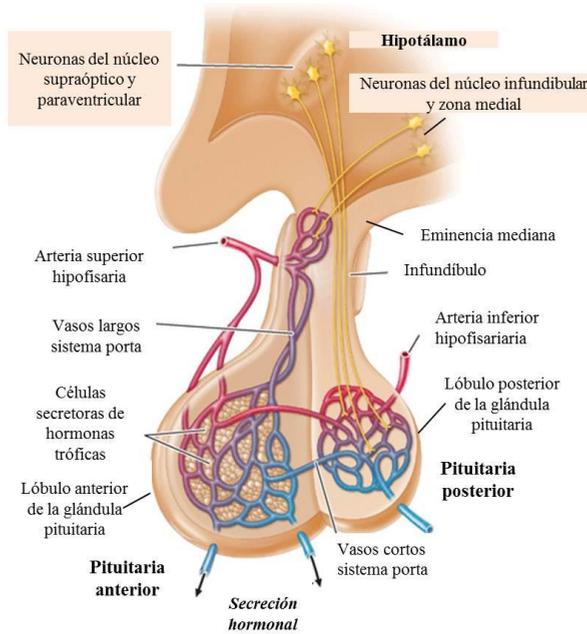


Figura 1.- Sistema porta hipotálamico hipofisario a través del cual se secretan los factores liberadores hipotalámicos que participan en la liberación hormonal. Adaptado de (Longo et al., 2011).

El mensajero hipotalámico GnRH es liberado de manera pulsátil. Se ha descrito que la frecuencia de pulsatilidad en la secreción de la GnRH regula el número de sus receptores específicos, que se localizan en la membrana basal de las células endocrinas denominadas gonadotropos (Eckert, 2002). Dichas células secretoras glandulares son las responsables de desencadenar la liberación pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias, denominadas hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

Las hormonas hipofisarias glicoproteicas FSH y LH ejercen su acción biológica a través del eje hipotálamo hipofisario gonadal para la regulación de la función ovárica, responsable de la maduración folicular y ovocitaria; así como de la producción de hormonas esteroideas sexuales en las mujeres (Gharib et al., 1990). Por ello, es precisa una correcta regulación en la pulsatilidad de la liberación de la GnRH, que permita una

adecuada secreción de las gonadotropinas hipofisarias en los principales procesos fisiológicos implicados en la función gonadal (**Figura 2**).

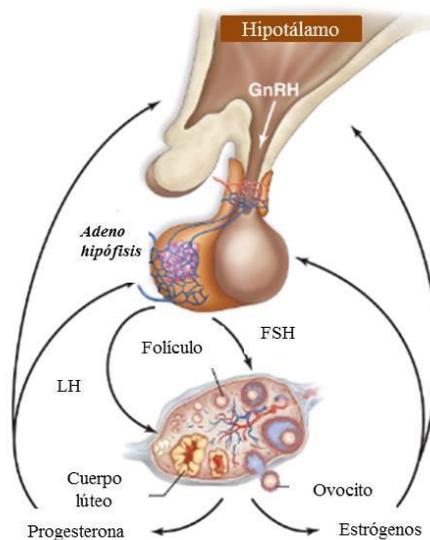


Figura 2.- Eje hipotálamo hipofisario gonadal por el que se regula la síntesis hormonal ovárica a través de la secreción del factor liberador GnRH y liberación pulsátil de las hormonas hipofisarias FSH y LH que ejercen su acción a nivel ovárico. Adaptado de (Eckert, 2002)

1.2.- Localización tisular y regulación de la expresión génica de los receptores de las gonadotropinas hipofisarias y de los andrógenos

1.2.1.- Regulación de la expresión génica del receptor de la gonadotropina hipofisaria FSH

Se ha referido la presencia del receptor específico para la gonadotropina hipofisaria FSH (FSHR) cuasi-específica en los tejidos y órganos gonadales y reproductivos. Concretamente se ha descrito la existencia de FSHR en las trompas de Falopio (Zheng et

al., 1996), en el endometrio (La Marca et al., 2005) y en la próstata (Mariani et al., 2006); siendo mayoritaria la expresión de FSHR en las células de Sertoli de los túbulos seminíferos en los hombres, y en las células de la granulosa circundantes a los ovocitos en las mujeres (Griswold et al., 1995; Oktay et al., 1997; George et al., 2011). Asimismo-la expresión de FSHR también se ha descrito en osteoclastos (Sun et al., 2006) y en el epitelio vascular circulante a tumores malignizados (Radu et al., 2010).

En humanos, el gen que codifica FSHR se localiza en el brazo corto del cromosoma 2, concretamente en la posición 2p21-p16 (Minegishi et al., 1991; Rousseau-Merck et al., 1993) (**Figura 3**). El gen *FSHR* abarca una región de 192 kilobases (kb), comprendida por 10 exones y 9 intrones (Gromoll et al., 1996; Simoni et al., 1997). Los nueve primeros exones codifican el dominio extracelular, mientras que el exón 10 codifica el dominio intracelular, el dominio transmembrana y el extremo carboxilo-terminal (Gromoll et al., 1996; Simoni et al., 2002).

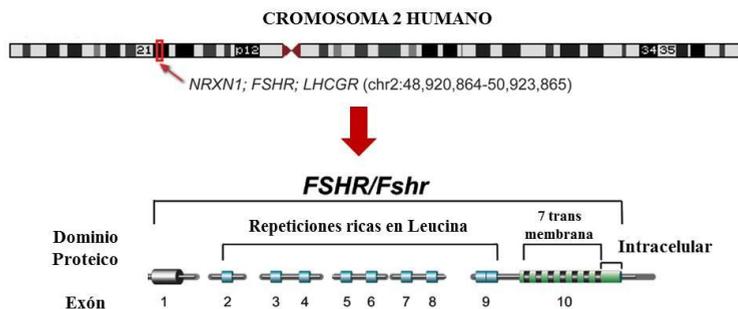


Figura 3.- Localización cromosómica del gen *FSHR* en el brazo corto del cromosoma 2 y representación de los dominios proteicos que constituyen el péptido *FSHR*. Adaptado de (George et al., 2011).

El péptido codificado por el gen *FSHR* pertenece a la superfamilia de receptores transmembrana acoplados a proteína G (Sallese et al., 1991; Simoni et al., 1997; Levallet et al., 1999; Meduri et al., 2008); integrada por los receptores de la GnRH, los receptores β -adrenérgicos, α -adrenérgicos y por los receptores dopaminérgicos.

El péptido FSHR corresponde a una proteína de 696 aminoácidos (aa) de longitud (Minegishi et al., 1991). Está constituido por un complejo proteico transmembrana similar a rhodopsina, organizado en 7 hélices transmembrana hidrofóbicas insertadas en el plasmalemma, flanqueadas por los dominios intra y extracelulares (**Figura 3**). Concretamente, el dominio extracelular hidrófobo contiene una región de 9 secuencias repetitivas con alto contenido de leucina. Dicha región está flanqueada por un extremo carboxilo-terminal y amino-terminal abundantes en cisteína (Casarini et al., 2011), además de presentar 4 sitios potenciales de glucosilación. En tanto que en el dominio intracelular, el extremo carboxilo-terminal está acoplado a la proteína G estimuladora, la cual iniciará la cascada de señalización tras la unión ligando-receptor (Simoni et al., 1997; Dias and Van Roey, 2001).

1.2.2.- Regulación de la expresión génica del receptor de la gonadotropinahipofisaria LH

De igual modo a la localización tisular y celular de FSHR, se ha descrito una ubicación del receptor específico de la gonadotropina hipofisaria LH (LHR/LHCGR) prácticamente exclusiva de órganos y tejidos gonadales. Específicamente se ha informado de la presencia de LHR/LHCGR en las trompas de Falopio (Lei et al., 1993; Gawronska et al., 1999), en el útero (Ziecik et al., 1992); siendo mayoritaria la existencia de LHR/LHCGR en las células de Leydig de los testículos en el hombre (Eblen et al., 2001; Ascoli et al., 2002) y en las células de la teca de los ovarios de las mujeres (Ziecik et al., 2007). Asimismo se ha informado de la expresión de LHR/LHCGR en la placenta y en el feto (Perrier d'Hauterive et al., 2007), además de en el tejido nervioso (Lei et al., 1993) y en la glándula adrenal (Pabon et al., 1996).

El gen que codifica el péptido LHR/LHCGR en humanos, está ubicado en el brazo corto del cromosoma 2, concretamente en la localización 2p21 (Fanelli et al., 2001; Fanelli and Puett, 2002); tiene un tamaño de 69 kb y comprende de 11 exones y 10 intrones (Segaloff et al., 1990) (**Figura 4**). Los diez primeros exones y una porción del undécimo exón codifican el dominio extracelular hidrófobo; mientras que los dominios

transmembrana e intracelular, que está unido a la proteína G, son codificados por la parte restante del último exón (Atger et al., 1995).

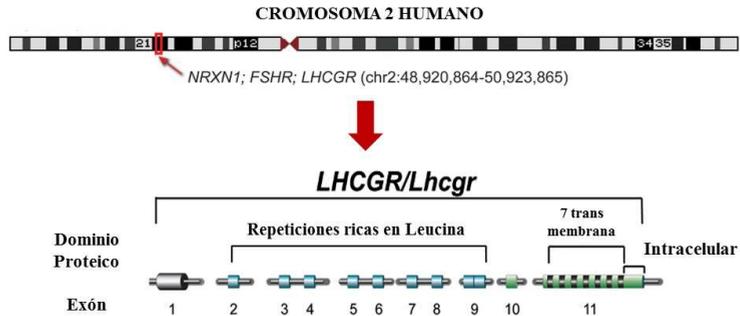


Figura 4.- Localización del gen LHR/LHCGR en el brazo corto del cromosoma 2 y representación de los dominios proteicos que conforman el polipéptido LHR/LHCGR. Adaptado de (George et al., 2011).

El polipéptido LHR/LHCGR pertenece a la subfamilia de los receptores β_2 -adrenérgicos de tipo A, miembro de la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G (Papamentzelopoulou et al., 2012). Concretamente, tiene una longitud de 674 aa, en donde el dominio extracelular hidrófobo abarca cerca de la mitad de los aa y comprende 14 copias de una repetición rica en leucina, así como de 6 sitios potenciales de glucosilación. El polipéptido también dispone de 7 dominios transmembrana flanqueados por una porción carboxilo-terminal del dominio intracelular que está unido a la proteína G (**Figura 4**). Se ha descrito necesaria la unión de LH al extremo N-terminal del ectodominio para una correcta unión selectiva del ligando y activación de las vías de señalización.

1.2.3.- Regulación de la expresión génica del receptor de los andrógenos

Los andrógenos requieren de una adecuada unión a su receptor específico (AR) para ejercer correctamente su función biológica, implicada fundamentalmente en el proceso de la esteroidogénesis ovárica, como se detallará posteriormente.

Se ha descrito la presencia de AR en las células de Sertoli, en las células de Leydig, en las células mioideas peritubulares y en las células periarteriolas del testículo humano (Van Rooijen et al., 1995). En el ovario humano, se ha informado de la existencia de AR en todos los tipos de folículos ováricos y en la totalidad de las células foliculares, aunque es predominante su presencia en los folículos preantrales y antrales, además de en las células de la granulosa (Horie et al., 1992).

El gen *AR* que codifica el péptido AR se localiza en el brazo largo del cromosoma X, concretamente en la posición Xq 11.2-q12; tiene una longitud de 2730 pb y consta de ocho exones (*Figura 5*).

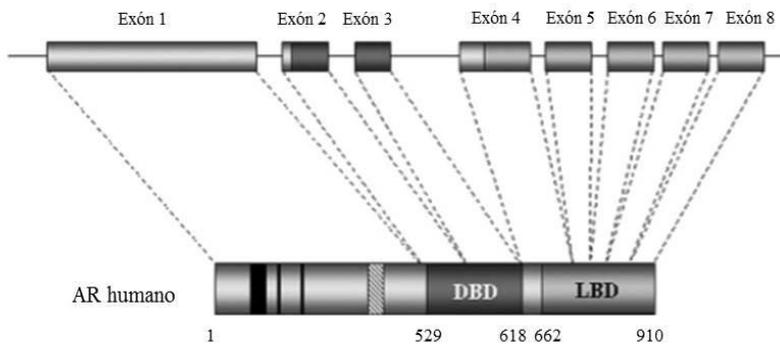


Figura 5.- Localización cromosómica del gen *AR* en el brazo largo del cromosoma X y representación de los dominios que constituyen el péptido *AR*. Adaptado de (McEwan, 2004).

El extremo amino terminal es codificado por la secuencia ubicada en el exón 1, el dominio de unión al ADN se codifica por las secuencias localizadas en los exones 2 y 3; y el extremo carboxilo terminal se distribuye entre los exones del 4 al 8. El gen *AR* codifica un péptido de 910 aa de longitud, que pertenece a la superfamilia de receptores de localización nuclear (Mangelsdorf et al., 1995).

Específicamente, el péptido AR es un complejo proteico constituido por cuatro dominios estructural y funcionalmente diferenciados. El extremo carboxilo terminal está

implicado en la unión y dimerización del receptor, estando constituido por un dominio de unión al ligando además de un dominio de unión al ADN; mientras que el extremo amino terminal ejerce una función de transactivación participando en la regulación transcripcional mediante los dominios de activación (McEwan, 2004).

1.3.- Implicación de las gonadotropinas hipofisarias, de los andrógenos y de sus respectivos receptores en la función ovárica

1.3.1.- Participación de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH durante el proceso de la foliculogénesis

La foliculogénesis engloba un conjunto de procesos de proliferación y de especialización morfológica y funcional de las células foliculares somáticas, que permiten la diferenciación de los folículos primordiales en folículos preovulatorios o de Graaf. Este proceso de proliferación y diferenciación folicular ocurre a la par de la ovogénesis, acontecimiento biológico mediante el cual se alcanza la competencia nuclear y citoplasmática ovocitaria; y de la regulación esteroideogénica ovárica.

La primera fase preantral de la foliculogénesis está modulada a través de una regulación intrafolicular e independiente de la acción de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH. En tanto que la segunda fase antral se rige por una regulación extraovárica gonadotropa dependiente (Gougeon, 1996).

La etapa del reclutamiento cíclico que sucede en la segunda fase gonadotropa dependiente de la foliculogénesis, y su consiguiente etapa de selección folicular, van a estar fundamentalmente reguladas por la FSH y por la retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos. La acción de los estrógenos sobre el hipotálamo y la hipófisis, produce una menor secreción pulsátil de las hormonas hipofisarias, lo que conlleva a una disminución de los niveles de las gonadotropinas FSH y LH. Este descenso de la FSH endógena resulta clave en la regulación de la dinámica folicular, modulada principalmente por lo que se denomina “umbral de la FSH”.

En base a este concepto de umbral de FSH, se considera que todos los folículos con capacidad de alcanzar el estadio preovulatorio requieren de un nivel mínimo de FSH para su reclutamiento final (Brown, 1978), según se expone a continuación.

En un ciclo natural sin estimulación de los ovarios, el reclutamiento folicular se inicia durante la fase lútea tardía del ciclo ovárico. Debido al proceso de luteinización que ocurre en dicha fase, los niveles circulantes de estradiol (E_2) y progesterona (P_4) son mínimos. Este descenso en el nivel del E_2 , conlleva a que en el entorno intrafolicular haya elevadas concentraciones de FSH; permitiendo que continúe el proceso del reclutamiento folicular. Aquel folículo que tenga un menor requerimiento de FSH durante la fase folicular temprana, proporcionará un adecuado microambiente hiperestrogénico que permitirá su selección y posterior dominancia de entre la cohorte folicular.

Esta selección folicular es debida a que en el momento en el que el nivel circulante de FSH alcanza su valor umbral, concretamente durante el incremento premenstrual que acontece, la cohorte de folículos antrales más maduros será rescatada del proceso de atresia folicular.

La población folicular rescatada de la atresia continuará con el desarrollo folicular. Ello conllevará a una proliferación de las células de la granulosa y a un aumento de la biosíntesis de estrógenos; que ejercerán su acción de retroalimentación negativa.

En la fase folicular avanzada, la cantidad de FSH disponible para los folículos menos desarrollados será insuficiente; lo que favorecerá la selección del folículo más vascularizado y con mayor cantidad de FSHR. El folículo dominante que haya sido seleccionado, será capaz de mantener su desarrollo hasta la maduración completa; dependiente de LH, a consecuencia del declive en los niveles de la FSH. El resto de los folículos, que presentan un mayor umbral para la FSH y una respuesta a la LH más limitada ante el significativo descenso de los niveles de la FSH, experimentarán el proceso de atresia folicular (Zelevnik and Hillier, 1984; Hillier et al., 1984).

1.3.2- Participación de FSHR y LHR/LHCGR en el proceso de la esteroidogénesis ovárica

La esteroidogénesis ovárica es el proceso de biosíntesis de las hormonas esteroideas sexuales. La producción ovárica de hormonas esteroideas, tales como P_4 , y E_2 , es el resultado de un conjunto de reacciones enzimáticas que acontecen en las células de la teca interna y de la granulosa de los folículos preovulatorios, y en el cuerpo lúteo. Por ello, las hormonas esteroideas sexuales sintetizadas en la esteroidogénesis ovárica, contribuirán a lo largo del ciclo ovárico de la mujer.

La implicación de los receptores FSHR y LHR/LHCGR en la esteroidogénesis ovárica se explica en el contexto de la teoría de “dos células, dos gonadotropinas”. Se postula que existe una coordinada interacción entre las células de la teca interna y de la granulosa de los folículos, con funciones complementarias, en respuesta a la FSH y LH (Hillier and De Zwart, 1981; Hillier et al., 1994), durante la síntesis de las hormonas esteroideas sexuales (*Figura 6*).

Específicamente, las células de la teca interna constituyen una población celular heterogénea altamente vascularizada, caracterizada por la existencia de LHR/LHCGR y de receptores para el colesterol lipoproteico unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas células de la teca interna además presentan el citocromo P450_{sc}, que cataliza el clivaje de las cadenas laterales del colesterol (Stocco, 2000). También contienen el citocromo P450_{c17}, con actividad 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa (Tresguerres and Castillo, 1999; Magoffin, 2005). Y disponen de la enzima 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ (3 β HSD) y del complejo enzimático 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (Yen et al., 2001) (*Figura 6*).

Este conjunto de citocromos y enzimas catalizan a partir del colesterol libre, la conversión de diferentes intermediarios esteroideos. Concretamente, la pregnenolona, 17OH-pregnenolona, dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol, y la androstenediona (A_4) son convertidos en andrógenos, tales como androstenediol, androstenediona (A_4) y testosterona (T) (*Figura 7*). Sin embargo, las células de la teca interna carecen de FSHR y del citocromo P450aromatasa.

incremento de los niveles del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC); el cual estimula a los citocromos P450_{scc} y P450_{c17}. Estos complejos enzimáticos aumentan la transcripción y traducción de los genes codificantes de dichos citocromos, el gen *CYP11A1* y el gen *CYP17*, respectivamente. La actividad de la enzima desramificante del colesterol, correspondiente al citocromo P450_{scc}; y la actividad 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa del citocromo P450_{c17}, favorecen la síntesis de A₄ en el compartimento tecal. Desde las células de la teca, estos andrógenos son transportados hacia las células de la granulosa. Simultáneamente, la gonadotropina LH actúa sobre las células de la granulosa, luteinizándolas y promoviendo con ello la secreción de P₄ (**Figura 6**).

La gonadotropina FSH tiene una acción dual debido a su unión a los FSHR existentes en las células de la granulosa e inducción de la expresión de LHR/LHCGR en éstas. La unión de FSH a su receptor específico, induce la síntesis de E₃ y E₂ a expensas de la aromatización de los andrógenos sintetizados en las células de la teca bajo el estímulo de la LH (Fauser and Van Heusden, 1997; Hillier, 2001; Jamnongjit and Hammes, 2006) (**Figura 6**). En respuesta a los elevados niveles de E₂ producidos, por la acción conjunta y coordinada de las células de la teca y de la granulosa, la FSH promueve la aparición de nuevos FSHR en las células de la granulosa. Dicha cantidad de FSHR incrementa en concordancia a la proliferación de las células de la granulosa y con ello, se aumenta la sensibilidad folicular hacia la FSH y la actividad enzimática de *CYP19A1* en la aromatización de los andrógenos en estrógenos.

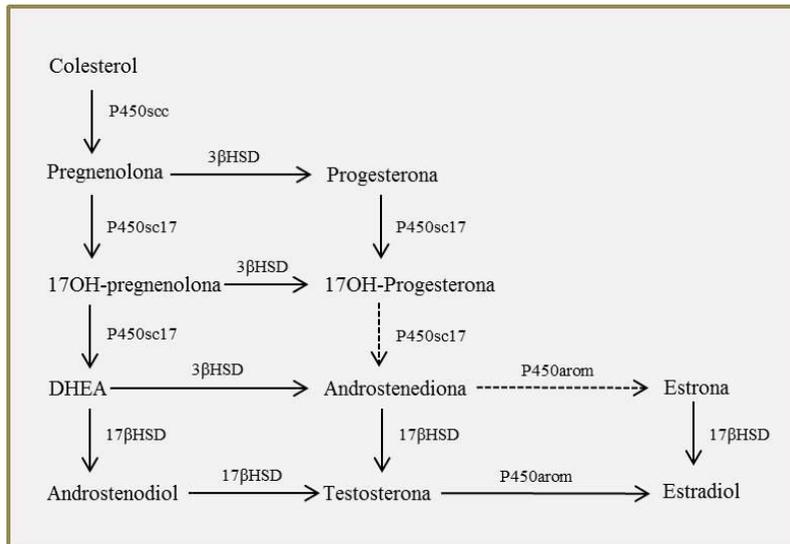


Figura 7.- Vía principal de la síntesis de las hormonas esteroideas ováricas. Adaptado de (Tresguerres and Castillo, 1999)

1.3.3.- Participación del receptor de andrógenos en la función ovárica

Existen evidencias que sugieren la participación de AR en la fertilidad femenina en base a los resultados obtenidos en diferentes estudios realizados en modelo animal murino deficiente en AR (AR knockout), denominado modelo ARKO. Diferentes autores han descrito que las ratas homocigotas ARKO deficientes de AR en las células de la granulosa y en los ovocitos, presentan alteraciones en la foliculogénesis y embriogénesis. Específicamente, se ha descrito que este modelo murino ARKO tiene un desarrollo folicular alterado, presenta una reducida capacidad ovulatoria y fecundante, además de signos de un fallo ovárico prematuro (Hu et al., 2004; Shiina et al., 2006).

De igual modo, estudios ejecutados en modelo murino ARKO en los que se deleccionó AR específicamente en las células de la granulosa, han demostrado una actuación específica de los andrógenos a través de su receptor. Se ha informado del papel de los andrógenos en la regulación del desarrollo folicular, concretamente atenuando la atresia de los folículos al mismo tiempo que promueven el crecimiento de los folículos

preantrales y su transición a folículos antrales (Sen and Hammes, 2010; Walters et al., 2012).

Estos resultados en modelo murino ARKO sugieren un papel preponderante de AR en la regulación de la foliculogénesis gonadotropo independiente así como gonadotropo dependiente. En humanos se desconoce con exactitud el papel de AR en la función ovárica. En aras a la potencial modulación que ejerce AR durante el desarrollo folicular en modelo murino, cabe esperar una participación de AR en la función ovárica de la mujer. A su vez, a través de AR, los andrógenos actuarían como precursor de la esteroidogénesis aromatizándose en estrógenos, o participarían indirectamente a través del eje hipotálamo hipofisario gonadal o de tejidos metabólicos.

Recientemente, Sen y colaboradores han abordado el estudio de los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en la regulación de la foliculogénesis. Estos autores han descrito, tanto en células de la granulosa de ratón como de mujeres sometidas a TRA, la existencia de 2 vías de actuación por las que los andrógenos modulan el desarrollo folicular. Una vía considera la prevención de la atresia folicular mediante la inducción de un micro RNA antiapoptótico (miR-125b), que suprime la expresión proteica de moléculas proapoptóticas. Una segunda vía incentiva el crecimiento de los folículos mediante el aumento de los niveles proteicos de FSHR de manera independiente al proceso transcripcional (Sen et al., 2014).

1.4.- Presentación histórica de la baja respuesta ovárica

1.4.1.- Definición de paciente baja respondedora

Las mujeres subsidiarias de tratamiento mediante Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) que responden insuficientemente a los protocolos de estimulación ovárica controlada, se les refiere como pacientes bajas respondedoras.

Uno de los principales inconvenientes en la identificación de estas pacientes en la práctica clínica ha sido la ausencia de uniformidad en los criterios considerados en la definición de paciente con baja respuesta ovárica.

La primera vez que se informó de una mujer con disminuida respuesta folicular fue en el año 1983 (García et al., 1983). Desde entonces, numerosos autores se han esforzado en definir a las pacientes bajas respondedoras en función de numerosos criterios.

Se propuso definir paciente con baja respuesta ovárica a aquella que presentase una edad avanzada (Karande et al., 1997), un test dinámico de reserva ovárica alterado (Navot et al., 1987) o una elevada concentración sérica basal de FSH (Droesch et al., 1989; Feldberg et al., 1994; Faber et al., 1998; Karande and Gleicher, 1999).

Del mismo modo, en la identificación de estas pacientes, se consideró la exhibición de niveles séricos de E₂ alterados, concretamente al presentar una disminuida concentración de E₂ en el día 5 del ciclo (Schoolcraft et al., 1997) o en el día de la inducción de la ovulación (García et al., 1983; Raga et al., 1999; Loutradis et al., 2003).

Otros parámetros concernientes a la evolución de la estimulación ovárica, también se consideraron en la definición de paciente con baja respuesta ovárica. Concretamente, exhibir un reducido reclutamiento de folículos preovulatorios en el día de la inducción de la ovulación (Land et al., 1996; Fridstrom et al., 1997; Raga et al., 1999; Loutradis et al., 2003), una prolongada duración de la estimulación ovárica (Toth et al., 1996), además de un incremento de la cantidad total de gonadotropinas administradas (Shaker et al., 1992; Kailasam et al., 2004) y un aumento de la dosis diaria de gonadotropina exógena FSH (Shaker et al., 1992; Faber et al., 1998).

A su vez, una paciente cuando presentaba una reducida recuperación ovocitaria, también era definida como baja respondedora (Chong et al., 1986; Schoolcraft et al., 1997; Rombauts et al., 1998; Surrey et al., 1998). Finalmente, y de forma más definitiva, se propuso incluir en la definición de estas pacientes, presentar al menos una historia previa de cancelación de un ciclo de TRA por ausencia de respuesta ovárica (Manzi et al., 1994; Schachter et al., 2001; Tarlatzis et al., 2003; Penarrubia et al., 2005).

Todos estos criterios fueron considerados de manera combinada o aisladamente por los diferentes autores (Badawy et al., 2011), con el propósito de establecer una definición consensuada de las pacientes bajas respondedoras. En una revisión bibliográfica realizada por Polyzos y colaboradores en el año 2011, se identificaron 47 ensayos clínicos realizados en pacientes bajas respondedoras, de entre los cuales se consideraron 41 definiciones

(Polyzos and Devroey, 2011), lo que evidenció una falta de consenso en la definición que identifique a dichas pacientes y manifestó la complejidad que ello requiere.

No fue hasta el año 2010, durante el congreso anual de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología en la reunión mantenida por el Grupo de Interés Especial, cuando se establecieron tres criterios en la definición de las pacientes bajas respondedoras; referidos globalmente con el término del criterio de Bolonia (Ferraretti et al., 2011). Se consensuaron los siguientes criterios:

- Tener una edad materna avanzada (igual o superior a 40 años) o presentar un riesgo de una reserva ovárica potencialmente disminuida.
- Presentar una baja respuesta ovárica en un ciclo previo de TRA, considerando para ello, un recuento ovocitario igual o inferior a tres ovocitos, tras un protocolo convencional de estimulación ovárica controlada.
- Mostrar valores disminuidos en las pruebas bioquímicas hormonales y ecográficas de pronóstico de la reserva ovárica; concretamente, un recuento folicular antral menor de entre 5 y 7 folículos, y un valor sérico de la hormona antimulleriana (AMH) comprendido entre 0,5-1,1 ng/mL.

La comunidad científica estableció considerar a una mujer baja respondedora, a aquella paciente que presentase dos de los tres criterios consensuados. Del mismo modo, se determinó identificar a una mujer como baja respondedora ante situaciones de dos episodios clínicos de inadecuada respuesta ovárica tras protocolo de estimulación ovárica, independientemente de la edad o de la predicción de la reserva ovárica (Ferraretti et al., 2011).

Una definición homogénea y consensuada de las pacientes bajas respondedoras en base al criterio de Bolonia permitirá en la práctica clínica, una adecuada identificación de aquellas pacientes potencialmente candidatas a presentar una respuesta insuficiente a los protocolos convencionales de estimulación ovárica controlada, resultando de enorme utilidad en el asesoramiento médico para el manejo clínico de las bajas respondedoras.

1.4.2.- Prevalencia de la baja respuesta ovárica

En torno a un 10-25% de las mujeres sometidas a TRA no responden adecuadamente a los protocolos de estimulación ovárica controlada. Específicamente presentan una respuesta ovárica insuficiente con un inadecuado desarrollo folicular, unas reducidas tasas de gestación relativas al 4% y unas elevadas tasas de cancelación de ciclo de aproximadamente el 76%. Todo ello compromete tanto el resultado como la eficacia de las TRA (Keay et al., 1997; Surrey and Schoolcraft, 2000; Mahutte and Arici, 2002; Tarlatzis et al., 2003; Ulug et al., 2003; Saldeen et al., 2007; Venetis et al., 2010).

1.4.3.- Etiología de la respuesta ovárica inadecuada

Se han planteado diferentes hipótesis para explicar la patología que subyace en la baja respuesta ovárica, según se describen a continuación.

1.4.3.1.- Reserva ovárica disminuida

Existen evidencias de una reducida reserva ovárica, definida ésta por la población de folículos primordiales existentes en los ovarios, en las pacientes con baja respuesta ovárica. Concretamente se ha postulado que la existencia de una comprometida población folicular primordial disponible para el reclutamiento de los folículos en proliferación, es debida a un acortamiento en la duración de la fase folicular del ciclo ovárico que ocurre en las pacientes bajas respondedoras, respecto a la duración del ciclo de las pacientes normo-respondedoras (Bancsi et al., 2002).

La disminución de la población folicular se ha considerado como el principal factor fisiopatológico de la baja respuesta ovárica, y puede ser fundamentalmente debida a la edad avanzada, a un reservorio folicular insuficiente o a un aceleramiento de la atresia folicular, según se describe a continuación:

- ***Edad avanzada de la mujer***

La disminución en el potencial reproductivo de la mujer, asociado a una edad biológica avanzada de la misma, debe ser considerada ante una respuesta ovárica insuficiente a la estimulación ovárica con gonadotropinas exógena; reflejo del envejecimiento ovárico (te Velde and Pearson, 2002; Beckers et al., 2002; de Boer et al., 2002; Nikolaou and Templeton, 2003).

El aumento de la edad de la mujer conlleva una reducción de la calidad y cantidad ovocitaria. Las principales causas del deterioro de la calidad de los ovocitos se asocian fundamentalmente a un incremento de las aneuploidías, debidas a los defectos en el proceso de división meiótica, así como a una acumulación de daños en el ADN. En tanto que la cantidad folicular, de forma paralela a la reducción de la calidad ovocitaria, desciende progresivamente el número de folículos reclutables residuales en los ovarios (García-Velasco and Remohí, 2007).

La reducción de la población folicular asociada con la edad avanzada de la mujer, es uno de los principales dogmas de la medicina reproductiva. Sin embargo este concepto clásico se ha cuestionado recientemente. Se han descrito células germinales pluripotenciales implicadas durante la vida postnatal, en la producción folicular y diferenciación ovocitaria; reemplazando aquellos folículos deplecionados que han experimentado atresia folicular (Woods and Tilly, 2012).

- ***Reservorio folicular primordial insuficiente***

Una reducción o depleción total de la población inicial de folículos primordiales puede resultar debido a una alteración durante la migración de las células germinales primordiales en la etapa proliferativa de las ovogonias durante la ovogénesis, o en el transcurso del proceso de diferenciación de los folículos primordiales durante la foliculogénesis (García-Velasco and Remohí, 2007).

La disgenesia gonadal pura, debida a mutaciones en los genes que regulan tanto el proceso migratorio de las células germinales primordiales como las divisiones mitóticas que experimentan las ovogonias durante su proliferación celular, también puede explicar la

deficiencia inicial folicular en los ovarios, y en consecuencia la insuficiente reserva ovárica (García-Velasco and Remohí, 2007).

- ***Aceleramiento de la atresia folicular***

La tasa de atresia folicular prematura se puede incrementar ante un desequilibrio de las moléculas con acción pre-apoptótica y pro-apoptótica existentes en los ovarios, a través del proceso de muerte celular programado de apoptosis (Hussein et al., 2005).

El incremento de la depleción folicular también puede ser debido a factores genéticos, enzimáticos e inmunológicos (García-Velasco and Remohí, 2007).

1.4.3.2.- Alteraciones en la angiogénesis folicular y ovárica

Se ha postulado la existencia de una microcirculación anómala alrededor del folículo dominante debida a la presencia de una elevada resistencia en los vasos distales, dificultando el desarrollo de una adecuada red vascular para la distribución de la gonadotropina FSH circulante en las pacientes bajas respondedoras (Pellicer et al., 1994).

Se ha informado que las pacientes con baja respuesta ovárica podrían tener alterada la capacidad de producción de determinados factores angiogénicos locales, como la angiotensina (Pellicer et al., 1994) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), condicionando un ambiente folicular de hipoxia (Friedman et al., 1997). Dicha alteración de la angiogénesis ovárica, debida a la desregulación de ciertos factores como el VEGF (Ocal et al., 2004), puede influir sobre el entorno intraovárico, limitando la accesibilidad de las gonadotropinas disponibles y disminuyendo la sensibilidad de los ovarios a éstas.

1.4.3.3.- Disminución de factores intraováricos moduladores de la acción de la FSH

Se ha detectado una reducción en la producción del factor de crecimiento insulinoide de tipo I, denominado IGF-I, en las pacientes con baja respuesta ovárica (Bahceci et al.,

2007). Este factor intraovárico participa en la modulación de la acción de la FSH potenciando su efecto, a través de alteraciones autocrinas y paracrinas intraováricas (Fauser, 1996).

En pacientes con una escasa reserva ovárica, se ha descrito una síntesis deficiente del factor atenuante del aumento de gonadotropinas (GnSAF). Este factor ovárico está implicado en el eje hipotálamo hipofisario gonadal. Concretamente ejerce sobre dicho eje, un efecto biológico específico de reducción de la capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH, sin que influya en la secreción constitutiva de las gonadotropinas FSH y LH (Martinez et al., 2002).

1.4.3.4.- Presencia de inhibidores selectivos que interfieren en la acción ovárica de la FSH

Se ha descrito la existencia, en el suero sanguíneo de pacientes bajas respondedoras, de proteínas de bajo peso molecular que inhiben la unión de la gonadotropina FSH a su receptor específico (Fauser, 1996). También se ha informado de la presencia de un factor de alto peso molecular, que inhibe la unión del ligando a FSHR, purificado parcialmente a partir del líquido folicular (Lee et al., 1993). Sin embargo se desconoce con exactitud el significado fisiológico de estas moléculas proteicas y su efecto inhibitorio sobre la sensibilidad ovárica a la FSH.

1.4.3.5.- Presencia de anticuerpos que afectan a la función ovárica

Se ha especulado que las pacientes bajas respondedoras producen anticuerpos (Ac) contra los componentes celulares foliculares, inhibiendo la proliferación celular de las células de la granulosa (García-Velasco and Remohí, 2007).

Existen estudios que no corroboran esta etiología inmunitaria al no haberse detectado niveles diferenciales de inmunoglobulinas tipo G anti-células de la granulosa entre pacientes bajas respondedoras con adecuados niveles séricos de FSH, y normo-respondedoras (Pellicer et al., 1994). Sin embargo, otros trabajos describen la presencia de

Ac anti FSH en un 92% de las pacientes bajas respondedoras evaluadas y una total ausencia en las pacientes normo-respondedoras (Meyer et al., 1990).

1.4.3.6.- Descenso de la cantidad de FSHR

Los primeros trabajos realizados en primates informaron de un descenso significativo del nivel de la FSH, a consecuencia de la elevada concentración de E_2 y su acción de retroalimentación negativa; y de un acortamiento de la fase folicular del ciclo ovárico. La retroalimentación negativa ejercida por el E_2 , en combinación a una diferencial localización interfolicular de los sitios de unión de la hCG, y una disminución de la cantidad de FSHR en las células de la granulosa, se hipotetizaron como posibles causas de la disminución de los niveles de FSH (Zeleznik, 1981). La implicación de FSHR en la baja respuesta ovárica se presenta detalladamente en el apartado 1.6.

1.4.3.7.- Actividad aromataasa potencialmente reducida

Estudios realizados *in vitro* con células de la granulosa procedentes de pacientes que presentaban reducidos niveles de E_2 tras estimulación ovárica controlada, informaron de una reducida secreción de estrógenos. Esta deficiente actividad enzimática se revirtió en aquellas células que recibieron un aporte exógeno de FSH. Por ello se hipotetizó que la respuesta observada podía ser en parte debida a una menor actividad del FSHR o bien a un descenso en la actividad aromataasa de las células de la granulosa (Hurst et al., 1992).

Por el contrario, Neal y colaboradores, no observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad aromataasa de las células de la granulosa recuperadas de pacientes bajas y normo- respondedoras (Neal et al., 2008).

1.4.4.- Pronóstico de la baja respuesta ovárica

En la actualidad, los esfuerzos clínicos se focalizan en la predicción *a priori* de la baja respuesta ovárica. La identificación de las pacientes susceptibles de presentar una

respuesta ovárica insuficiente a la estimulación ovárica controlada, se pronostica clínicamente mediante la evaluación de diferentes factores predictores de la respuesta ovárica.

A continuación se detallan los marcadores predictivos comúnmente empleados en la predicción de la baja respuesta ovárica.

1.4.4.1.- Edad reproductiva avanzada

Existen claras evidencias de que la reserva ovárica disminuye significativamente con la edad (Gougeon et al., 1994). Sin embargo, debido a la discrepancia existente entre la edad cronológica y la edad biológica o gonadal de la mujer, es preciso combinar la edad materna avanzada con otros marcadores predictivos de la reserva ovárica.

1.4.4.2.- Parámetros clínicos predictores de una respuesta ovárica potencialmente disminuida

En la práctica clínica se evalúa la reserva ovárica mediante diagnóstico ecográfico y a través de diferentes tests funcionales para la predicción de la respuesta ovárica, según se detalla a continuación.

- ***Evaluación ultrasonográfica para el conteo folicular antral y de los parámetros ováricos***

La valoración ecográfica de los folículos antrales constituye en la actualidad la principal prueba diagnóstica en la evaluación de la reserva ovárica (Bancsi et al., 2002) y en la predicción de la respuesta ovárica a la estimulación ovárica controlada (Muttukrishna et al., 2005; Verhagen et al., 2008).

Se ha descrito que una reducción del recuento de folículos antrales (RFA) se correlaciona íntimamente con una reserva ovárica disminuida (Chang et al., 1998; Frattarelli et al., 2000). Y con ello, dicha disminución folicular potencia el riesgo de desarrollar una baja respuesta ovárica, y de presentar una disminución acelerada de la fertilidad.

El parámetro del RFA tiene un poder predictivo similar al de la hormona anti mülleriana (AMH) (van Rooij et al., 2002; Muttukrishna et al., 2005). Tanto si se considera el uso aislado o combinado de ambas pruebas, el RFA y la AMH son los parámetros de mayor importancia en el diagnóstico de una reserva ovárica disminuida y en el pronóstico de la baja respuesta ovárica (Jayaprakasan et al., 2010).

Otros parámetros ováricos como son el volumen ovárico y la vascularización ovárica pueden relacionarse con la reserva ovárica (Zaidi et al., 1996; Lass et al., 1997; Pavlik et al., 2000; Frattarelli et al., 2004) a pesar de no tener una predicción significativa de la baja respuesta ovárica (Jayaprakasan et al., 2010).

- *Tests funcionales de la reserva ovárica*

Existen una serie de pruebas dinámicas que relacionan los niveles de FSH y de E₂ previa y posteriormente a la estimulación clínicamente consideradas, tales como:

Prueba de estimulación con citrato de clomifeno (CCCT)

Se evalúa la influencia de la liberación hipofisaria de la FSH, inducida por el citrato de clomifeno (CC) sobre la síntesis ovárica de esteroides y de péptidos; además de la inhibición de la FSH endógena que produce. Este test consiste en realizar una determinación hormonal de FSH, LH y E₂ en condición basal y de respuesta, tras la administración prolongada de 10 mg de CC iniciada en el día 5 y mantenida hasta el día 9 del ciclo ovárico (Remohí et al., 2008). Un valor sérico de FSH > 25 mUI/mL obtenido, combinando los valores de las dos condiciones de determinación, pronostica una reserva ovárica disminuida (Navot et al., 1987). Algunos autores defienden el uso clínico del CCCT a pesar de tener un poder predictivo similar al del recuento de folículos antrales (RFA) en combinación con el marcador de la concentración sérica basal de FSH (Hendriks et al., 2005).

Prueba de estimulación con agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GAST)

Se determinan los cambios de E₂ entre los días 2 y 3 del ciclo tras la administración de 1 mg de un análogo agonista de la GnRH (acetato de leuprolide) (Ranieri et al., 1998; Remohí et al., 2008). Las mujeres que mantienen elevados los niveles de E₂ (McIlveen et al., 2007) o carecen de respuesta ovárica en el día 5 del ciclo (Karande and Gleicher, 1999) tienen un peor pronóstico de respuesta ovárica. Algunos autores informan de un alto valor predictivo del GAST, siendo adicional al que ofrece el RFA (Broekmans et al., 2006).

Test de la reserva ovárica mediante estimulación con FSH (EFORT)

Se calculan los niveles basales y del ciclo de estimulación de FSH, E₂ e inhibina B, previos y posteriores a la administración de 300 UI de FSH recombinante (FSHr) en el día 3 del ciclo ovárico (Remohí et al., 2008). Las mujeres que presenten un valor de FSH > 11 mUI/mL tendrán una respuesta ovárica de peor pronóstico (Fanchin et al., 1994).

Una reciente revisión sistemática y de metaanálisis, en base a la cuestionable capacidad predictiva de los tests funcionales, propone el abandono de estas pruebas dinámicas en la práctica clínica, en beneficio de los marcadores predictivos del RFA y de la determinación de AMH (Maheshwari et al., 2009).

- *Estimación de la densidad folicular*

La reserva ovárica depende del número de folículos primordiales existentes en la corteza ovárica, por lo que una aproximación para su estimación podría realizarse mediante el análisis de la densidad folicular a partir de una biopsia ovárica (Lass et al., 1997).

Sin embargo, la utilidad de la estimación de la densidad folicular para predecir la reserva ovárica queda excluyente en la identificación clínica de las pacientes bajas respondedoras, y relegado al ámbito de la investigación biomédica clínica (Vital-Reyes et al., 2006; Kwok and Johnson, 2012).

1.4.4.3.- Determinaciones séricas hormonales de FSH, E₂ e inhibina B en condiciones basales

El marcador hormonal de reserva ovárica comúnmente utilizado en la práctica clínica es la determinación basal de FSH, debido a la inversa correlación existente con la capacidad de respuesta folicular a la administración de gonadotropinas exógenas (Bukman and Heineman, 2001; Broekmans et al., 2006). Específicamente, un rango comprendido entre 10-30 mUI/mL de FSH en la fase folicular temprana del ciclo ovárico se ha considerado predictor de baja respuesta ovárica (Toner et al., 1991).

Asimismo, un nivel elevado de E₂ comprendido entre 30-75 pg/mL al inicio de la fase folicular predice una baja respuesta ovárica (Smotrich et al., 1995), y se asocia a un pronóstico desfavorable en pacientes de edad avanzada (Licciardi et al., 1995). Es debido a que la paciente se encuentra en una fase más avanzada del desarrollo folicular, produciéndose un menor reclutamiento folicular. No obstante, en la actualidad no existe consenso relativo al límite de concentración máxima de E₂ en el diagnóstico bioquímico de pacientes potencialmente bajas respondedoras (Tarlantzis et al., 2003).

De igual modo, la concentración de inhibina B en condición basal pronostica la cantidad de folículos en desarrollo, considerándose disminuidos los valores inferiores a 45 pg/mL en pacientes bajas respondedoras (Seifer et al., 1997; Seifer et al., 1999). Concretamente, una concentración disminuida de inhibina B predice una reducción del reclutamiento folicular y refleja envejecimiento ovárico prematuro (Welt and Schneyer, 2001; Fried et al., 2003).

1.4.4.4.- Niveles séricos inadecuados de P₄ y AMH

Niveles superiores a 1,1 ng/mL de P₄ en torno al día 10 del ciclo ovárico, se asocian con una reserva ovárica disminuida y a un acortamiento de la fase folicular (Hofmann et al., 1995). También se ha descrito que una elevada relación de los niveles de P₄ respecto a los de E₂ durante la fase folicular tardía, pronostica una reserva ovárica disminuida (Younis et al., 2001). Asimismo se ha informado, que una alteración en los niveles circulantes de P₄ en el líquido folicular de las pacientes bajas respondedoras, se asocia íntimamente al proceso

de luteinización prematura, el cual puede acontecer en las células de la granulosa de los folículos de dichas pacientes (Luborsky et al., 2002).

En relación a los niveles de AMH, la reducción o ausencia de AMH implica una rápida depleción de la reserva de los folículos primordiales (Durlinger et al., 2002) por lo que se considera como marcador del envejecimiento ovárico y de la reserva ovárica (Scheffer et al., 1999; de Vet et al., 2002). Sin embargo, en la actualidad no existe consenso para determinar el límite inferior de AMH a partir del cual se relacione con un mal pronóstico de respuesta ovárica; habiéndose propuesto un valor de referencia de 2,97 ng/mL (Kunt et al., 2011).

La concentración sérica de AMH es un potente factor predictivo de la reserva ovárica (La Marca et al., 2007; La Marca et al., 2010; Broer et al., 2010; Buyuk et al., 2011), superior a la determinación sérica basal de FSH y al RFA (Hazout et al., 2004; Muttukrishna et al., 2005; Penarrubia et al., 2005). El número de folículos antrales tempranos se correlaciona más sólidamente con los niveles de AMH, que con los marcadores bioquímicos habituales de las determinaciones séricas basales de FSH, LH, E₂ e inhibina B (de Vet et al., 2002; Hazout et al., 2004; Kunt et al., 2011).

1.4.4.5.- Reducidas concentraciones intrafoliculares de los factores intraováricos IGF-1, GnSAF y VEGF

A pesar de haberse detectado bajas concentraciones intrafoliculares del factor IGF-1 en mujeres que presentan una respuesta insuficiente a la estimulación con gonadotropinas exógenas no se justifica el papel de este factor ovárico en la predicción y diagnóstico de la baja respuesta (Oosterhuis et al., 1998).

Respecto al factor ovárico GnSAF, se ha descrito una reducción significativa de su síntesis en mujeres que presentan una respuesta ovárica disminuida previa al ciclo de estimulación ovárica controlada (Martinez et al., 2002).

Del mismo modo, se han asociado elevados niveles intrafoliculares del factor VEGF, con una respuesta ovárica disminuida y bajas tasas de gestación (Ocal et al., 2004).

1.4.4.6.- Historia previa de cancelación de ciclo

Un episodio previo de cancelación de ciclo debido a la ausencia de respuesta folicular durante la estimulación ovárica controlada, pronostica más favorablemente la evolución de los ovarios en respuesta a un nuevo ciclo de estimulación que otros marcadores predictivos de reserva ovárica disminuida (Penarrubia et al., 2005).

1.5.- Pautas terapéuticas ensayadas en la práctica clínica en pacientes con baja respuesta ovárica

En la actualidad resulta difícil comparar la efectividad sobre la mejora del rendimiento ovárico correspondiente a las diferentes estrategias terapéuticas ensayadas en las pacientes bajas respondedoras. Es debido a que los trabajos publicados, fundamentalmente carecen de uniformidad en cuanto a la definición de paciente con baja respuesta ovárica, al protocolo de estimulación pautado y al tamaño muestral necesario calculado.

A pesar de no existir un criterio homogéneo que consense una pauta terapéutica óptima en el manejo clínico de las pacientes bajas respondedoras, los protocolos de estimulación ovárica controlada ensayados en estas pacientes tienen por objetivo una mejora del reclutamiento y de la sincronización folicular para la consecución de un adecuado desarrollo folicular.

Los principales protocolos de estimulación ovárica controlada que se han considerado en el manejo clínico de las pacientes con baja respuesta ovárica para la mejora de su desarrollo folicular y respuesta ovárica, se describen detalladamente a continuación.

1.5.1.- Modificación de la pauta de las gonadotropinas administradas

1.5.1.1.- Administración de elevadas dosis de gonadotropinas

La estrategia comúnmente utilizada en el manejo clínico de las pacientes bajas respondedoras ha sido el incremento en las dosis de las gonadotropinas administradas.

En pacientes con diagnóstico de baja reserva ovárica o que han presentado una reducida respuesta ovárica en un ciclo previo, se ha descrito que un incremento en las dosis diarias de hasta 300-450 UI de FSH podría ofrecer una mejora del resultado del ciclo (García-Velasco et al., 2000; Siristatidis and Hamilton, 2007).

Sin embargo, se han obtenido resultados controvertidos en cuanto a la mejora del recuento y calidad ovocitaria y tasas clínicas, tras la administración de elevadas dosis de gonadotropina FSH en las pacientes bajas respondedoras (Hofmann et al., 1989; Karande et al., 1990; Klinkert et al., 2005; Siristatidis and Hamilton, 2007).

En relación al uso de dosis crecientes de la hormona gonadotrópica menopáusica humana (hMG), no se ha demostrado una significativa mejora en la eficiencia ovárica de las pacientes bajas respondedoras. No obstante se ha obtenido un ligero aumento en el número de folículos preovulatorios (van Hooff et al., 1993; Manzi et al., 1994; Land et al., 1996).

Una alternativa terapéutica al uso de elevadas dosis de gonadotropinas es la pauta de estimulación suave. Se ha descrito una mejora de las tasas de implantación y gestación clínica en las bajas respondedoras, en un estudio retrospectivo con casos control realizado en 285 pacientes con inadecuada respuesta ovárica (Yoo et al., 2011).

1.5.1.2.- Empleo de gonadotropinas recombinantes en lugar de urinarias

Está ampliamente descrito que el empleo de gonadotropinas recombinantes se asocia a mejores resultados de ciclo en comparación con el uso de gonadotropinas urinariamente purificadas o de hMG (Out et al., 1996; Daya, 2002).

Varios estudios prospectivos aleatorizados y con controles históricos realizados en pacientes bajas respondedoras, estimuladas con FSH recombinante (FSHr) o con FSH

urinaria (FSHu), informaron de una mejora estadísticamente significativa del recuento ovocitario, calidad embrionaria y tasa de gestación, así como de un plausible descenso de la tasa de cancelación de ciclo, tras la administración de FSHr (Raga et al., 1999; De Placido et al., 2000).

1.5.1.3.- Administración de gonadotropinas durante la fase lútea previa

Una administración temprana de FSH durante la fase lútea precedente al ciclo de estimulación ovárica controlada, puede incrementar el recuento folicular debido a la ampliación de la ventana del reclutamiento folicular.

Algunos autores ejecutaron trabajos prospectivos, aleatorizados y controlados, en los que se evidenció una ineficacia de la administración temprana de FSH en las pacientes bajas respondedoras. Dicha suplementación temprana no mejoró las variables embriológicas y de resultado de ciclo (Kansal Kalra et al., 2008).

Por el contrario, Kucuk y colaboradores en un trabajo prospectivo, aleatorizado y controlado, realizado en 42 mujeres con antecedente de baja respuesta ovárica, informaron de la significativa mejora del recuento ovocitario y tasa de gestación tras la administración de FSHr en la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada (Kucuk and Sozen, 2007; Kucuk et al., 2008a).

En relación a la temprana administración de LH, se ha descrito un efecto beneficioso sobre el desarrollo y la maduración ovocitaria en pacientes bajas respondedoras (Loutradis et al., 2007).

1.5.1.4.- Suplementación de LHr durante la estimulación ovárica controlada

En las pacientes bajas respondedoras la adición de LHr ha mejorado significativamente la cantidad de ovocitos en estadio maduro MII recuperados (De Placido et al., 2006) y la tasa de gestación clínica (Mochtar et al., 2007). Por el contrario, otros autores no han informado de una eficacia de la administración de LHr combinada a las gonadotropinas sobre la respuesta ovárica o en el resultado de ciclo (Fabregues et al., 2006; Berkkanoglu et al., 2007; Barrenetxea et al., 2008; Konig et al., 2013).

1.5.2.- Uso del ciclo natural y seminatural

En las pacientes bajas respondedoras que hayan presentado un nivel sérico disminuido de E₂ y un reclutamiento reducido de folículos preovulatorios en el día de la inducción de la ovulación, se ha propuesto el control de desarrollo del folículo natural mediante el uso del ciclo natural (Morgia et al., 2004; Castelo Branco et al., 2005; Loutradis et al., 2008; Loutradis et al., 2008; Loutradis et al., 2008; Schimberni et al., 2009; Kadoch et al., 2011).

Dos estudios llevados a cabo en 129 y 304 pacientes con baja respuesta ovárica, aleatorizado controlado y retrospectivo, respectivamente, compararon la eficacia del ciclo natural respecto al ciclo estimulado, habiendo informado de una mejora significativa de la tasa de implantación por transferencia embrionaria en las pacientes bajas respondedoras sometidas a un ciclo natural (Morgia et al., 2004; Ata et al., 2008).

Alternativamente al ciclo natural, en las pacientes con baja respuesta ovárica se puede considerar el ciclo seminatural o natural modificado, en base a las adecuadas tasas de implantación y de gestación, descritas en un estudio retrospectivo realizado por Elizur y colaboradores en 433 bajas respondedoras (Elizur et al., 2005).

1.5.3.- Modificación en las pautas de los análogos de la GnRH

A continuación se detallan las pautas ensayadas con los análogos agonistas y antagonistas de la GnRH para la estimulación ovárica controlada de las pacientes bajas respondedoras.

1.5.3.1.- Protocolo con agonistas de la GnRH

Los análogos agonistas de la GnRH ejercen a nivel hipofisario, una acción inicial estimulante por depleción de las gonadotropinas de la hipófisis, provocando un aumento inicial de la secreción de las gonadotropinas FSH y LH endógenas.

Posteriormente a la acción estimulante inicial, conocida como efecto llamarada o “*flare-up*” se produce, debido a la acción permanente que ejerce el agonista de la GnRH sobre su receptor, una internalización del receptor de la GnRH. Este efecto conlleva a una desensibilización o regulación a la baja, tanto de los receptores de la GnRH hipofisarios como de las vías de transmisión de mensajeros post-receptor. Esta desensibilización desencadena una supresión temporal hipofisaria de la producción de las gonadotropinas FSH y LH endógenas; y con ello se consigue una pérdida de la estimulación endógena de las gonadotropinas y un hipogonadismo reversible.

En pacientes potencialmente bajas respondedoras se han diseñado diferentes estrategias en la pauta de administración de los análogos agonistas de la GnRH, que intentan aprovechar el efecto inicial estimulante de llamarada o minimizar la acción supresora manteniendo su efecto inhibitor del pico prematuro de LH endógena; tal y como se detallan a continuación:

- ***Protocolo largo con agonistas de la GnRH***

En pacientes con baja respuesta ovárica, el efecto prolongado de los análogos agonistas de la GnRH administrados desde la mitad de la fase lútea, pueden derivar en estimulaciones de bajo rendimiento debido a un frenado excesivo del ovario, requiriéndose mayores dosis de gonadotropinas administradas (Remohí et al., 2008).

Estudios retrospectivos realizados en pacientes bajas respondedoras han informado, al utilizar un protocolo largo a dosis reducidas de agonistas de la GnRH, de la mejora significativa en el recuento de ovocitos maduros y calidad embrionaria, así como de un aumento del número de embriones transferidos y una disminución en la tasa de cancelación de ciclo (Feldberg et al., 1994; Olivennes et al., 1996; Ku et al., 2005).

- ***Protocolo corto con agonistas de la GnRH***

Se han realizado estudios prospectivos aleatorizados en pacientes con baja respuesta ovárica estimuladas al inicio del ciclo con agonista de la GnRH, en los que se ha obtenido una cantidad significativamente mayor de ovocitos en estadio maduro MII, de embriones de

óptima calidad y adecuadas tasas clínicas de resultado de ciclo (Padilla et al., 1996; Karande et al., 1997; Malmusi et al., 2005).

- ***Protocolo con dosis mínimas de agonistas de la GnRH***

Estudios clínicos prospectivos, sin aleatorizar con controles históricos, como aleatorizados, llevados a cabo en pacientes bajas respondedoras estimuladas con dosis mínimas de agonistas de la GnRH, han informado de un significativo aumento del desarrollo folicular y recuperación ovocitaria, así como de óptimos resultados de ciclo en relación a la tasa de gestación clínica. Esta mejora es debida a la disminución del efecto inicial o de llamarada y a la reducción de la exposición del entorno folicular a elevadas concentraciones de LH (Scott and Navot, 1994; Schoolcraft et al., 1997; Surrey, 2007; Schoolcraft et al., 2008).

- ***Protocolo stop con agonistas de la GnRH***

Se han realizado estudios prospectivos con controles históricos en pacientes con baja respuesta ovárica pautadas con este protocolo, que han demostrado una mejora significativa del rendimiento ovárico en cuanto al recuento de ovocitos recuperados, la calidad embrionaria y la cantidad de embriones transferidos; a pesar de haberse detectado unas moderadas tasas de gestación por embrión transferido y por ciclo iniciado, y de implantación (Faber et al., 1998; Pinkas et al., 2000; Schachter et al., 2001).

En las pacientes bajas respondedoras, no existe un consenso sobre el posible beneficio de una de las tres pautas de análogos agonistas de la GnRH descritas, sobre la mejora del rendimiento ovárico (Detti et al., 2005).

1.5.3.2.- Protocolo con antagonistas de la GnRH

Los análogos antagonistas de la GnRH se unen a los receptores de la GnRH presentes en la superficie de la hipófisis anterior, bloqueando de forma competitiva el acceso de la GnRH endógena, evitando su unión y estimulación del receptor pituitario, y

ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la secreción gonadotropa, lo que produce una profunda e inmediata supresión hipofisaria (Diedrich et al., 1994).

Se han obtenido resultados no concluyentes de la eficacia de los análogos antagonistas de la GnRH sobre la mejora del rendimiento ovárico en las pacientes bajas respondedoras. Concretamente, se ha informado de una disminución en la duración de la estimulación ovárica y una reducción de la dosis de gonadotropinas administradas (Nikoletts et al., 2001), así como un incremento del reclutamiento folicular y un plausible aumento en el recuento de ovocitos recuperados (Craft et al., 1999). De igual modo, se ha descrito una reducción en la tasa de cancelación de ciclo por falta de respuesta y una tendencia no significativa a alcanzar una mayor tasa de implantación y de gestación (Copperman, 2003; Cheung et al., 2005; Griesinger et al., 2006).

Numerosos autores han comparado la eficacia sobre la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras entre los diferentes protocolos con análogos agonistas y antagonistas de la GnRH. Globalmente no se han descrito diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo folicular, la respuesta ovárica o en las tasas clínicas del resultado de ciclo, al compararse dos pautas de análogos de la GnRH.

Específicamente, en las pacientes bajas respondedoras no se ha informado de una significativa mejora de la respuesta ovárica y del resultado de ciclo debida a un protocolo largo (Cheung et al., 2005; Madani et al., 2012), o protocolo corto (Akman et al., 2001; Mohamed et al., 2005) o protocolo con dosis mínimas de agonista de la GnRH (Surrey, 2007; Schoolcraft et al., 2008; Kahraman et al., 2009) en comparación a una pauta de protocolo con antagonista de la GnRH. No obstante, a dosis mínimas de agonista de la GnRH se ha obtenido una moderada mejora de la tasa de implantación (Schoolcraft et al., 2008); mientras que con antagonista de la GnRH se ha aumentado ligeramente la tasa de gestación (Cheung et al., 2005).

Una revisión sistemática y de metaanálisis realizada por Sunkara y colaboradores, evaluó la eficacia de diferentes protocolos con análogos de la GnRH sobre la respuesta ovárica de 680 pacientes bajas respondedoras, evidenciando la falta de un significativo beneficio de una determinada pauta sobre el rendimiento ovárico (Sunkara et al., 2007). Resultados similares fueron publicados recientemente por Pu y colaboradores, en una amplia revisión de metaanálisis con un total de 1.127 pacientes bajas respondedoras, en la

que se informó de la ausencia de una evidente mejoría ovárica debida a un determinado protocolo con análogo de la GnRH (Pu et al., 2011).

1.5.4.- Tratamientos adyuvantes

Se ha considerado el empleo de tratamientos adyuvantes para la mejora de la sensibilidad ovárica a la FSH y del rendimiento ovárico en las pacientes con inadecuada respuesta ovárica, según se describen detalladamente a continuación.

1.5.4.1.- Co-administración de citrato de clomifeno

El citrato de clomifeno (CC) es un fármaco derivado no esteroideo del trifeniletileno, que se une a los receptores de los estrógenos del hipotálamo (Kurl and Morris, 1978). Dicha unión provoca una inhibición competitiva de la retroalimentación negativa del E₂, lo que desencadena una disminución del nivel sanguíneo estrogénico. Ante este menor nivel de estrógenos, el hipotálamo induce el mecanismo neuroendocrino para la secreción de la GnRH, la cual libera de manera pulsátil las gonadotropinas hipofisarias endógenas, contribuyendo a un adecuado desarrollo y maduración folicular (Kerin et al., 1985).

En pacientes bajas respondedoras se ha descrito el uso del CC como terapia adyuvante en protocolo con bajas dosis de gonadotropinas y con análogos de la GnRH, obteniendo resultados opuestos. Saadat y colaboradores no observaron diferencias estadísticamente significativas en la calidad ovocitaria y embrionaria, ni en la tasa de fecundación (Saadat et al., 2003). Por el contrario, un estudio retrospectivo sobre la eficacia de la suplementación del CC, informó de una mejora significativa en la cantidad de folículos preovulatorios, de los ovocitos recuperados y del número de embriones transferidos (Jovanovic et al., 2011).

Una reciente revisión sistemática y de metaanálisis publicada por Figueiredo y colaboradores, recopila un total de 339 pacientes bajas respondedoras, informando que no existen diferencias significativas en las variables clínicas de las pacientes que son tratadas

con CC en combinación a un protocolo con análogo de la GnRH, o en ausencia de tratamiento adyuvante (Figueiredo et al., 2013).

1.5.4.2.- Suplementación de la hormona del crecimiento

En base al aumento de la apoptosis que ocurre en las células de la granulosa de pacientes con edad avanzada, y a la relación de la hormona del crecimiento (HG) y su intermediario IGF-I como moléculas antiapoptóticas, el uso de la HG representa una alternativa en pacientes bajas respondedoras que presenten concentraciones disminuidas de HG (Bencomo et al., 2006; Kolibianakis et al., 2009).

Diferentes estudios prospectivos, aleatorizados, doble ciegos, controlados y con grupo placebo, realizados en pacientes con inadecuada respuesta ovárica suplementadas con HG, no han informado de un rendimiento ovárico óptimo en términos de una mayor recuperación ovocitaria (Hughes et al., 1994), mayor cantidad de embriones transferidos o mejora en la tasa de fecundación (Dor et al., 1995).

Por el contrario, Kucuk y colaboradores, en un trabajo prospectivo aleatorizado ejecutado en 61 bajas respondedoras suplementadas con HG, alcanzaron una mayor cantidad de ovocitos en estadio maduro MII y de embriones óptimos transferibles; a pesar de obtener una reducida tasa de implantación (Kucuk et al., 2008b).

1.5.4.3.- Administración adyuvante de L-arginina

El aa L-arginina es un precursor del óxido nítrico, que ejerce un efecto de inducción de vasodilatación local, favoreciendo el flujo sanguíneo ovárico.

Un estudio prospectivo, aleatorizado realizado para la evaluación del efecto de la suplementación oral de L-arginina sobre el flujo sanguíneo uterino y la respuesta ovárica de 34 pacientes bajas respondedoras, informó de un aumento estadísticamente significativo del número de ovocitos recuperados, de embriones transferidos y de la tasa de gestación (Battaglia et al., 2002).

1.5.4.4.- Suplementación de ácido acetilsalicílico

La administración de ácido acetilsalicílico (ASA) provoca una inhibición de la actividad de la enzima ciclooxigenasa y una disminución de los niveles del vasoconstrictor tromboxano, favoreciendo un aumento del flujo ovárico y uterino; y en consecuencia, mejorando la respuesta de los ovarios.

Diferentes estudios retrospectivos y prospectivos, aleatorizados y doble ciegos, han informado de la ineficiencia de la suplementación con ASA sobre la mejora de la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras, en términos de desarrollo folicular y ovocitario y de tasas clínicas de resultado de ciclo (Lok et al., 2004; Pakkila et al., 2005; Frattarelli et al., 2008a).

1.5.5.- Androgenización del entorno folicular

La androgenización del ambiente folicular consiste en la creación de un estado endocrinológico pseudo-poliquístico reversible, con una mayor sensibilidad folicular y ovárica a la FSH, mediante la administración de andrógenos (García-Velasco and Remohí, 2007).

Los primeros trabajos realizados en ratas demostraron que un exceso en los niveles de andrógenos, alcanzados mediante suplementación de T o dihidrotestosterona, inducía alteraciones en el ciclo celular de las células de la granulosa y atresia folicular en los folículos en desarrollo (Hillier and Ross, 1979; Billig et al., 1993).

Un efecto contrario se evidenció con la administración de antagonistas de los andrógenos en animales hipofisectomizados, que alcanzaban a amplificar el efecto estimulador a la FSH, revelando con ello que los andrógenos endógenos ejercen una acción antagonista de la función ovárica (Zeleznik et al., 1979; Billig et al., 1993; Kaipia and Hsueh, 1997; Pradeep et al., 2002).

Estudios experimentales ejecutados en primates permitieron demostrar la influencia de los andrógenos sobre el desarrollo ovocitario en respuesta a las gonadotropinas (Hillier and De Zwart, 1981; Harlow et al., 1986). Dichos estudios revelaron la regulación positiva

de los andrógenos sobre el crecimiento folicular al inducir un aumento en la expresión de FSHR en las células de la granulosa (Weil et al., 1998; Weil et al., 1999), al promover el inicio del crecimiento de los folículos primordiales (Vendola et al., 1999) y el aumento de la cantidad de los folículos preantrales y antrales en desarrollo (Hillier et al., 1997; Vendola et al., 1998).

En base a las evidencias existentes de la amplificación que ejercen los andrógenos, se ha preconizado la androgenización del entorno folicular en las pacientes con sospecha de baja respuesta ovárica. Con tal propósito, diferentes autores han ensayado las siguientes estrategias terapéuticas adyuvantes, detalladas a continuación.

1.5.5.1.- Inhibidores de la enzima aromatasas

El mecanismo de acción de los inhibidores de la enzima aromatasas se basa en dos hipótesis. En primer lugar se postula que el inhibidor de la aromatasas puede ejercer una acción central, al bloquear la retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal. Este bloqueo puede inducir a un aumento de la secreción gonadotrópica y ello, a una sincronización del crecimiento folicular (Casper and Mitwally, 2006). En segundo lugar, se hipotetiza que los andrógenos intraováricos acumulados temporalmente por la acción de los inhibidores de la aromatasas, pueden ejercer una acción periférica. Específicamente, pueden inducir la expresión de los receptores intrafoliculares de la FSH y de IGF-1, promoviendo con ello a aumentar la sensibilidad folicular a la FSH (Mitwally and Casper, 2002a).

El letrozol es un inhibidor de la aromatasas con capacidad de suprimir hasta el 99% de la producción estrogénica mediante su unión competitiva a la subunidad enzimática del citocromo P450 (Akhtar et al., 1993). Inicialmente, dicho inhibidor fue diseñado para el manejo adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama avanzado hormono-dependiente en mujeres postmenopáusicas (Dowsett et al., 1995; Winer et al., 2002).

El primer trabajo que informó del posible efecto beneficioso de la administración de letrozol en pacientes con inadecuada respuesta ovárica, fue realizado por Mitwall y colaboradores, en un ensayo clínico prospectivo observacional con cohortes en 12 bajas

respondedoras. Las pacientes que recibieron letrozol presentaron un incremento significativo en la cantidad de folículos preovulatorios, (Mitwally and Casper, 2002b).

El incremento de la respuesta ovárica debida a la administración de letrozol, fue demostrado por García-Velasco y colaboradores en un estudio piloto observacional con 147 mujeres con antecedente de baja respuesta ovárica al tener al menos un ciclo de TRA cancelado. Las pacientes que recibieron letrozol previamente a iniciar la estimulación ovárica controlada, presentaron unos niveles intrafoliculares de T y A₄ estadísticamente aumentados, un incremento significativo del recuento ovocitario recuperado y una tasa de implantación plausiblemente mejorada (Garcia-Velasco et al., 2005).

Yarali y colaboradores informaron, en un estudio retrospectivo con casos control llevado a cabo en un total de 885 bajas respondedoras, de una óptima calidad embrionaria y de unas elevadas tasas de fecundación, de gestación clínica por embrión transferido y de implantación en aquellas pacientes que recibieron suplementación oral de letrozol (Yarali et al., 2009).

Por el contrario, otros autores no han obtenido una mejora de la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras mediante la administración adyuvante del inhibidor de la aromataasa letrozol (Goswami et al., 2004; Schoolcraft et al., 2008; Ozmen et al., 2009; Davar et al., 2010). Tal es el caso de Goswami y colaboradores, que realizaron un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado y ciego sencillo en 38 pacientes con historia previa de entre uno a tres episodios de baja respuesta ovárica. La suplementación con letrozol no mejoró significativamente el rendimiento ovárico. Concretamente no se obtuvo un aumento significativo en el número de folículos preovulatorios, el recuento de ovocitos recuperados, de embriones transferibles ni en la tasa de gestación por ciclo iniciado (Goswami et al., 2004).

Similares resultados obtuvieron Schoolcraft y colaboradores en un ensayo clínico prospectivo controlado realizado en 534 mujeres bajas respondedoras. Las pacientes que recibieron suplementación oral de letrozol, no alcanzaron una mejora significativa del desarrollo folicular y ovocitario, ni unas tasas significativas de resultado de ciclo (Schoolcraft et al., 2008).

De igual modo, Ozmen y colaboradores ejecutaron un trabajo prospectivo y aleatorizado en 70 pacientes bajas respondedoras. A pesar de no detectar una mejora

estadística en la respuesta ovocitaria y en las tasas clínicas, se informó de un descenso significativo en la tasa de cancelación de ciclo en aquellas pacientes que recibieron letrozol (Ozmen et al., 2009). A su vez, Davar y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico prospectivo aleatorizado en 94 pacientes bajas respondedoras, en el que la suplementación de letrozol no resultó en una mejora significativa del rendimiento ovárico, de la calidad embrionaria ni en las tasas clínicas de fecundación e implantación (Davar et al., 2010).

En una revisión sistemática y de metaanálisis realizada por el Grupo de Interés en Endocrinología Reproductiva de la Sociedad Española de la Fertilidad, se informa de un posible efecto deletéreo sobre la calidad ovocitaria de las pacientes bajas respondedoras debido a los elevados niveles intrafoliculares de andrógenos detectados tras la suplementación con letrozol. Por tanto, se evidencia la necesidad de nuevos estudios prospectivos, aleatorizados y controlados que determinen la eficacia del inhibidor de la aromatas letrozol en estas pacientes (Requena et al., 2008).

1.5.5.2.- Administración de esteroides adrenocorticales

La administración de los esteroides de origen adrenocortical DHEA y dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) se ha considerado en el manejo clínico de las pacientes con antecedente de baja respuesta ovárica para la androgenización del entorno folicular. Es debido a que la adición de estas prehormonas esteroideas adrenocorticales, en combinación a las gonadotropinas exógenas, podría mejorar la respuesta ovárica, debido al efecto que ejercen sobre la concentración del factor intraovárico IGF-1, incrementando sus valores séricos (Casson et al., 1998).

El primer trabajo documentado del empleo de DHEA en pacientes bajas respondedoras, fue realizado por Casson y colaboradores. El posible beneficio de la suplementación oral de DHEA micronizado durante 2 meses, previa al protocolo de estimulación ovárica controlada, se evaluó en 5 pacientes con antecedente de baja respuesta ovárica. Concretamente, se obtuvo un incremento significativo de los niveles de E₂ y del recuento de folículos preovulatorios (Casson et al., 2000).

Los resultados obtenidos por Casson y colaboradores fueron posteriormente confirmados en un estudio con casos control realizado por Barad y colaboradores, en 25

pacientes bajas respondedoras que recibieron suplementación oral de DHEA durante 16 semanas, previamente a iniciar la estimulación ovárica controlada. Se informó de una mejora estadísticamente significativa del rendimiento ovárico en términos de ovocitos recuperados, de embriones de óptima calidad embrionaria y de la tasa de fecundación (Barad and Gleicher, 2006). El incremento en las tasas de resultado de ciclo tras suplementación de DHEA, se corroboró en un estudio retrospectivo con casos control posteriormente realizado por los mismos investigadores, en 190 pacientes con marcadores de función ovárica disminuida. La administración prolongada de DHEA durante 4 meses, mejoró estadísticamente las tasas de implantación y de gestación clínica (Barad et al., 2007).

Asimismo, Wisner y colaboradores realizaron el primer ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y controlado para la evaluación de la administración adyuvante oral de DHEA en 33 pacientes con historia previa de baja respuesta ovárica. Las pacientes asignadas al grupo de estudio realizaron dos ciclos consecutivos de estimulación ovárica controlada previa suplementación de DHEA; durante 6 semanas en el primer ciclo, y de 16 a 18 semanas, en el segundo ciclo. La suplementación adyuvante de DHEA no mejoró el rendimiento ovárico en términos de desarrollo folicular y ovocitario; sin embargo, incrementó significativamente la tasa de recién nacido vivo (Wisner et al., 2010). El segundo ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y controlado, fue llevado a cabo por Moawad y colaboradores, en 133 pacientes con antecedente de baja respuesta ovárica. Aquellas pacientes que recibieron tratamiento de DHEA durante 12 semanas presentaron un aumento significativo del recuento de ovocitos recuperados y de los embriones transferibles, así como de la tasa de gestación por ciclo iniciado (Moawad and Shaeer, 2012).

Recientemente se ha informado de la ineficacia de la administración adyuvante de DHEA sobre la mejora de la respuesta ovárica, en un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y controlado ejecutado por Kara y colaboradores en 208 pacientes con reserva ovárica disminuida. Las pacientes que recibieron suplementación de DHEA durante 12 semanas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de ovocitos totales y maduros recuperados, ni en las tasas de fecundación y de gestación clínica respecto al resultado de ciclo obtenido en las pacientes asignadas al grupo control (Kara et al., 2014).

Finalmente, se han publicado tres revisiones sistemáticas y de metaanálisis en relación a la administración adyuvante de DHEA en pacientes con disminuida reserva y baja respuesta ovárica. En dichos trabajos se postula una acción potenciadora del DHEA sobre el entorno folicular, ya que al actuar a través de AR, ejerce un efecto beneficioso en el entorno folicular, aumentando el reclutamiento de los folículos antrales y niveles hormonales de AMH. No obstante, estas revisiones confirman que a pesar de las evidencias reportadas de la mejora ovárica, se requieren nuevos ensayos clínicos aleatorizados que determinen la eficacia de la administración adyuvante de DHEA en las pacientes bajas respondedoras (Gleicher and Barad, 2011; Fouany and Sharara, 2013; Narkwichean et al., 2013).

1.5.5.3.- Administración de testosterona transdérmica

La androgenización del ambiente folicular también puede alcanzarse mediante la administración de testosterona transdérmica. Cabe destacar que la utilización de gel y de parches de testosterona para la mejora de la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras ha ofrecido resultados opuestos en términos de rendimiento ovárico (Massin et al., 2006; Balasch et al., 2006; Fabregues et al., 2009; Kim et al., 2011a).

Massin y colaboradores realizaron un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en 53 pacientes con historia previa de baja respuesta ovárica e inadecuados valores hormonales predictivos de reserva ovárica disminuida, con el propósito de evaluar la eficacia de la aplicación de testosterona en gel sobre el rendimiento ovárico. La aplicación de testosterona transdérmica durante los 15-20 días previos a la estimulación ovárica controlada, no permitió mejorar significativamente el recuento de folículos preovulatorios visualizados ecográficamente, ni en la cantidad de folículos maduros puncionados, en el recuento de ovocitos totales y maduros recuperados o en el número de embriones transferibles, respecto al grupo control (Massin et al., 2006).

Por el contrario, Balasch y colaboradores demostraron un efecto beneficioso de la administración de testosterona en parches transdérmicos, en un ensayo clínico prospectivo y controlado, que realizaron en 25 pacientes con dos ciclos previos cancelados por baja respuesta folicular, a las que se les realizó un tercer ciclo de estimulación ovárica

controlada previa administración de testosterona transdérmica, siendo cada paciente control de sí misma. Las pacientes que finalizaron el tercer ciclo previa aplicación del parche de testosterona transdérmica, se les puncionó una cantidad de folículos maduros de hasta cinco veces superior respecto a su primer ciclo. Además se les recuperó un adecuado recuento ovocitario y presentaron unas convenientes tasas de gestación por ciclo iniciado y de implantación (Balasch et al., 2006).

Fábregues y colaboradores obtuvieron una relativa mejoría del rendimiento ovárico tras un pretratamiento con parches transdérmicos de testosterona, en un ensayo clínico prospectivo y aleatorizado, que llevaron a cabo en 62 pacientes con antecedentes de disminuida respuesta folicular. A pesar de no detectar diferencias estadísticamente significativas en las variables clínicas y de resultado de ciclo con independencia de haber recibido o no un pretratamiento de testosterona transdérmica, sí se detectó una leve mejoría de la respuesta folicular en las pacientes que se aplicaron el parche transdérmico de testosterona. Concretamente, en estas pacientes se alcanzó un ligero aumento del recuento ovocitario total y maduro, así como un aumento de la cantidad de embriones transferibles de óptima calidad embrionaria, y en la tasa de gestación por ciclo iniciado; en comparación a las pacientes que no recibieron pretratamiento co-adyuvante (Fabregues et al., 2009).

De manera similar, Kim y colaboradores informaron de un incremento plausible en la cantidad folicular y ovocitaria debida a la administración adyuvante de testosterona transdérmica en gel en un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y controlado en 110 pacientes con antecedente de respuesta ovárica disminuida. Las pacientes que recibieron testosterona transdérmica en gel durante 21 días presentaron una mejora significativa tanto del desarrollo folicular, como de la cantidad y calidad ovocitaria. Esta mejora del desarrollo folicular y ovocitario se tradujo en un incremento significativo de las tasas clínicas de resultado de ciclo (Kim et al., 2011a).

Recientemente se ha publicado una revisión sistemática y de metaanálisis en relación a la eficacia de la administración adyuvante de testosterona transdérmica en un total de 225 pacientes bajas respondedoras. A pesar de informar de una ineficiencia sobre el aumento de la cantidad y calidad ovocitaria, el pretratamiento con testosterona mediante gel o parches transdérmicos, previo a la estimulación ovárica controlada, incrementa significativamente la tasa de recién nacido vivo (Gonzalez-Comadran et al., 2012).

1.5.6.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada para la mejora de la sincronización folicular

1.5.6.1- Suplementación de estrógenos durante la fase lútea previa

Se ha evidenciado que la temprana administración de estrógenos minimiza las oscilaciones interciclo existentes de los niveles de FSH. En base a ello y a la retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos, la suplementación de éstos durante la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica, puede disminuir la variación que ocurre durante la transición a la fase folicular temprana del ciclo de los niveles de FSH. Este descenso de los niveles endógenos de FSH puede incrementar la sincronización folicular al favorecer la coordinación de los folículos en proliferación. Por tanto, la temprana administración de estrógenos se ha considerado en la paciente con baja respuesta ovárica, debido a que favorecen el reclutamiento folicular ya que una mayor cantidad de folículos iniciarán su crecimiento tempranamente al presentar un menor requerimiento de FSH (Fanchin et al., 2003a).

En concordancia a los trabajos realizados por Fanchin y colaboradores que evidencian una sincronización del desarrollo folicular en las pacientes normo-responderas tras una administración temprana de 17β -E₂ micronizado oral (Fanchin et al., 2003b; Fanchin et al., 2003c); diferentes estudios han demostrado una mejora del desarrollo ovocitario y embrionario en pacientes bajas responderas, debido al tratamiento de estrógenos durante la fase lútea previa (Dragisic et al., 2005; Frattarelli et al., 2008b; Hill et al., 2009; Chang et al., 2012).

Dragisic y colaboradores realizaron el primer estudio retrospectivo que evidenció una plausible mejora tanto en la cantidad como en la calidad ovocitaria y embrionaria debida a la administración temprana de estrógenos, en 68 pacientes con inadecuada respuesta ovárica. En el ciclo de estimulación ovárica controlada, previa aplicación de E₂ transdérmico en parche iniciada en el día 10 del ciclo, se detectó una mejora estadísticamente significativa del desarrollo ovocitario y del recuento de embriones

transferibles, en comparación al ciclo anterior en ausencia de administración temprana de estrógenos. (Dragisic et al., 2005).

Los resultados obtenidos por Dragisic y colaboradores fueron consistentes con los publicados posteriormente en un estudio retrospectivo, pareado, con cohortes que llevaron a cabo Frattarelli y colaboradores en 60 pacientes bajas respondedoras. La administración oral de 17β -E₂ micronizado, iniciada en el día 21 del ciclo, mejoró significativamente la cantidad y calidad ovocitaria e incrementó estadísticamente la tasa de fecundación y el número de embriones transferibles de óptima calidad embrionaria (Frattarelli et al., 2008b).

En un estudio retrospectivo con cohortes realizado por Hill y colaboradores en 57 pacientes bajas respondedoras, se informó de la mejora en la cantidad de embriones transferibles de óptima calidad debida a la administración oral de estrógenos, iniciada desde el día 21 de la fase lútea previa. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta folicular y ovocitaria, ni en las tasas de resultado de ciclo independientemente de haber recibido o no una suplementación temprana de 17β -E₂ micronizado. Tan sólo la suplementación de estrógenos alcanzó a mejorar significativamente el recuento de embriones óptimos transferibles (Hill et al., 2009).

Chang y colaboradores obtuvieron resultados similares en relación a la mejora de la respuesta ovárica y calidad embrionaria, en un estudio retrospectivo con cohortes ejecutado en 155 pacientes con antecedente de baja respuesta ovárica. Las pacientes que recibieron suplementación oral de estrógenos en forma de valerato de E₂, tanto iniciándose la administración en el día 21 del ciclo previo como al comienzo de la estimulación ovárica, presentaron un aumento estadísticamente significativo del recuento ovocitario y de la calidad embrionaria, que se tradujo en una adecuada tasa de implantación (Chang et al., 2012).

Por el contrario, otros autores no han observado un efecto significativamente beneficioso sobre el rendimiento ovárico, ni un incremento de la cantidad ovocitaria o de calidad embrionaria de las pacientes bajas respondedoras que han recibido una suplementación de estrógenos durante la fase lútea previa (Weitzman et al., 2009; Aghahosseini et al., 2011).

Weitzman y colaboradores ejecutaron un análisis retrospectivo en 121 pacientes con historia previa de inadecuada respuesta ovárica. Los resultados obtenidos evidenciaron que

la administración temprana de E₂ transdérmico en parche, no supone una mejora significativa en el desarrollo folicular, ni un incremento estadístico del recuento y calidad ovocitaria y embrionaria (Weitzman et al., 2009). De igual modo, Aghahosseini y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico prospectivo y aleatorizado en 118 pacientes bajas respondedoras, en el que no se detectó diferencias estadísticamente significativas en las variables clínicas y de resultado de ciclo independientemente de haber recibido o no una suplementación con estrógenos durante la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada (Aghahosseini et al., 2011).

Recientemente, Chang y colaboradores, publicaron una revisión de metaanálisis que englobó a 450 bajas respondedoras y 606 pacientes control, en la que se evidenció la significativa mejora del recuento de ovocitos recuperados, debida al pretratamiento con estrógenos; sin haberse podido demostrar un aumento estadístico de la tasa de gestación clínica (Chang and Wu, 2013)

1.5.6.2- Administración de ACOs durante la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada

Los ACOs ejercen una retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal enlenteciendo la secreción pulsátil de la GnRH y reduciendo la liberación de FSH y LH. Además, los ACOs sincronizan el desarrollo y proliferación de los folículos durante el reclutamiento folicular y aumentan la sensibilidad de los receptores de estrógenos. Por estos motivos, en pacientes con baja respuesta ovárica se ha considerado el pretratamiento con ACOs tanto en el protocolo de inhibición hipofisaria con mínimas dosis de análogo agonista de la GnRH (Surrey et al., 1998; al-Mizyzen et al., 2000) como con antagonista de la GnRH (Copperman, 2003; Kim et al., 2011b); habiéndose informado de una mejora de la estimulación ovárica y del resultado de ciclo. Sin embargo, se desconoce si la administración temprana de ACOs influye en que la reserva ovárica sea especialmente sensible a la excesiva supresión de las gonadotropinas endógenas y de si ejerce un efecto en la supresión hipofisaria previa al inicio de la estimulación ovárica (Lindheim et al., 1996; Kovacs et al., 2001).

No existe un consenso en cuanto a la eficacia de la suplementación previa de ACOs sobre el rendimiento ovárico de las pacientes con inadecuada respuesta ovárica.

Los resultados de algunos estudios han sugerido un efecto beneficioso de la administración temprana de ACOs en la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras. Fisch y colaboradores realizaron un estudio prospectivo con casos control en 42 mujeres con historia previa de respuesta ovárica inadecuada. La administración prolongada de ACOs previa pauta de estimulación ovárica, supuso un incremento significativo del desarrollo folicular y ovocitario, respecto al ciclo previo en ausencia de suplementación adyuvante hormonal (Fisch et al., 1996). Kim y colaboradores obtuvieron, en un estudio prospectivo, aleatorizado y controlado ejecutado en 82 bajas respondedoras, una leve mejoría en el recuento de ovocitos maduros recuperados, en la cantidad de ovocitos fecundados y de embriones óptimos disponibles tras un pretratamiento con ACOs conjugados con estrógenos, en comparación a otras dos pautas farmacológicas ensayadas en ausencia de suplementación lútea de anovulatorios (Kim et al., 2011b).

Por el contrario, otros investigadores no han observado un aumento de la respuesta ovárica tras la suplementación adyuvante de ACOs. Al-Mizyen y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo, observacional en 76 mujeres bajas respondedoras; informando que la suplementación adyuvante de ACOs no ofreció una mejora significativa de la cantidad ovocitaria y calidad embrionaria (al-Mizyen et al., 2000). De manera similar, Kovacs y colaboradores en un trabajo retrospectivo llevado a cabo en 73 pacientes bajas respondedoras, evidenciaron una ineficiencia de la administración temprana de ACOs conjugados con estrógenos sobre el desarrollo ovocitario, la cantidad y calidad embrionaria y tasa de gestación clínica (Kovacs et al., 2001). Asimismo, el trabajo retrospectivo ejecutado por Duvan y colaboradores en 53 pacientes con baja respuesta ovárica, no obtuvo diferencias estadísticamente significativas en la calidad embrionaria, ni en las tasas de implantación y de gestación clínica independientemente de haber recibido una suplementación de ACOs conjugados con estrógenos, previa a un protocolo de estimulación ovárica controlada (Duvan et al., 2008).

1.6.- Implicación de la cantidad de receptores de las gonadotropinas y de los andrógenos en la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras

1.6.1.- Participación de FSHR y LHR/LHCGR en la baja respuesta ovárica

En mujeres infértiles subsidiarias a estimulación ovárica mediante administración de gonadotropinas exógenas, se ha descrito una correlación positiva de los niveles de expresión de *FSHR* y de *CYP19A1* en las células de la granulosa (Catteau-Jonard et al., 2008; Gonzalez-Fernandez et al., 2011). Se ha observado sin embargo que existen situaciones de un desarrollo folicular ineficiente a pesar del aporte exógeno de FSH (Cai et al., 2007). Este hecho sugiere la existencia de una insuficiente expresión de FSHR en las células de la granulosa en respuesta a la FSH, quizás debida a una alteración en el mecanismo de retroalimentación. Alternativamente, se ha sugerido que pudiera haber deficiencias en la actividad de FSHR, desencadenando una inadecuada transmisión en las vías de señalización.

En la actualidad es sumamente reducido el número de publicaciones científicas que abordan el estudio de FSHR y de LHR/LHCGR en las pacientes bajas respondedoras. Al mismo tiempo, existen discrepancias entre los escasos estudios realizados, en cuanto a los niveles de expresión y de recuento de estos receptores en las células de la granulosa.

Thirupathi y colaboradores publicaron el primer estudio en el que se evaluó la cantidad de FSHR y LHR/LHCGR en las células de la granulosa de 32 pacientes, cuya respuesta ovárica se subcategorizó en adecuada o baja, según los niveles de E₂ alcanzados tras la estimulación ovárica controlada. En dicho trabajo se informó que tanto la proporción de células positivas para FSHR como la intensidad de fluorescencia emitida por dichas células, no difirieron entre los dos subtipos de pacientes. Por el contrario, a pesar de no haberse detectado diferencias estadísticamente significativas en el recuento de células de interés que expresaron LHR/LHCGR, la intensidad de fluorescencia que emitieron fue estadísticamente superior en las pacientes bajas respondedoras. Estos resultados sugirieron que la expresión diferencial obtenida de FSHR y LHR/LHCGR en las células de la

granulosa de las pacientes bajas respondedoras puede ser debida a alteraciones funcionales de las células de la granulosa y a una temprana luteinización (Thirupathi et al., 2001).

Estos autores ejecutaron un trabajo posterior para evaluar en 21 pacientes bajas respondedoras, tres marcadores endocrinos de luteinización tales como P₄, inhibina A y VEGF. Los niveles detectados en el líquido folicular fueron significativamente elevados, sugiriendo que los folículos maduros recuperados en estas pacientes están luteinizados (Luborsky et al., 2002).

Cai y colaboradores obtuvieron por el contrario resultados opuestos a los de Thirupathi tras realizar un estudio prospectivo en 100 pacientes subdivididas según el desarrollo folicular alcanzado tras la estimulación ovárica controlada. Las células de la granulosa luteinizadas se procesaron convenientemente para el estudio de FSHR a nivel génico y proteico, mediante las técnicas de QF-RT-PCR y de Western blot. En las pacientes bajas respondedoras se informó que el nivel de ARNm para FSHR y la cantidad proteica de FSHR obtenidos fueron significativamente menores, respecto a los detectados en las pacientes con moderada y elevada respuesta ovárica. Estos resultados postularon que la cantidad de FSHR puede ser clave en el desarrollo ovocitario y que una disfuncionalidad en FSHR puede afectar a la diferenciación de las células de la granulosa (Cai et al., 2007).

La expresión disminuida de FSHR en las células de la granulosa de las pacientes bajas respondedoras se corroboró posteriormente en un estudio con casos control, llevado a cabo por González-Fernández y colaboradores. Se evaluaron 28 pacientes con inadecuada respuesta ovárica, de entre un total de 82 mujeres infértiles afectas por diferentes patologías. Se cuantificó la expresión génica de *FSHR* y de *CYP19A1* de las células de la granulosa por QF-RT-PCR. En las pacientes bajas respondedoras se obtuvo un nivel de ARNm para *FSHR* significativamente reducido respecto a la expresión génica observada en las pacientes control y con síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). Además se detectó una menor expresión génica de *CYP19A1* en las bajas respondedoras, en comparación a las pacientes afectas de endometriosis. Estos resultados aludieron que la correcta expresión de los genes regulados por FSHR puede depender de la cantidad existente de dicho receptor celular y de una cascada de señalización equilibrada; ambos alterados en las pacientes bajas respondedoras, en las que puede haber una disfuncionalidad de FSHR y una alteración en la unión del ligando al receptor (Gonzalez-Fernandez et al., 2011).

En cuanto a la implicación de LHR/LHCGR en la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras, recientemente se ha publicado un estudio comparativo con casos control ejecutado por Skiadas y colaboradores. Este trabajo constituye un análisis por microarrays, realizado para explorar perfiles de expresión génica con respecto al estado de la reserva ovárica. Concretamente, se realizó un microarray del ARN extraído de las células de la granulosa recuperadas de los líquidos foliculares de un total de 28 pacientes. Se abordó el estudio de dos genes relacionados con la función ovárica, tales como el gen *AMH* y el gen *LHR/LHCGR*. Posteriormente se procedió a la correspondiente validación, considerando 4 genes relacionados fundamentalmente con el receptor de prostaglandinas y con la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (*StAR*). Los resultados obtenidos evidenciaron una subdivisión entre las pacientes bajas respondedoras en función de la expresión diferencial de 2 genes relacionados con la calidad embrionaria y la capacidad fecundante. Además obtuvieron una expresión significativamente disminuida de *AMH* y aumentada tanto de *LHR/LHCGR* como de *StAR* en las pacientes bajas respondedoras respecto a las normo-respondedoras. Estos resultados sugirieron que la luteinización prematura puede subyacer en la inadecuada respuesta ovárica (Skiadas et al., 2012).

De manera sutil cabe mencionar el abordaje del estudio de FSHR y LHR/LHCGR y su relación con la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras desde una aproximación genética; habiéndose publicado también escasos estudios al respecto (Gerasimova et al., 2010).

1.6.2.- Participación de AR en la modulación de la cantidad de FSHR y LHR/LHCGR

En el caso de las mujeres, el papel de AR en la función ovárica ha sido ampliamente estudiado en las pacientes con cáncer de mama (Garay and Park, 2012), así como en pacientes infértiles con SOP. Específicamente, Catteau-Jonard y colaboradores demostraron por primera vez una sobreexpresión de AR en las células de la granulosa en pacientes afectas por el SOP (Catteau-Jonard et al., 2008).

El aumento de la sensibilidad ovárica a la FSH mediada por la actuación de los andrógenos a través de AR, fue estudiado por Nielsen y colaboradores en las células de la granulosa de los folículos antrales de menor tamaño, procedentes de cortezas ováricas criopreservadas. Estos autores estudiaron la cantidad de ARNm de AR y su correlación con los niveles relativos génicos de *FSHR*, *LHR/LHCGR*, *CYP19A1* y del gen codificante del receptor tipo II de AMH. Se informó de una correlación positiva entre los niveles de ARNm para AR y para *FSHR* con la cantidad de andrógenos detectada en el líquido folicular. Al mismo tiempo, se detectó que la expresión de AR estaba significativamente correlacionada con el nivel de ARNm para *FSHR*. En tanto que la expresión génica de *LHR/LHCGR* y de *CYP19A1* no se correlacionó con los niveles relativos de ARNm de AR. Estos datos sugirieron que a través de AR se promueve la respuesta gonadotropa de los folículos en desarrollo (Nielsen et al., 2011).

Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que aborden el papel de AR en la baja respuesta o que profundicen en el análisis de expresión génica de dicho receptor en las células foliculares de las pacientes bajas respondedoras.

1.7.- Participación de las principales enzimas esteroideogénicas en la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras

La correcta esteroideogénesis ovárica es necesaria para la adecuada función ovárica. Deficiencias en la esteroideogénesis se han asociado con una secreción aumentada de los andrógenos ováricos en las pacientes afectas de SOP. Sin embargo, en la patología de la baja respuesta ovárica, se desconoce con exactitud si pudiera estar relacionada con alteraciones génicas o enzimáticas de las moléculas partícipes del proceso de la esteroideogénesis. En este sentido, destacan dos trabajos realizados en pacientes con baja respuesta ovárica.

Phy y colaboradores ejecutaron un estudio comparativo para evaluar la expresión génica de *StAR* en 6 pacientes, cuya respuesta ovárica fue clasificada según los niveles séricos circulantes de P_4 . Las células de la granulosa aisladas se procesaron mediante la técnica de análisis por inmunoblot. Las pacientes catalogadas como bajas respondedoras alcanzaron un desarrollo folicular similar al de las normo-respondedoras. Sin embargo se

obtuvo una reducida tasa de gestación y se cuantificaron unos niveles proteicos estadísticamente inferiores de StAR, en comparación a las pacientes que presentaron una adecuada respuesta ovárica. Estos resultados sugirieron que una disminución en la actividad de la enzima limitante de la esteroidogénesis, por limitación en su concentración, puede conllevar a una deficiente secreción de las hormonas esteroideas. Esta comprometida síntesis de las hormonas esteroideas sexuales, podría a su vez comprometer el desarrollo folicular, afectando la respuesta de los ovarios (Phy et al., 2002).

Muhammad y colaboradores obtuvieron resultados opuestos en un estudio prospectivo que llevaron a cabo en un total 20 pacientes, subdivididas en bajas respondedoras mayores de 40 años o normo-respondedoras menores de 35 años. Se cuantificó la cantidad de StAR y P450scc de las células de la granulosa mediante la técnica de Western blot. En las pacientes bajas respondedoras se obtuvo un recuento folicular, ovocitario y embrionario significativamente menor al obtenido en las pacientes normo-respondedoras. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles proteicos de StAR y P450scc entre las dos subpoblaciones de estudio. Estos resultados sugirieron que estas dos moléculas claves de la esteroidogénesis ovárica podrían no ser determinantes en el envejecimiento que acontece en las células de la granulosa de las pacientes bajas respondedoras añosas (Muhammad et al., 2009).

Finalmente, se ha postulado una posible modulación sobre la respuesta ovárica debida al efecto de algunos polimorfismos de un único nucleótido localizados en el gen *CYP19A1* o en el gen *17 β -HSD*, codificantes de la enzima aromatasa y del complejo enzimático 17 β -HSD, respectivamente (Sowers et al., 2006).

1.8.- Justificación de la ejecución del estudio

Diferentes autores han evidenciado una eficacia de las estrategias adyuvantes para la mejora del rendimiento ovárico de las pacientes bajas respondedoras. En los últimos años ha cobrado un mayor interés clínico la androgenización del ambiente folicular y la manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica. A pesar de los esperanzadores resultados clínicos obtenidos tras la administración temprana de andrógenos, estrógenos o gestágenos, es notable el escaso número de trabajos comparativos

que han evaluado la eficacia entre las diferentes estrategias adyuvantes (Elassar et al., 2011; Shastri et al., 2011; Sunkara et al., 2011; Bosdou et al., 2012).

Concretamente, se puede afirmar que no existe en la bibliografía científica ningún trabajo prospectivo, aleatorizado y controlado realizado en pacientes bajas respondedoras, que compare la eficacia de la administración temprana de testosterona transdérmica, 17β -E₂ transdérmico y ACOs conjugado con valerato de E₂ sobre el rendimiento ovárico. Ni que se evalúe la respuesta ovárica obtenida tras preparación folicular, respecto a un ciclo previo en ausencia de pretratamiento hormonal adyuvante, en la misma paciente.

Finalmente cabe mencionar que la práctica mayoría de las publicaciones científicas que evalúan el rendimiento ovárico de las pacientes bajas respondedoras sometidas a diferentes protocolos de estimulación ovárica controlada, pautas de supresión hipofisaria o tratamientos adyuvantes ensayados, profundizan en términos clínicos. Se focalizan fundamentalmente en variables clínicas, tales como los niveles hormonales circulantes, el desarrollo folicular y ovocitario, la calidad embrionaria y las tasas de resultado de ciclo (tasa de gestación por ciclo, tasa de gestación por transferencia embrionaria, tasa de implantación, tasa de cancelación y tasa de recién nacido vivo).

Por el contrario, son sumamente reducidos los trabajos científicos publicados que abordan el estudio de la respuesta ovárica desde un aspecto biológico. A excepción de los escasos estudios divulgados que evalúan la cantidad de FSHR y de LHR/LHCGR o la expresión de StAR, se desconoce el papel que ejerce AR y la expresión de las principales enzimas esteroidogénicas sobre la sensibilidad y respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras

En base a la plausible mejora del rendimiento ovárico debida a la administración de hormonas esteroideas sexuales durante la fase lútea previa, se hace necesario profundizar en el estudio de la sensibilidad ovárica mediante un abordaje biológico. Por ello, no sólo se pretendió evaluar el posible aumento del desarrollo folicular y ovocitario en pacientes bajas respondedoras sometidas a preparación folicular. Por extensión se pretendió elucidar el papel de FSHR y AR de las células de la granulosa, de los genes *FSHR*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* en las células del cumulus, y de las hormonas circulantes en el líquido folicular que pudiera acontecer en la respuesta ovárica de dichas pacientes.

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

El presente trabajo de Tesis Doctoral postula un potencial efecto beneficioso sobre el desarrollo folicular y respuesta ovárica de las pacientes verdaderas bajas respondedoras, debido a la preparación folicular mediante la manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada.

La posible mejora del rendimiento ovárico en respuesta a la administración adyuvante de andrógenos, estrógenos y gestágenos combinados con estrógenos, podría ser debida a un incremento en la cantidad de los receptores de la FSH y de andrógenos en las células de la granulosa, así como por un aumento en la expresión en las células del cumulus de los principales receptores y enzimas implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

El objetivo general planteado en el presente trabajo de Tesis Doctoral comprende la evaluación clínica y biológica del rendimiento ovárico de las pacientes con baja respuesta ovárica, sometidas a un ciclo de estimulación ovárica controlada en ausencia y tras preparación folicular.

3.2.- Objetivos específicos

- Identificación de las pacientes con baja respuesta ovárica confirmada de entre una población de mujeres infértiles potencialmente bajas respondedoras.
- Evaluación clínica y biológica de la respuesta ovárica de las pacientes verdaderas bajas respondedoras en comparación con las pacientes normo-respondedoras.
- Análisis del rendimiento ovárico en términos clínicos y biológicos de las pacientes bajas respondedoras, asignadas a la estrategia de preparación folicular a través de un pretratamiento de testosterona transdérmica.
- Estudio clínico y biológico de la respuesta ovárica de las pacientes con baja respuesta ovárica, aleatorizadas a la estrategia de preparación folicular mediante la administración temprana de 17β -E₂ micronizado transdérmico.
- Evaluación clínica y biológica del rendimiento ovárico de las pacientes bajas respondedoras asignadas a la estrategia de preparación folicular mediante pretratamiento de ACOs conjugados con valerato de E₂.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Diseño experimental

El eje principal del presente trabajo de Tesis Doctoral subyace dentro de un ensayo clínico unicéntrico, prospectivo, randomizado, controlado en dos fases, abierto y de fase II de desarrollo clínico, titulado “Preparación de folículos preantrales, previa fecundación *in vitro* tipo ICSI, en pacientes con baja respuesta ovárica”, realizado en el Servicio de Ginecología y Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, durante el periodo comprendido entre Marzo de 2011 y Junio de 2013.

Se obtuvo la aprobación pertinente del Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia con número EudraCT: 2009-018009-26 (*Anexo 1*) y de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (*Anexo 2*), además del documento del consentimiento informado firmado de cada paciente incluida. La realización de dicho ensayo clínico se desarrolló respetando las normas éticas de acuerdo a la Declaración de Derechos Humanos de Helsinki, las directrices de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95), la Directiva Europea (2001/20/EC) y el Real Decreto 223/2004; habiendo sido registrado en *clinicaltrials.gov* (*US National Institutes of Health*, NCT01310647).

El diseño experimental del presente trabajo de Tesis Doctoral aborda una primera fase de estudio correspondiente a la identificación de 84 pacientes con baja respuesta ovárica confirmada, de entre una población de 99 mujeres infértiles potencialmente bajas respondedoras que presentaban marcadores predictores de reserva ovárica disminuida.

La segunda fase de estudio consistió en la sincronización del crecimiento folicular de las 84 pacientes confirmadas como bajas respondedoras, mediante la manipulación de la fase lútea previa a un ciclo de estimulación ovárica controlada con idéntico protocolo de estimulación al pautado en la primera fase.

Para ello, las pacientes con baja respuesta ovárica confirmada se aleatorizaron en uno de los tres pretratamientos de preparación folicular ensayados, correspondientes a la suplementación con andrógenos, estrógenos o con ACOs conjugados con estrógenos. La posible mejora del rendimiento ovárico debido a la preparación folicular, se evaluó en cada paciente baja respondedora que finalizó los dos ciclos consecutivos de estimulación ovárica controlada, siendo cada paciente control de sí misma.

El hipotético incremento de la respuesta ovárica debido a la preparación de los folículos preantrales y antrales en crecimiento de las pacientes verdaderas bajas respondedoras, se contrastó con una potencial variación acaecida tanto en la cantidad y la expresión de los principales receptores y enzimas esteroidogénicas presentes en las células foliculares recuperadas en cada baja respondedora.

Por todo ello, la evaluación clínica y biológica del rendimiento ovárico de las pacientes bajas respondedoras se realizó en dos fases diferenciales detalladas en el siguiente apartado.

4.2.- Descripción pormenorizada del diseño experimental

4.2.1.- Población de estudio y selección de pacientes

Fueron incluidas 99 pacientes infértiles potencialmente bajas respondedoras del Servicio de Ginecología y Reproducción Humana subsidiarias de tratamiento mediante TRA por sospecha de reserva ovárica disminuida.

4.2.2.- Selección e inclusión de pacientes en la primera fase

Las pacientes potencialmente bajas respondedoras candidatas a ser incluidas en la primera fase del ensayo clínico debían cumplir al menos dos de los cuatro criterios de inclusión, considerados para establecer el diagnóstico de una baja respuesta ovárica. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Edad de la mujer igual o mayor a 38 años.
- Concentración sérica de FSH superior a 10 mUI/mL en el tercer día del ciclo menstrual de la mujer.
- Concentración sanguínea de AMH igual o inferior a 5 pmol/L en condiciones basales.
- Recuento folicular antral en condición basal, menor o igual a 6 folículos antrales.

Se aplicaron los siguientes criterios de exclusión:

- Pareja con factor masculino severo (recuento de espermatozoides móviles progresivos inferior a 1 millón/mL o diagnóstico de esterilidad masculina de azoospermia, oligoastenospermia u oligoastenoteratozoospermia severa).
- Paciente con sospecha clínica de endometriosis.
- Paciente con manifestación clínica de oligo-ovulación o anovulación crónica.
- Paciente que de forma voluntaria no entregase el consentimiento informado firmado o que deseara abandonar el estudio.
- Patología psiquiátrica o cognitiva que impidiese la comprensión de las condiciones del consentimiento informado y naturaleza del ensayo clínico.

4.2.3.- Inclusión de pacientes en la segunda fase

Al finalizar el ciclo de estimulación ovárica controlada convencional de la primera fase de estudio, tanto las pacientes que presentaron una adecuada respuesta ovárica (N=15), como las verdaderas bajas respondedoras que gestaron (N=9), se excluyeron del estudio.

De igual modo, no se incluyeron en la segunda fase, a aquellas pacientes que incumplieron voluntariamente el protocolo (N=3) o que decidieron abandonarlo (N=5) o por causas de distinta índole (detección de adenocarcinoma endometrial, N=1).

Finalmente se incluyeron en la segunda fase del estudio a 66 pacientes con baja respuesta ovárica confirmada.

Se requirió que las pacientes presentasen durante el ciclo de estimulación ovárica controlada convencional de la fase I, al menos uno de los tres criterios de inclusión:

- Recuento de folículos mayores de 16 mm de diámetro en el día de la inducción de la ovulación, menor o igual a 4 folículos.
- Concentración sanguínea de E₂ inferior a 500 pg/mL, en el día de la inducción de la ovulación.
- Número total de ovocitos maduros recuperados en el día de la punción folicular igual o inferior a 4 ovocitos MII.

Una vez incluidas las pacientes, fueron aleatorizadas para su asignación en uno de los tres pretratamientos de preparación folicular. La aleatorización se realizó mediante un programa informático generador de números aleatorios (Random Number Generator Pro, Segobit software) y a la paciente se le comunicó el pretratamiento folicular al que había sido asignada en la consulta médica durante la visita en la que fue informada del resultado clínico del primer ciclo de estimulación ovárica.

4.2.4- Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral fue calculado para detectar diferencias de al menos 2 ovocitos maduros MII en el recuento ovocitario recuperado entre los tres pretratamientos ensayados de preparación folicular. Con un poder estadístico del 80%, un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 0,05, se asignaron 11 pacientes en cada una de las tres estrategias foliculares ensayadas en la segunda fase.

Sin embargo se consideró aleatorizar un total de 22 pacientes en cada estrategia folicular, al asumir una pérdida aproximada del 10% de las pacientes inicialmente reclutadas, en base a la experiencia clínica previa del Servicio en cuanto a la tasa de

cancelación de ciclo por inadecuada o ausencia de respuesta folicular en las pacientes con baja respuesta ovárica.

4.3.- Protocolo de estimulación ovárica controlada pautado en las dos fases de estudio

Las pacientes incluidas como potenciales bajas respondedoras recibieron una estimulación ovárica controlada convencional según la pauta habitual aplicada en el Servicio de Ginecología para este tipo de pacientes, cuyo protocolo se describe detalladamente a continuación.

Estimulación ovárica con gonadotropinas

La estimulación ovárica se inició en el tercer día del ciclo menstrual con la administración subcutánea de 300 UI/día de FSHr (Gonal[®]) mantenida a dosis constante durante toda la estimulación. Al quinto día de tratamiento se realizó el primer control del desarrollo folicular, mediante la realización de una prueba ecográfica vaginal y determinación sanguínea de los niveles circulantes de E₂. A partir de ese momento, la respuesta de los ovarios a la FSHr administrada se comprobó ecográfica y hormonalmente cada 24 o 48 horas hasta que la paciente alcanzó criterios de inducción de la ovulación.

Inhibición hipofisaria con análogo antagonista de la GnRH

La supresión hipofisaria para la inhibición de la secreción de la gonadotropina LH endógena, se alcanzó mediante la administración subcutánea del análogo antagonista de la GnRH acetato de cetrorelix (Cetrotide[®]) a una dosis de 0,25 mg/día. La administración se inició el día en el que se visualizó ecográficamente la presencia de un folículo de 14 mm de diámetro medio y se mantuvo hasta el día de la maduración final ovocitaria.

Inducción de la ovulación con análogo agonista de la GnRH

La inducción de la ovulación se desencadenó cuando la paciente alcanzó un adecuado desarrollo folicular. Concretamente al haber visualizado ecográficamente al menos tres folículos preovulatorios de 17 mm de diámetro medio y/o haber determinado un nivel circulante de E₂ superior a 500 pg/mL. No obstante, en el caso de que a los doce días de administración de FSHr la paciente no alcanzase la situación considerada de adecuado desarrollo folicular, se procedió igualmente a la inducción de la ovulación.

La maduración final ovocitaria se indujo mediante administración subcutánea del análogo agonista de la GnRH acetato de triptorelina (Decapeptyl[®]) a una dosis única de 0,2 mg.

Se seleccionó una pauta de inducción de la ovulación con análogo agonista de la GnRH en vez de hCG en base a las evidencias reportadas en cuanto a la preservación de la viabilidad de las células de la granulosa (Engmann et al., 2011), del incremento en el recuento de los ovocitos en estadio maduro MII recuperados (Humaidan et al., 2005) y evitar cambios en la expresión génica inducidos por la hCG (Borgbo et al., 2013).

Soporte de la fase lútea

El apoyo de la fase lútea se realizó mediante la administración subcutánea de 1500 UI de hCG (Ovitrelle[®]) en el día de la punción folicular que se prolongó en combinación con la administración de comprimidos de progesterona natural micronizada (Progeffik[®]) por vía vaginal a dosis de 400 mg/día durante 10 días, iniciada desde el día de la transferencia embrionaria.

4.4.- Estrategias de preparación folicular ensayadas durante la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada

La sincronización del crecimiento folicular para la mejora del rendimiento ovárico de las pacientes bajas respondedoras confirmadas, se llevó a cabo mediante la manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada convencional a través de la administración de andrógenos, estrógenos y ACOs combinados con estrógenos.

Los tres pretratamientos foliculares ensayados, constituyen la fase II del estudio quedan detalladamente descritos a continuación.

4.4.1.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante la administración de testosterona transdérmica

Las 22 pacientes confirmadas como bajas respondedoras asignadas al pretratamiento folicular con andrógenos, recibieron testosterona transdérmica durante 7 días. La suplementación se inició en el día 24 de la fase lútea del ciclo precedente y se mantuvo hasta el día 2 del ciclo de estimulación de los ovarios. La administración se realizó mediante parches transdérmicos de testosterona de 2,4 mg/día (Testopatch®). En base a la bibliografía publicada, la dosis adecuada de administración de testosterona transdérmica en parches es de 20 µg/Kg/día (Balasch et al., 2006; Fabregues et al., 2009) con una cinética de absorción de 0,1 mg/h (Mazer, 2000), por lo que la dosis fue modificable según la duración de aplicación del parche. Las pacientes se aplicaron diariamente el parche transdérmico a las 21.00 horas y se lo retiraron por la mañana del día siguiente a la hora indicada, calculada en función del peso de la paciente, para alcanzar la dosis adecuada.

El día posterior a la última administración del parche transdérmico de testosterona, se inició la estimulación ovárica con idéntico protocolo de administración de FSHr a dosis fijas e inhibición hipofisaria con antagonista de GnRH al descrito en la fase I (*Figura 8*).

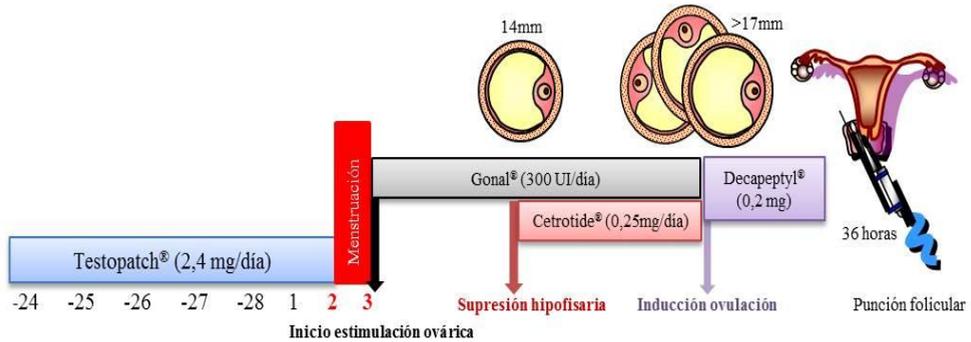


Figura 8.- Esquema de la estimulación ovárica pautada en las pacientes bajas respondedoras asignadas a la estrategia de preparación folicular mediante la administración de testosterona transdérmica en parches durante la fase lútea previa.

4.4.2.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante la administración de 17β -E₂ micronizado transdérmico

Las 24 pacientes con baja respuesta ovárica confirmada aleatorizadas a la preparación folicular con estrógenos, recibieron un aporte de 17β -E₂ micronizado transdérmico durante 11 días. La suplementación se inició en el día 20 del ciclo precedente y se mantuvo hasta el día 2 del ciclo de estimulación ovárica controlada.

Se administraron dos parches transdérmicos de 17β -E₂ micronizado (Alcis 100[®]) a dosis de 200 µg/día. Específicamente, se colocaron dos parches transdérmicos a las 21.00 horas del día 20, retirándose cada 4 días para sustituirlos por otros dos nuevos parches hasta las 21.00 horas del día 2 del ciclo de estimulación.

Mencionar que los estudios publicados informan de la administración oral de 17β -E₂ micronizado a dosis de 4mg/día, desde el día 20 de la fase lútea previa hasta el día 2 del ciclo de estimulación (Fanchin et al., 2003b; Fanchin et al., 2003c; Fanchin et al., 2005a; Fanchin et al., 2005b; Frattarelli et al., 2008b). En España, la presentación farmacéutica disponible de 17β -E₂ micronizado oral es en cápsulas de 1 mg; así que, con el propósito de

facilitar el cumplimiento del tratamiento farmacológico y evitar la administración diaria de 4 cápsulas, se pautó 17β -E₂ micronizado en forma de valerato.

En el día 3 se inició la estimulación ovárica con idéntico protocolo de FSHr a dosis fijas y análogo antagonista de GnRH al descrito en la fase I (*Figura 9*).

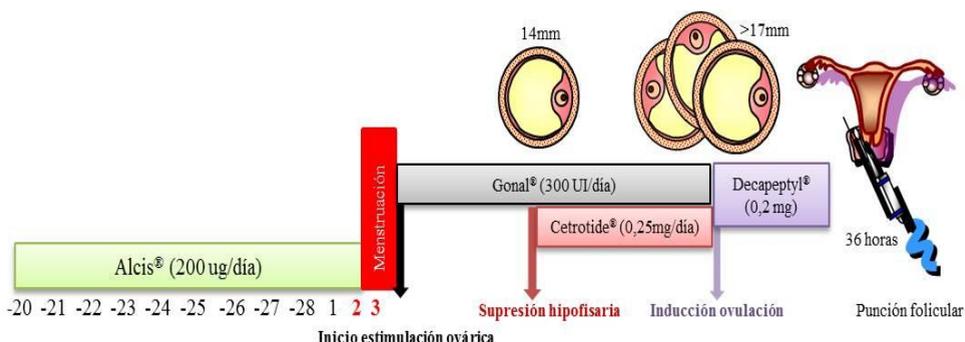


Figura 9.- Esquema de la estimulación ovárica pautada en las pacientes bajas respondedoras asignadas a la estrategia de preparación folicular mediante la suplementación de 17β -E₂ micronizado transdérmico durante la fase lútea previa.

4.4.3.- Manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante la administración de ACOs conjugados con valerato de E₂

Las 20 pacientes con baja respuesta ovárica confirmada asignadas a la preparación folicular de ACOs conjugados con estrógenos, iniciaron el tratamiento farmacológico dos ciclos anteriores al ciclo de estimulación, en base a la pauta terapéutica descrita por Teramoto y colaboradores (Teramoto and Kato, 2007).

En primer lugar en el día 15 del ciclo ovárico se comprobó la ovulación de la paciente mediante una prueba ecográfica y determinación hormonal de E₂ para iniciar la administración diaria de ACOs, en concreto 30 µg de etinil-estradiol y 150 µg de desogestrel (Microdiol®) durante 14 días. A los seis días, después de haber menstruado, se inició la suplementación oral de valerato de E₂ (Meriestra®) a una dosis de 4 mg/día

mediante la administración diaria de dos comprimidos que se mantuvo durante 10 días. El día de la última administración de valerato de E₂ coincidió con el día 12 del ciclo precedente al ciclo de la estimulación ovárica controlada. A continuación se pautó nuevamente ACOs (Microdiol[®]) durante 14 días, coincidiendo la última toma con el día 25 del ciclo previo al de la estimulación ovárica convencional.

La estimulación de los ovarios se inició en el día 3 con idéntica pauta de FSHr a dosis fijas e inhibición hipofisaria con análogo antagonista de GnRH detallada en la fase I (**Figura 10**).

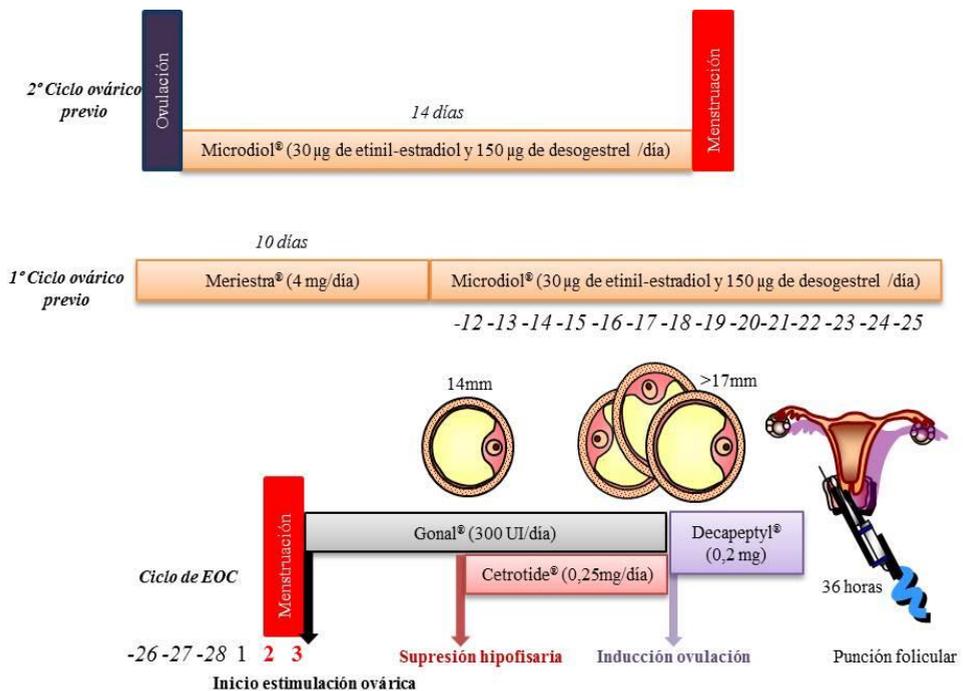


Figura 10.- Esquema de la estimulación ovárica pautada en las pacientes bajas respondedoras aleatorizadas en la estrategia de preparación folicular mediante la administración de ACOs conjugados con valerato de E₂ durante la fase lútea previa.

4.5.- Evaluación de la respuesta ovárica de la población de estudio atendiendo a criterios clínicos y biológicos

El rendimiento ovárico de cada una de las pacientes bajas respondedoras obtenido en la fase I y fase II de estudio, comprendió de un abordaje clínico y biológico de la respuesta ovárica, según se describe detalladamente a continuación.

4.5.1- Criterios clínicos para la evaluación de la respuesta ovárica

El estudio clínico de cada paciente comprendió el seguimiento del desarrollo folicular, realizado mediante prueba ecográfica transvaginal y determinación sérica de los niveles hormonales circulantes. En relación al seguimiento ecográfico, en condiciones basales se realizó un RFA de ambos ovarios; mientras que en el día de la inducción de la ovulación, se contabilizó ecográficamente el número de folículos < 10 mm de diámetro, los folículos con un tamaño comprendido entre 10-13 mm, 14-15 mm y \geq 16 mm de diámetro mayor.

El análisis clínico de la respuesta folicular y ovárica abarcó la cantidad de folículos puncionados, el número total de ovocitos recuperados, el recuento de ovocitos obtenidos en estadio maduro MII y en estadio inmaduro MI y VG; así como el recuento de ovocitos fecundados. En tanto que el resultado embriológico del ciclo de estimulación se valoró fundamentalmente por la calidad embrionaria de los preembriones transferidos.

Finalmente, el resultado clínico del ciclo de estimulación ovárica controlada se valoró en función de las tasas clínicas de resultado convencionales.

De entre todos los parámetros clínicos analizados para la evaluación de la respuesta ovárica de cada una de las pacientes incluidas, se profundizó específicamente en los siguientes:

- Valores séricos hormonales circulantes en el día de inicio de la estimulación ovárica (FSH, DHEA-S, A₄, T y E₂), y de la inducción de la ovulación (LH, A₄, T, E₂ y P₄).

- RFA en condición basal y número de folículos preovulatorios y totales reclutados.
- Recuento de folículos puncionados, de ovocitos totales y en estadio maduro MII recuperados el día de la punción folicular.
- Calidad de los preembriones transferidos.
- Tasa de gestación por ciclo iniciado y de implantación.

Para ello, dichos parámetros clínicos se analizaron según se detalla a continuación.

4.5.1.1.- Determinaciones séricas analíticas

Las determinaciones séricas hormonales de FSH, LH, E₂, P₄, T, A₄ y DHEA-S se realizaron según la práctica clínica habitual en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia.

4.5.1.2.- Evaluación del grado madurativo ovocitario, de la fecundación y de la calidad embrionaria

Se evaluó la morfología de los ovocitos y se catalogó el estadio de madurez nuclear ovocitaria de acuerdo a los criterios de Veeck (Veeck, 1986).

La fecundación se comprobó a las 14-16 horas después de la microinyección de los ovocitos MII maduros; considerándose fecundación correcta cuando los cigotos tenían 2 pronúcleos en el citoplasma y 2 corpúsculos polares en el espacio perivitelino.

La evaluación de la morfología embrionaria se realizó en el segundo y tercer día de desarrollo embrionario en base a la catalogación embrionaria habitualmente considerada en el Laboratorio de FIV, fundamentada en la originalmente descrita por Veeck (Veeck, 1986).

La puntuación morfológica asignada a cada uno de los preembriones se extrapoló a los criterios de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos establecidos por la Asociación Española para el estudio de la Biología Reproductiva en el año 2007 (Ardoy and Calderón, 2008; ALPHA Scientists In Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011).

4.5.1.3.- Resultado clínico del ciclo de estimulación ovárica controlada

Se diagnosticó la gestación mediante la determinación del nivel sérico de β -hCG dos semanas después de la transferencia embrionaria, en el caso de que la menstruación no se hubiese producido. Se consideró gestación clínica cuando se visualizó al menos un saco gestacional intraútero con latido cardiaco por ultrasonografía al mes de la determinación positiva de β -hCG. La tasa de gestación por ciclo iniciado se calculó en función del porcentaje del número de gestaciones entre el número de ciclos en los que se administraron gonadotropinas. En tanto que la tasa de implantación se computó en base al porcentaje de la cantidad de sacos gestacionales intraútero visualizados entre el número de embriones transferidos.

4.5.2.- Criterios biológicos para el estudio de la respuesta ovárica

Se contrastó si la posible mejora del rendimiento ovárico, en respuesta a la preparación de los folículos en crecimiento, podía ser debida a plausibles o significativas variaciones de determinados parámetros biológicos, tales como los receptores celulares y enzimas implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica, así como los niveles hormonales en el líquido folicular. Estos parámetros biológicos podrían constituirse como marcadores susceptibles de estar asociados con la respuesta y sensibilidad ovárica, concretamente:

- Cantidad en porcentaje de células de la granulosa luteinizadas putativas que expresan FSHR y AR, e intensidad media de fluorescencia emitida por éstos.
- Nivel de expresión génica relativa de *FSHR*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* en las células del cumulus circundantes a los ovocitos en estadio maduro MII recuperados.
- Concentración de FSH, LH y de las hormonas esteroideas A_4 , P_4 , T y E_2 en el líquido folicular.

El abordaje del análisis de los marcadores biológicos que pudieran estar potencialmente asociados con la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras, requirió de un conjunto de procedimientos analíticos del líquido folicular y de las células foliculares para la cuantificación hormonal, de los receptores y de expresión relativa génica, cuya ejecución constituye el cuerpo principal del presente trabajo. Las técnicas necesarias para llevarlo a cabo se describen detalladamente a continuación.

4.6.- Metodología para el análisis de los parámetros biológicos determinados en la Tesis Doctoral

4.6.1.- Obtención del líquido folicular procedente del aspirado folicular

A las 36 horas de la inducción de la ovulación se produjo la intervención quirúrgica de la aspiración punción folicular transvaginal ecoguiada. En dicha intervención fueron sistemáticamente puncionados y aspirados todos los folículos ecográficamente visibles de un tamaño ≥ 14 mm de diámetro, mediante una aguja de aspiración acoplada a una sonda transvaginal de 6.5 MHz.

Los líquidos foliculares aspirados de cada paciente fueron trasladados al laboratorio de FIV adyacente al quirófano, contenidos en tubos estériles de aspiración (BD FalconTM) atemperados a 36°C en bloques térmicos. En cabina de flujo laminar (IVF Workstation L126 Dual, K Systems) con superficie calefactada a 39°C y bajo estrictas condiciones de asepsia, se procedió al aislamiento del líquido folicular, al preaislamiento de las células de la granulosa luteinizadas contenidas en él, y a la identificación y recuperación de los COC presentes en dichos líquidos foliculares.

Para la ejecución de este triple proceso, el líquido folicular contenido en cada tubo estéril de aspiración, se vertió sobre placas Petri (Soria Genlab, S.A) previamente atemperadas. Se realizó una inspección directa bajo el estereomicroscopio binocular (Nikon SMZ 800) para la identificación y recuperación de los COC en una primera placa (BD

Falcon™) de lavado atemperada, constituida de medio tamponado (*Flushing Medium*, Medicult®).

Posteriormente, los COC se transfirieron a una segunda placa de lavado atemperada, para la eliminación del material oscuro de los COC y restos hemáticos. A continuación, los COC recuperados se dispusieron individualizados en cada una de las macrogotas de medio de cultivo (*Universal IVF Medium*, Medicult®) en la placa (BD Falcon™) de cultivo recubierta de aceite mineral (*Ovoil™*, Vitrolife®) y se mantuvieron en incubador bajo condiciones especiales de temperatura a 37°C y concentración de CO₂ al 5%.

4.6.2.- Preaislamiento de las células de la granulosa luteinizadas putativas presentes en el líquido folicular

La contaminación de los líquidos foliculares aspirados con sangre periférica es debida a que durante la aspiración folicular se atraviesan estructuras altamente vascularizadas, como las paredes uterinas y las membranas ováricas. Para minimizar el efecto nocivo que ejercen las células contaminantes sobre el líquido folicular, y evitar cualquier interferencia en los parámetros determinados en el estudio, se hizo necesario eliminar o segregar del análisis dichas células contaminantes. No se ha descrito hasta la fecha ningún marcador específico de células de la granulosa que permita su discriminación positiva. No así en las células contaminantes presentes en el líquido folicular, como las células hematopoyéticas nucleadas, que expresan CD45 y pueden ser identificadas como tal. Del mismo modo, las células no nucleadas como los eritrocitos, pueden ser deplecionadas del medio mediante procesos físicos, por lo que éstos fueron utilizados en el preaislamiento de las potenciales células de la granulosa luteinizadas.

El primer paso para la depleción celular hemática requirió de una centrifugación de los líquidos foliculares sobre un gradiente de densidad discontinuo. Para ello los líquidos foliculares se repartieron equitativamente volumen/volumen (v/v) en tubos Falcon cónico estériles de 15 ml (BD Falcon™) previa adición de Hystopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) atemperado y se centrifugaron a 700g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El medio de separación utilizado contiene una mezcla de varios componentes que forman una

solución de baja viscosidad y alta densidad (1,077 g/mL); permitiendo el aglutinamiento de los eritrocitos y la separación, por diferencias de densidad, de las células mononucleares; entre las que se localizan las potenciales células de la granulosa luteinizadas.

Una vez finalizada la centrifugación, se recuperaron 3 mL de la fracción superior correspondiente al líquido folicular, en 3 criotubos estériles libres de RNasa (Nunc™ Cryotubes™) y se conservaron a -20°C hasta su posterior uso para las determinaciones hormonales en líquido folicular.

El halo celular de la interfase constituido por células mononucleares, y entre ellas, las putativas células de la granulosa luteinizadas, se recuperaron y se resuspendieron (v/v) en tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich). La suspensión celular se disoció mediante disgregación mecánica y se determinó el recuento celular total en el hemocitómetro o cámara de Neubauer y la viabilidad celular mediante tinción con el colorante vital Trypan Blue (Sigma-Aldrich).

4.6.3.- Cuantificación de las células potenciales de la granulosa luteinizadas mediante la detección de FSHR y AR con la técnica de citometría de flujo

La identificación de las potenciales células de la granulosa luteinizadas de entre la subpoblación celular preaislada de los líquidos foliculares recuperados de cada paciente, se realizó mediante la confirmación de la ausencia de CD45 en éstas por citometría de flujo. Como se ha mencionado anteriormente, las células positivas para el marcador pan-leucocitario CD45 son de origen hematopoyético; y junto a éstas, es plausible la existencia en el líquido folicular de otras células contaminantes. La presencia de células endoteliales, epiteliales o de tejido conectivo en el líquido folicular aspirado es sumamente reducido (<1%), por lo que es aceptable considerar que su contribución contaminante sea prácticamente nula. En cualquier caso, ante la imposibilidad de asegurar una pureza celular de interés del 100%, se ha empleado el término de “células putativas de la granulosa luteinizadas” a lo largo del presente estudio para reflejar este hecho.

Una vez identificadas las células putativas de la granulosa luteinizadas, se procedió a la detección en éstas de la presencia de FSHR y AR, así como la intensidad media de fluorescencia emitida, mediante la técnica de citometría de flujo.

Fundamento teórico

La citometría de flujo es una técnica analítica celular, que permite la medición simultánea de múltiples características físicas y químicas de partículas individualizadas en suspensión celular, mediante el empleo de anticuerpos (Ac) específicos que reconocen proteínas concretas para cada tipo celular. Ello permite además tanto la identificación de la población celular de estudio, como la cuantificación de los receptores específicos de interés presentes en dicha población celular.

El fundamento teórico de la citometría de flujo se basa en la medición de la emisión de múltiples fluorescencias y de la dispersión de luz policromada, cuando un haz de luz monocromática incide a elevada velocidad sobre las partículas biológicas individualizadas existentes en la suspensión celular, a las que se las hace discurrir a alta velocidad a través de un sistema de flujo laminar (***Figura 11***).

La citometría de flujo *per se* proporciona información de las propiedades físico-químicas de las células de estudio, concretamente, del tamaño, volumen, densidad, granulosidad o complejidad celular interna, contenido de ácidos nucleicos, etc. Sin embargo, con el propósito de obtener una mayor informatividad celular, las partículas biológicas individualizadas de la suspensión celular se pueden conjugar con fluorocromos. Estos marcadores fluorescentes generalmente están conjugados al Ac específico que reconoce la molécula de estudio. Cuando el haz de luz incide en el fluorocromo, éste se excita emitiendo una intensidad de fluorescencia, extrapolable a la cantidad relativa de la molécula de interés. De entre los diferentes marcadores fluorescentes que existen cabe destacar aquéllos de especificidad estructural que se unen covalentemente a moléculas biológicas, como la ficoeritrina (PE), o los que se conjugan a los ácidos nucleicos, como el yoduro de propidio (IP).

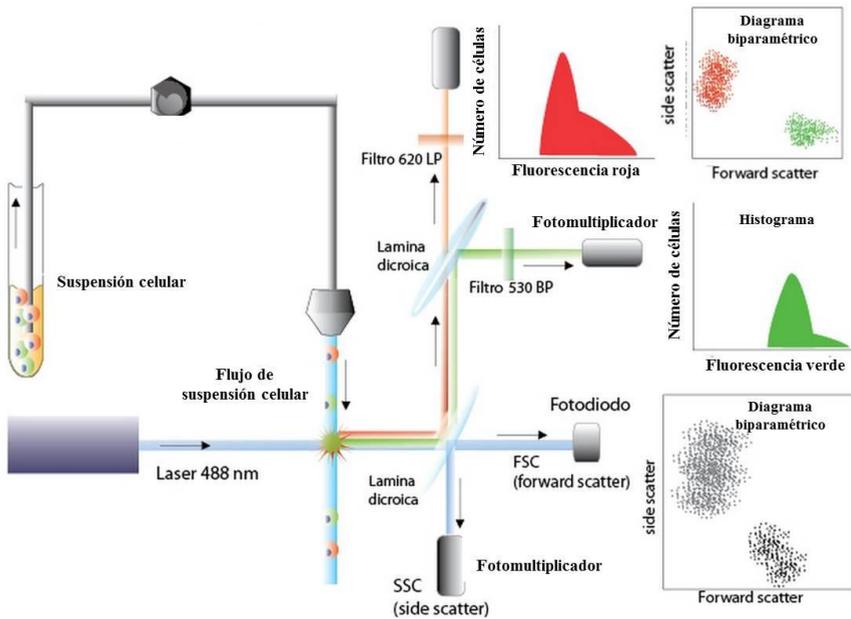


Figura 11.- Diagrama representativo de la medición de la dispersión de luz policromada producida por los fluorocromos conjugados en la suspensión celular de estudio, y de recogida de las fluorescencias emitidas. El citómetro de flujo consta de un conjunto de sistemas básicos combinados, entre los que cabe destacar el sistema óptico (filtros dicroicos y de absorción) y el sistema de detección (fotomultiplicador). Adaptado de (Storino, 2011).

La luz dispersada frontalmente en ángulo cónico de 0 a 10 grados, se denomina *Forward Scatter* (FSC) y es proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión, por lo que se relaciona con el tamaño relativo celular. En cuanto a la luz dispersada a 90 grados del eje del haz lumínico incidente, se refiere *Side Scatter* (SSC) y se relaciona con la granularidad relativa y la complejidad citoplasmática celular; mientras que la luz policromada ocasionada por los fluorocromos, es recogida por los canales de fluorescencia (FL).

Metodología aplicada para la cuantificación celular en base a la detección de FSHR y AR

El protocolo para la identificación de las células potenciales de la granulosa luteinizadas de entre la población de células mononucleares recuperadas, combinó la selección fenotípica de las células negativas para el marcador pan-leucocitario CD45, con la presencia de los receptores celulares FSHR y AR. Para ello se ejecutó del siguiente modo:

A) Fijación de la suspensión celular

Las células recuperadas de la interfase tras la centrifugación mediante gradiente de densidad discontinuo, se fijaron (v/v) con paraformaldehído al 4% (BDH Prolabo) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este paso de fijación se hizo preciso para preservar la suspensión celular hasta el momento de ser analizada en el citómetro de flujo. Debido a que la fijación puede aumentar las uniones no específicas de los Ac, disminuir la antigenicidad y reducir la unión del Ac, previamente se validó la identificación de las células de interés procedentes de suspensiones celulares fijadas y frescas. Al no haber obtenido diferencias significativas, se decidió realizar este paso de fijación previo al marcaje con los Ac específicos.

Tras el período de incubación, la suspensión celular fijada se lavó mediante centrifugación a 900g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el pellet celular obtenido se resuspendió en 1 mL de solución de bloqueo constituido por PBS suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) (Roche Diagnostics) al 3% (p/v). Dicha solución de bloqueo evita que se produzcan uniones inespecíficas de los Acs. Finalizada la centrifugación, la suspensión celular se mantuvo a 4°C hasta su posterior procesamiento para el análisis por citometría de flujo de la subpoblación celular de interés.

B) Marcaje celular con los Ac específicos de los receptores de estudio

El análisis conjunto de la citometría de flujo pretendía identificar las células negativas para el marcador pan-leucocitario CD45 y detectar en éstas la presencia de los

receptores celulares FSHR y AR, además de cuantificar la expresión de éstos en dichas células CD45⁻.

Para ello, las células putativas de la granulosa luteinizadas preaisladas de los líquidos foliculares recuperados de cada paciente, se repartieron en 4 alícuotas:

- 1) Una alícuota se utilizó como control negativo, sin añadir ningún Ac a la suspensión celular.
- 2) En una segunda alícuota se añadió un Ac primario policlonal no conjugado específico del receptor humano de la FSH (FSHR H-190, Santa Cruz Biotechnology), para la detección de las células de la granulosa positivas para FSHR. Y se adicionó el antígeno pan-leucocitario CD45 conjugado con el fluorocromo ficoeritrina-cianina 7, para la identificación de las células CD45⁻.
- 3) En una tercera alícuota se adicionó un Ac primario monoclonal no conjugado específico del receptor humano de andrógenos (AR, Abcam), para la detección de las células de la granulosa positivas para AR. Además se añadió el marcador pan-leucocitario CD45 conjugado con ficoeritrina-cianina para la identificación de las células CD45⁻.
- 4) La cuarta alícuota correspondió al control isotipo, en la que se añadió un Ac monoclonal MsIgG1 conjugado con fluorocromo ficoeritrina-cianina 7, para determinar la inespecificidad de las uniones celulares. Del mismo modo que en el resto de alícuotas, se adicionó el marcador de células hematopoyéticas, para la identificación de las células CD45⁻.

Las suspensiones celulares de la alícuota 2 y 3, se les añadió los respectivos Ac primarios no conjugados FSHR y AR a una dilución 1:10 y 1:60, respectivamente durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras el período de incubación, las suspensiones celulares se lavaron con 1 mL de solución de bloqueo PBS-BSA 3% (p/v) mediante centrifugación a 600g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al pellet celular obtenido de cada una de estas dos suspensiones se le añadió el Ac secundario conjugado Alexa Fluor 488 IgG (Invitrogen) a una dilución

1:300, el marcador pan-leucocitario CD45 ligado al fluorocromo ficoeritrina-cianina 7, CD45-PC7 (Beckman Coulter) a una dilución 1:20, y el agente intercalante IP a una concentración 5 µg/mL (Sigma-Aldrich) para la discriminación plaquetaria e identificación de las células nucleadas.

Posteriormente, ambas suspensiones celulares se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, para evitar la pérdida de la actividad de los fluorocromos debida a su excitación por la incidencia lumínica. Tras el período de incubación, las suspensiones celulares se lavaron con 1 mL de solución de bloqueo PBS-BSA 3% (p/v) mediante centrifugación a 600g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 500 µL de PBS.

En cuanto a la alícuota 4, a la suspensión celular se le añadió el Ac monoclonal conjugado MsIgG1-PC7 (Beckman Coulter) a una dilución 1:20, el Ac secundario conjugado Alexa Fluor 488 IgG (Invitrogen) a una dilución 1:300 y el agente intercalante IP a una concentración de 5 µg/mL (Sigma-Aldrich). La suspensión celular se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se lavó con 1 mL de tampón de bloqueo PBS-BSA 3% (p/v) mediante centrifugación a 600g durante 5 minutos a temperatura ambiente, resuspendiendo el pellet celular obtenido se resuspendió en 500 µL de PBS.

C) Recolección de la señal y de la fluorescencia emitida

Las cuatro alícuotas en las que se repartió la suspensión celular aislada de cada paciente, se analizaron en el citómetro de flujo GALLIOS™ *Flow Cytometer* (Beckman-Coulter, CA, USA). Este citómetro de flujo analiza simultáneamente los parámetros físicos FSC y SSC y detecta 10 fluorescencias mediante tres láseres (azul-488nm, rojo-638 nm y violeta-405 nm). Concretamente, la excitación se llevó a cabo con el láser de ión argón que excita a 488 nm, y se trabajó a 22 mW de potencia.

El citómetro de flujo se ajustó para recolectar las señales de FSC y SSC en escala lineal y las fluorescencias emitidas, en escala logarítmica. De manera detallada, se establecieron los siguientes ajustes en el citómetro de flujo:

- Señal de dispersión frontal de luz láser (FSC), como medida del tamaño celular.
- Señal de dispersión lateral de luz láser (SSC), como parámetro de la granularidad y complejidad celular.
- Emisión de fluorescencia verde a 520 nm para detectar las células positivas para los Ac de FSHR y AR, conjugados con el Ac secundario Alexa Fluor 488. La fluorescencia emitida se recogió en el canal 1 de fluorescencia y se amplificó logarítmicamente (parámetro FL1Log).
- Emisión de fluorescencia rojo a 630 nm para detectar el IP. La fluorescencia emitida se recolectó en el canal 3 de fluorescencia y se amplificó en escala logarítmica (parámetro FL3Log).
- Emisión de fluorescencia rojo lejano a 767 nm para detectar la unión de CD45-PC7. La fluorescencia emitida se recogió en el canal 5 de fluorescencia y se amplificó logarítmicamente (parámetro FL5Log).

El sistema óptico del citómetro de flujo GALLIOS™ *Flow Cytometer* consistió en un filtro dicróico de paso corto de 550 nm más un filtro de paso de banda de 525 ± 40 nm, para la detección de Alexa Fluor 488. En la detección del IP se utilizó un filtro dicróico de paso corto de 655 nm más un filtro de paso de banda de 620 ± 30 nm; mientras que para la detección del fluorocromo PC7 se empleó un filtro que recoge la luz reflejada por el filtro de paso corto de 730 nm en un filtro de pase largo de 755 nm.

D) Adquisición de las células de interés FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ y AR⁺/CD45⁻/IP⁺

El protocolo establecido para la adquisición de las células de interés no leucocitarias (células putativas de la granulosa) y positivas para FSHR y AR, fue el siguiente:

1. Gráfico de puntos o escatergrama biparamétrico de FSC frente a SSC en escala lineal, sin acotar ninguna región. Permite la visualización de subpoblaciones celulares en función de su tamaño y complejidad citoplasmática celular (*Figuras 12 y 13 A*).

2. Gráfico de puntos biparamétrico de FL5 en escala logarítmica (detección de CD45-PC7) frente a SSC lineal, en el que se seleccionó una región negativa para CD45 denominada región “A”, y con ello se discriminaron las células leucocitarias (*Figuras 12 y 13 B*).
3. Gráfico de puntos biparamétrico sobre la región negativa para CD45, de FL3 en escala logarítmica (detección de IP) frente a SSC lineal, en la cual se seleccionaron las células positivas para IP definiendo una región “B”, y con ello se discriminaron las plaquetas (*Figuras 12 y 13 C*).
4. Gráfico de puntos biparamétrico de FL5 en escala logarítmica (detección de CD45-PC7) frente al parámetro FL1 en escala logarítmica (detección de Alexa Fluor 488), que permite la visualización de las células de interés (*Figuras 12 y 13 D*).
5. Histograma sobre la región negativa para CD45 y positiva para IP del parámetro FL1 en escala logarítmica (detección de Alexa Fluor 488), que recopila la emisión de fluorescencia de los receptores de estudio conjugados con Alexa Fluor 488, en una región “C” (*Figuras 12 y 13 E*).

E) Análisis e interpretación de los datos obtenidos

Se procesaron 20.000 eventos de cada una de las cuatro alícuotas procesadas, utilizando el programa CXP System (Beckman Coulter). La subpoblación de estudio se cuantificó en base al porcentaje de células identificadas para los marcadores de estudio; es decir, células putativas de la granulosa luteinizadas $FSHR^+/CD45^-/IP^+$ y células potenciales de la granulosa luteinizadas $AR^+/CD45^-/IP^+$; además de la intensidad media de fluorescencia emitida por los receptores de estudio presentes en dichas células.

El parámetro del porcentaje celular se calculó en base al número de eventos acotados sobre la región “C”, respecto al total de eventos analizados. El parámetro de la intensidad media de fluorescencia, se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia (Garrido et al., 2002) y proporcionó información de la intensidad con la que las células de interés expresaron cada marcador de estudio.

Las *Figuras 12 y 13* muestran imágenes ilustrativas de ejemplo de los gráficos de puntos biparamétricos e histogramas obtenidos en la cuantificación de las células de interés positivas para cada uno de los receptores celulares de estudio en una paciente normo-respondedora, según el protocolo descrito anteriormente.

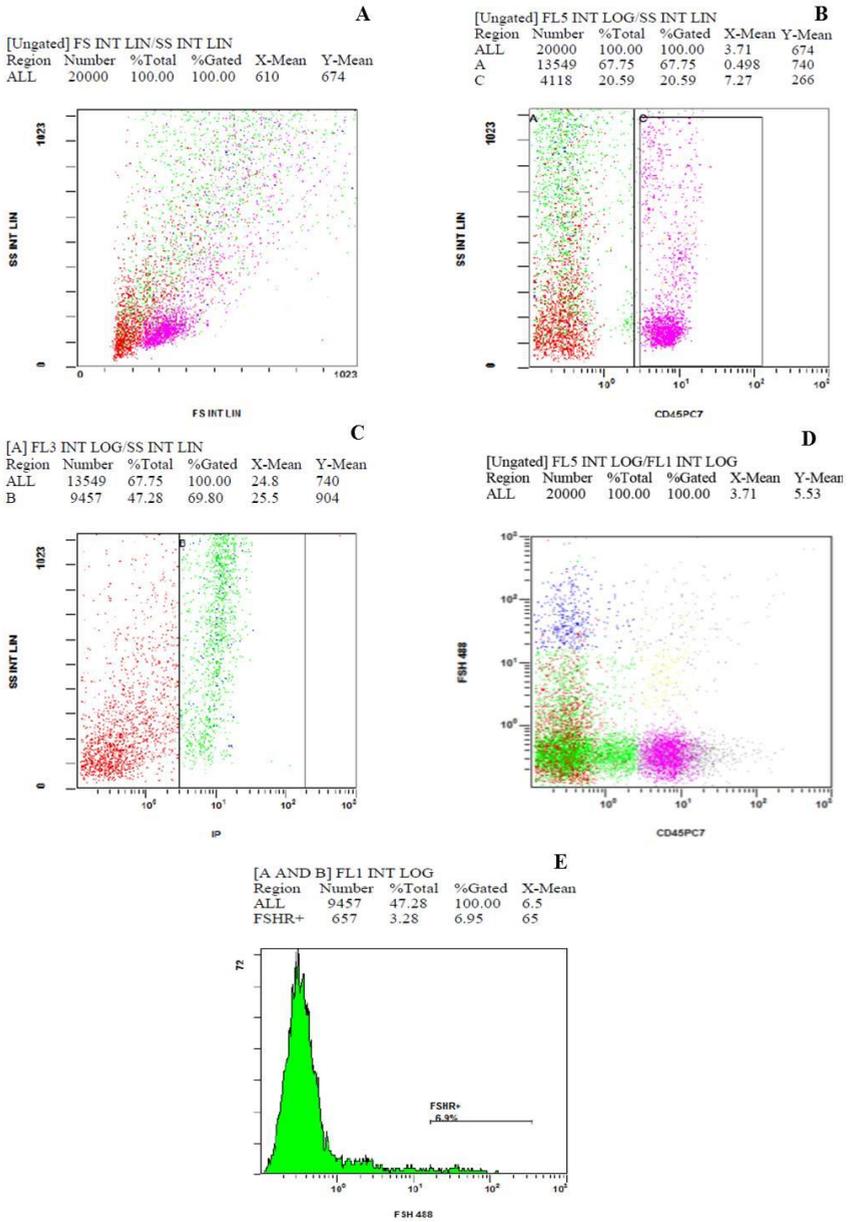


Figura 12.- Diagramas de puntos biparamétricos e histograma obtenidos tras el procesamiento de una suspensión celular de una paciente normo-

respondedora para la detección de las células de interés CD45⁺/IP⁺ positivas para FSHR.

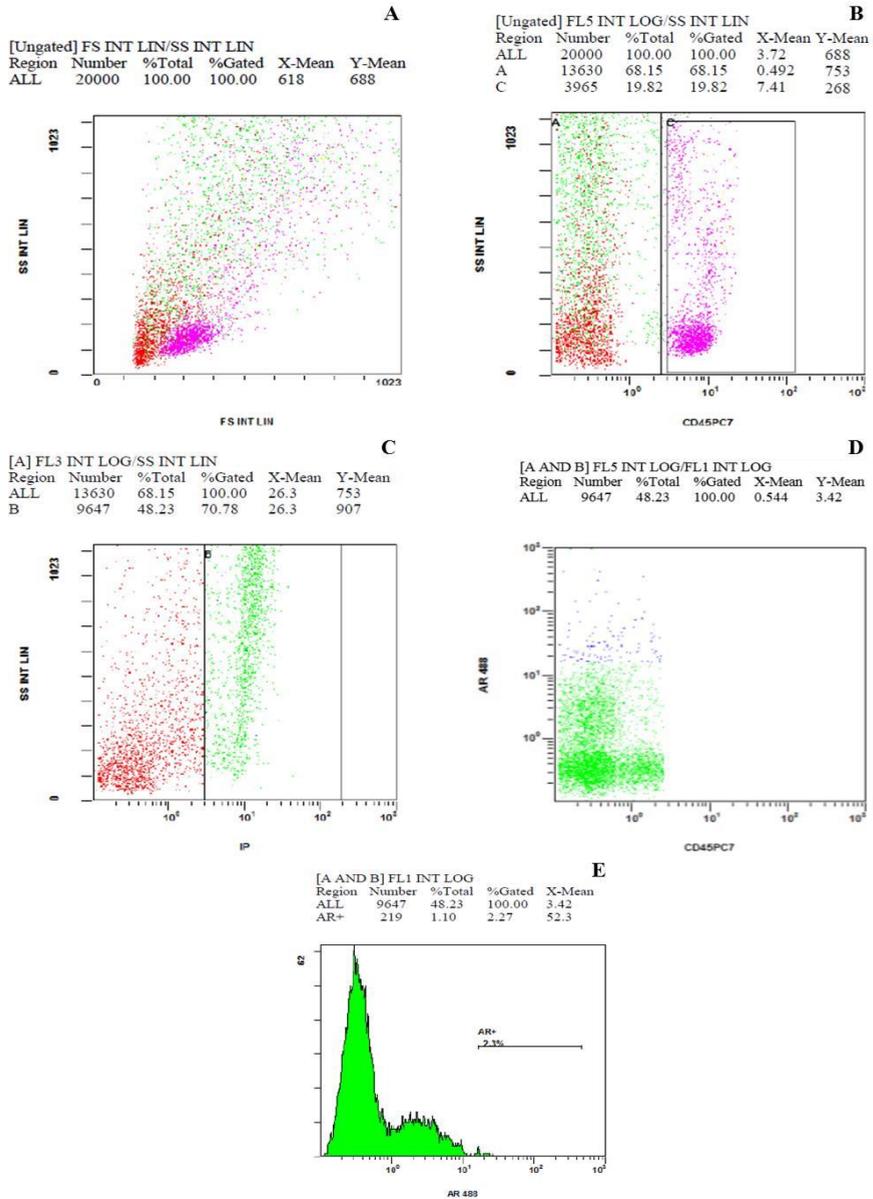


Figura 13.- Diagramas de puntos biparamétricos e histograma resultantes tras el procesamiento de una suspensión celular procedente de

la misma paciente normo-respondedor, en el análisis cuantitativo de las células de interés positivas para AR.

4.6.4.- Obtención de las células del cumulus de los COC recuperados

Las células foliculares circundantes al ovocito se relacionan intrínsecamente con éste durante su proceso de maduración nuclear y citoplasmático, interfiriendo con el oolema ovocitario para el transporte de nutrientes y estableciendo interacciones citoplasmáticas; mientras que el ovocito ejerce un efecto paracrino sobre la capacidad de las células del cumulus de expansión o mucificación. Dada la íntima asociación de las células del cumulus con el ovocito, se pretendió cuantificar los niveles de expresión relativa de los genes codificantes de los principales receptores y enzimas implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica, en dichas células foliculares.

La técnica por la que los ovocitos son liberados de las células del cumulus se denomina decumulación, y se hace necesaria cuando la TRA de elección es la inyección intracitoplasmática de un único espermatozoide (ICSI). A su vez, para no interferir con la culminación del proceso ovocitario madurativo se hace preciso esperar 2-4 horas después de la punción aspiración folicular.

En condiciones de asepsia y transcurrido el tiempo de espera necesario, se realizó una disgregación mecánica individualizada de cada uno de los COC con ayuda de dos agujas acopladas a jeringas de insulina estériles (B-D Plastipak, Becton Dickinson) bajo inspección directa en el estereomicroscopio, para el aislamiento del ovocito contenido en el interior del COC recuperado. La disgregación mecánica se completó con un suave pipeteo del COC con pipetas Pasteur (Humagen) estiradas a la llama de diferente diámetro o con capilares con grosor de entre 130-150 μm (Stripper, Mid-Atlantic Diagnostics). Posteriormente se procedió a la disgregación enzimática mediante breve sumersión en microgotas de solución de hialuronidasa de 80 UI/mL (*SynVITRO Hyalase*, Medicult®) en la placa (BD Falcon™) de decumulación, constituida también por macrogotas de medio tamponado (*Flushing Medium*, Medicult®) y recubierta de aceite mineral (*Ovoil™*, Vitrolife®) para una completa decumulación ovocitaria. Finalmente los ovocitos fueron

lavados haciéndolos pasar por las diferentes gotas de medio tamponado para la completa eliminación de restos del medio de hialuronidasa.

A diferencia de la obtención de las células putativas de la granulosa luteinizadas, la recuperación de las células del cumulus no requiere de un preaislamiento y de una identificación fenotípica en base a unas propiedades físicas celulares, debido a las características inherentes del propio proceso de aislamiento mediante disgregación mecánica. Asimismo dada su ubicación celular en el COC, en íntimo contacto con el ovocito, se hace mínima o ausente cualquier contaminación con sangre periférica; constituyendo ser una subpoblación celular pura de entre las células foliculares integrantes de los COCs.

Al finalizar la decumulación, se evaluó la morfología de los ovocitos y todas sus variables dismórficas y se catalogó el estadio de madurez nuclear ovocitaria de acuerdo a los criterios de Veeck (Veeck, 1986).

Cada ovocito en estadio madurativo MII, se transfirió a una microgota de medio de cultivo (*Universal IVF Medium*, Medicult®) de la placa (BD Falcon™) de cultivo, y se mantuvo en condiciones especiales de 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento de la ICSI; técnica de alta complejidad de elección y realizada según la práctica habitual.

Una vez conocido el grado madurativo de cada ovocito decumulado de la paciente, las células del cumulus aisladas circundantes a los ovocitos en estadio maduro MII, se recogieron para la posterior cuantificación de la expresión relativa génica de *FSH*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1*. Específicamente, las células disgregadas mecánicamente se recogieron en el mínimo volumen de cultivo (*Universal IVF Medium*, Medicult®) en un tubo estéril eppendorf de 1,5 mL libre en RNasas (Life Technologies) en condiciones de esterilidad y se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

4.6.5.- Análisis cuantitativo de la expresión relativa de los genes FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Las posibles variaciones en los niveles de expresión relativa de los genes codificantes de los principales receptores y enzimas implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica, y que por tanto pudiesen explicar una hipotética mejora del rendimiento ovárico, se analizaron en las células del cumulus recuperadas de los COCs que contenían un ovocito en estadio maduro MII.

El estudio de expresión génica relativa comprende una serie de procesos necesarios tales como la extracción de ARN de las células foliculares circundantes al ovocito, la transcripción reversa del ARN total extraído en ADN complementario (ADNc) y de la amplificación del ADNc mediante la técnica de cuantificación fluorescente a tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (QF-RT-PCR); según se describe detalladamente a continuación.

4.6.5.1.- Aislamiento de ARN de las células del cumulus

La cuantificación del ARN total extraído de una muestra dada es una aproximación analítica que se hace precisa para conocer indirectamente la concentración del material biológico disponible. La cuantificación absoluta por QF-RT-PCR requiere un compendio de técnicas estandarizadas previas que aseguren el correcto aislamiento y retro-transcripción del ARN extraído previamente.

Los procedimientos existentes para el aislamiento de ARN se fundamentan en dos métodos básicos: una extracción por adsorción en fase sólida de una membrana de sílica; o una extracción mediante agentes caotrópicos, como el tiocianato de guanidinio, que desnaturalizan el ADN, ARN y las proteínas, combinado con una separación en fase acuosa mediante saturación con fenol-cloroformo.

En nuestro caso se realizó la extracción de ARN según protocolo fundamentado en la absorción reversible de los ácidos nucleicos en fase sólida a una membrana de sílice.

Dicha membrana está contenida en el interior de una columna de filtrado y de purificación especialmente tratada en presencia de agentes caotrópicos. Para nuestros propósitos específicamente, utilizamos el kit comercial *Quick-RNATMMicroPrep* (Zymo Research) para extracción de ARN mensajero (ARNm) siguiendo protocolo que se describe detalladamente a continuación.

Las células del cumulus recuperadas se centrifugaron a 650g durante 5 minutos a temperatura ambiente para la obtención del pellet celular, el cual se resuspendió en 600 μ L de una solución de lisis denominada solución ZR. Tras agitación vigorosa durante 15 segundos, el pellet celular resuspendido se transfirió a una columna estéril contenida en el interior de un tubo colector. A continuación, se centrifugó a 12000g durante 1 minuto a temperatura ambiente, se añadieron 400 μ L de una solución de pre-lavado y se centrifugó en las condiciones anteriores. Tras la centrifugación se añadieron 700 μ L de una solución de lavado al interior de la columna y se centrifugó a 12000g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Nuevamente se adicionaron 400 μ L de la solución de lavado al interior de la columna, y se volvió a centrifugar en idénticas condiciones. El volumen residual de la solución de lavado que pudiera quedar en el interior de la columna dispuesta dentro del tubo colector, se eliminó mediante centrifugación a 12000g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la columna se transfirió al interior de un nuevo tubo estéril eppendorf de 1,5 mL libre en RNasas (Life Technologies) para la elución final del ARN. Finalmente, la solubilización del ARN se procedió mediante la adición de 15 μ L de agua estéril libre de ribonucleasas y proteasas (Qiagen), e incubación durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugación a 16870g durante 30 segundos.

4.6.5.2. - Análisis de la cantidad y calidad del ARN extraído

Finalizada la extracción del ARN total, se procedió a la cuantificación de la cantidad y calidad del mismo mediante espectrofotometría ultravioleta utilizando un espectrofotómetro NanoDropTM ND-2000 (Thermo Scientific). Se realizó una medición de la concentración total del ARN mediante la determinación de la absorbancia de luz ultravioleta a 260 nm (A_{260}), y la calidad del ARN extraído se determinó cuantitativamente

según la relación A_{260}/A_{280} . Valores comprendidos entre 1,7 y 2,2 en la relación A_{260}/A_{280} fueron indicativos de ARN extraído de óptima pureza.

Una vez cuantificado el ARN total extraído, se conservó a -80°C hasta su uso posterior.

4.6.5.3.- Transcripción reversa en ADN complementario

La degradación del ARN es un proceso biológico que sucede gradualmente debido a su inherente inestabilidad y a la acción de las RNAsas. La técnica de la transcripción reversa (RT) evita pérdidas de dicho material biológico transformando el ARN extraído en ADNc. La estabilidad e integridad de dicha molécula de ADNc confiere el mantenimiento de una correcta informatividad por lo que servirá como molde en la QF-RT-PCR.

Con este propósito, se procedió a realizar la RT mediante el kit comercial *Advantage RT-for-PCR kit* (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU), que utiliza la enzima transcriptasa reversa obtenida del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) para la síntesis del ADNc, según se detalla a continuación.

A partir de 1 μg de ARN total extraído, se añadió 1 μL de oligo-18-dT y agua con dietilpircarbonato (agua-DEPC) hasta un volumen final de 13,5 μL a cada una de las muestras. La mezcla se calentó en el termociclador (T3000 Thermocycler biometra) a 70°C durante 2 minutos para la desnaturalización de las cadenas de ARN y evitar la formación de estructuras secundarias de las mismas. Tras el calentamiento, cada muestra se enfrió en hielo y se le añadió 6,5 μL de la mezcla de reacción, constituida por 4 μL de tampón de reacción 5X, 1 μL de una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a 10 mM cada uno, 0,5 μL de inhibidor recombinante de ribonucleasa y 1 μL de la enzima transcriptasa reversa M-MLV.

Completados los 20 μL de volumen final de reacción se procedió a realizar la reacción de RT en el termociclador. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C , seguido de 5 minutos a 94°C para inactivar la transcriptasa reversa y detener la reacción de síntesis del ADNc y destruir la actividad ADNasa. El producto final fue diluido hasta un volumen final de 50 μL de agua libre de ribonucleasas (Qiagen) y las muestras de ADNc

fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis. Como control negativo, se utilizó un tubo con mezcla de reacción en ausencia de ARN.

4.6.5.4.- Cuantificación fluorescente a tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa

La cuantificación de los niveles relativos de ARN para los genes codificantes de los receptores celulares FSHR, AR y LHCGR y de las enzimas esteroideogénicas StAR, CYP11A y CYP19A1, se efectuó mediante la QF-RT-PCR.

Fundamento teórico

La PCR a tiempo real (RT-PCR) es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación del número de copias o de la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o de ARN en una muestra.

La técnica de RT-PCR combinada con la reacción de RT, permite determinar la expresión génica mediante una cuantificación relativa. Para ello se compara la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico de expresión inducible respecto a la cantidad de ARNm de un gen de expresión constitutiva, referido como control endógeno. Un gen constitutivo es aquel cuya expresión no varía en las condiciones de estudio; permitiendo normalizar la expresión del gen específico respecto a la del control endógeno. La normalización respecto a un gen de expresión constitutiva se fundamenta en que si la cantidad del gen considerado como control endógeno varía, no es consecuencia de cambios en su expresión, sino de la cantidad de RNA utilizada en la RT a ADNc.

Para la cuantificación, en cada ciclo de PCR se mide la cantidad de amplicón producido. El amplicón se denomina al fragmento a amplificar a partir de una secuencia específica de ADNc de interés. La cuantificación del producto se produce gracias a la adición de fluorocromos que se unen al amplicón a medida que se va produciendo de forma cuantitativa; de modo que siendo la cantidad de amplicón producido proporcional al número de moléculas de RNA/DNA iniciales, se pueden estimar éstas a partir de aquellas. La cuantificación del producto mediante el termociclador se fundamenta en la detección

de señales de fluorescencia que son emitidas a una determinada longitud de onda, positivas a partir de un límite de detección fijado, y directamente proporcionales a la cantidad de producto sintetizado. De este modo, cuanto mayor sea la concentración del fragmento de ADNc a amplificar, más tempranamente se alcanza el nivel de detección, correlacionándose positivamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana.

Existen dos métodos de análisis de PCR cuantitativa que se basan en técnicas de fluorescencia y difieren fundamentalmente en la metodología considerada para la detección de los productos de PCR. Dichos métodos son:

- Método específico, que utiliza sondas específicas fluorescentes que hibridan en secuencias concretas (por ejemplo: Sondas TaqMan[®]).
- Método no específico, que considera el uso de un fluorocromo intercalante, que se une al surco menor de la doble cadena del ADN para la detección de la presencia o ausencia de productos amplificados (por ejemplo: SYBR Green I[®]).

En el presente trabajo de Tesis doctoral se utilizó el método específico con sondas TaqMan[®]. Específicamente, corresponden a sondas de hidrólisis constituidas por un oligonucleótido con fluorocromos en los dos extremos. El fluorocromo localizado en el extremo 5' se le denomina reportero o donador y el existente en el extremo 3' se le refiere aceptor en función del inhibidor utilizado. De este modo, los oligonucleótidos marcados en el extremo 5' emiten fluorescencia al ser excitados y un aceptor, absorberá la fluorescencia liberada por el donador.

Los fluorocromos del extremo 5' comúnmente utilizados en RT-PCR pueden ser: 6-carboxy-fluorescein (6-FAM[™]), 2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (VIC[™]), 6-carboxi-tetrachloro-fluoresceina (TET[™]), 2,7-dimethoxy-4,5-dicloro,6-carboxi-fluoresceina (JOE[™]) y hexacloro-6-carboxi-fluoresceina (HEX[™]). El fluorocromo del extremo 3' habitualmente utilizado es el inhibidor 6-carboxi-tetrametil-rhodamina (6-TAMRA[™]).

Se utilizaron concretamente sondas TaqMan[®] marcadas en el extremo 5' por el fluorocromo donador 6-FAM[™], en el extremo 3' por el fluorocromo aceptor 6-TAMRA[™];

mientras que las reacciones se normalizaron para evitar fluctuaciones en la fluorescencia con la referencia interna 6-carboxy-X-rhodamine (ROX™).

Durante el proceso de amplificación de ADNc, la sonda TaqMan® hibrida con su cadena complementaria (**Figura 14 A**). Al desplazarse a lo largo de la cadena durante su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza de manera específica desde el extremo 5' de una cadena de ácido nucleico, provocando la liberación del reportero del extremo 5' libre de la sonda, y la consiguiente emisión de fluorescencia (**Figura 14 B y C**). La fluorescencia liberada por el fluorocromo reportero aumentará a medida que se acumulen los productos de PCR.

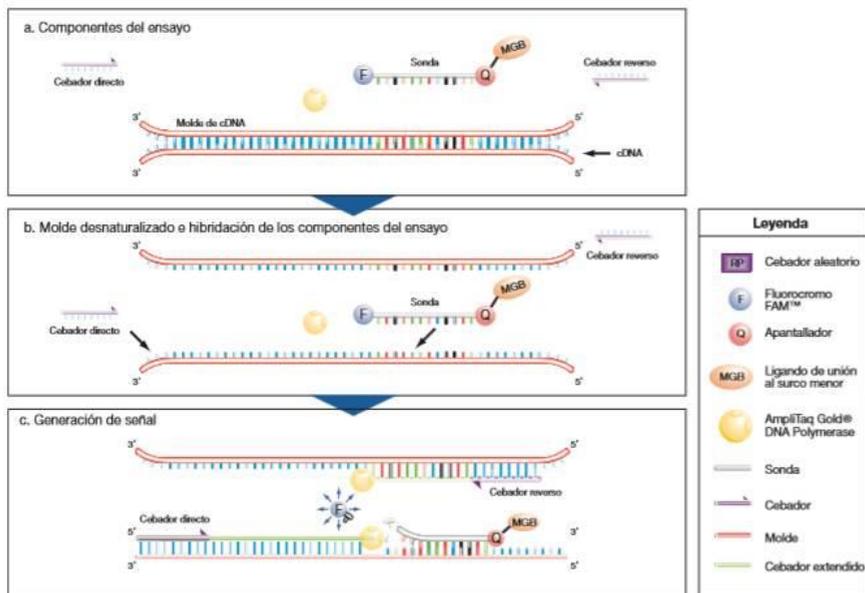


Figura 14.- Representación del proceso de amplificación del ADNc mediante sondas específicas fluorescentes TaqMan®. Adaptado de (Applied Biosystems, 2007).

La **Figura 15** representa gráficamente las fases en las que se divide el proceso de amplificación. Detalladamente, son:

- Fase geométrica o exponencial (*Geometric or exponential phase*): fase que comprende la detección temprana de la reacción de la polimerasa, en la que todos los elementos químicos de la reacción se encuentran en abundancia y la eficiencia de amplificación es constante e idéntica. En esta fase, la concentración inicial de una muestra es directamente proporcional al número de ciclos para una concentración final de muestra constante.
- Fase lineal (*Linear phase*): fase en la que los oligonucleótidos comienzan a ser factores limitantes de la amplificación y en la que la eficiencia comienza a disminuir de manera constante.
- Fase estacionaria (*Plateau phase*): fase en la que la cantidad de productos obtenidos se mantiene constante y la reacción se detiene.

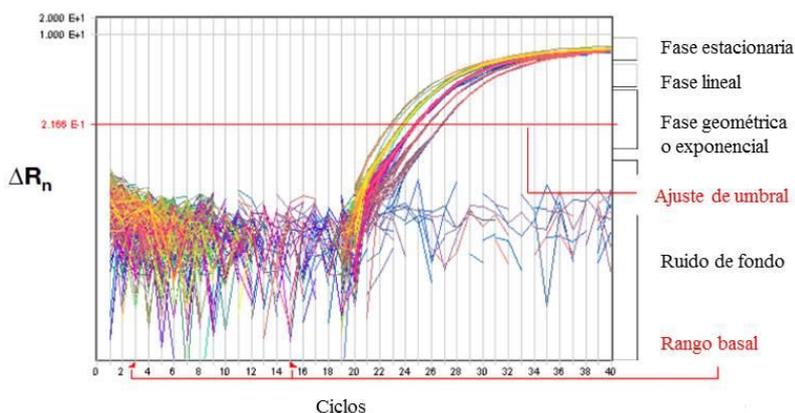


Figura 15.- Gráfica resultante del proceso de amplificación del ADNc en la que se indica las tres fases características (geométrica o exponencial, lineal y estacionaria) y el ajuste de umbral. Adaptado de (*Applied Biosystems, 2007*).

El parámetro fundamental en función del cual se realizaron los cálculos analíticos se denomina ciclo umbral (Ct). Se define Ct al ciclo de PCR a partir del cual se considera estadísticamente significativo la fluorescencia emitida por encima del nivel de detección,

establecido en función del ajuste de umbral; y se correlaciona directamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana.

Los valores Ct obtenidos en cada una de las muestras para cada uno de los genes de estudio se normalizaron con respecto a los valores Ct detectados para el gen endógeno en cada una de las muestras analizadas, definiendo el parámetro ΔCt . El 18S fue el gen endógeno de expresión constitutiva seleccionado para dicho cálculo.

El análisis independiente de los valores Ct cuantificados en la fase I del estudio, se referenciaron respecto a un control positivo, para el cálculo del parámetro $\Delta\Delta Ct$. Como control positivo se consideró un pool de células de células foliculares recuperadas de mujeres con función reproductora normal.

El análisis pareado de los valores Ct obtenidos en los dos ciclos de estimulación ovárica para cada una de las pacientes analizadas, se realizó mediante el parámetro $\Delta\Delta Ct$. Concretamente, dicho parámetro se calculó según la siguiente diferencia: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ ciclo con preparación folicular - ΔCt ciclo en ausencia de preparación folicular.

La expresión génica relativa se calculó según la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que proporciona la tasa de cambio de la expresión de los genes de estudio.

Protocolo aplicado en la realización de la QF-RT-PCR

Las reacciones de muestras fueron conformadas sobre 2 μL de ADNc total a los que se les añadió 8 μL de una mezcla de reacción, compuesta por 0,5 μL de las sondas comercializadas *Taq Man Gene Expression Assay 20X* (Applied Biosystems) para cada uno de los genes de estudio y para el gen de expresión constitutiva 18S, 5 μL de *Taq Man Gene Expression Master Mix 2X* (Applied Biosystems) y 2,5 μL de agua libre de ribonucleasas (Qiagen). La reacción del control negativo para cada uno de los genes de estudio se constituyó por 4,5 μL de agua libre de ribonucleasas, manteniendo el volumen de la correspondiente sonda y de la mezcla de reacción, en ausencia de ADNc.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un equipo ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), habiéndose programado las siguientes condiciones para la realización de la QF-RT-PCR: un precalentamiento a 50°C durante 2 minutos, requerido por la presencia de uracil DNA glicosilado existente en la mezcla de

reacción, seguido de un calentamiento a 95°C durante 10 minutos, y de la realización de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los valores C_1 se analizaron con el software RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems).

4.6.6- Determinaciones analíticas de FSH, LH, A₄, P₄, T, y E₂ en líquido folicular

Se analizaron en el líquido folicular las concentraciones de FSH, LH, A₄, P₄, T, y E₂ mediante la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), de inmunoensayo enzimático (EIA) o de EIA tipo “sándwich”, según fuese el analito a cuantificar.

Las determinaciones hormonales se realizaron en un total de 75 muestras correspondientes a los líquidos foliculares recuperados de las 14 pacientes normo-respondedoras, así como de 10 pacientes aleatorizadas en cada uno de los tres pretratamientos foliculares ensayados, y los correspondientes a su respectiva fase I, por duplicado.

Fundamento teórico

El ELISA es una prueba analítica basada en el principio de unión competitiva, cuyo principio teórico se basa en el empleo de pocillos de microtitulación conjugados con un Ac monoclonal o policlonal pre-absorbido, que reconoce el sitio antigénico de la molécula a analizar. La hormona endógena presente en la muestra analizable, compite con un complejo constituido por el conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) y el metabolito, para su unión al Ac pre-absorbido; siendo, la cantidad de conjugado de HRP unida, proporcional a la concentración del metabolito existente en la muestra analizable. Tras un período de incubación, el conjugado que no se haya unido es eliminado mediante lavados; y posteriormente se adiciona una solución de sustrato, que da lugar a una reacción coloreada, cuya intensidad de color es proporcional (inversa o directamente, según el kit comercial empleado) a la cantidad de metabolito presente en el líquido folicular. Dicha reacción

colorimétrica se cuantifica mediante espectrofotometría a una determinada longitud de onda, según la hormona de estudio.

El EIA es un inmunoensayo enzimático competitivo cuyo fundamento teórico se basa en el uso de pocillos de microtitulación preincubados con un Ac IgG monoclonal y bloqueados con proteínas específicas. La adición de un complejo constituido por un antisuero específico del metabolito y por un conjugado de la acetilcolinesterasa (AChE) combinado al metabolito, provoca su unión al Ac pre-absorbido. Tras un período de incubación, áquel conjugado que no se haya unido es retirado mediante lavados, para a continuación añadir un reactivo, que contiene el sustrato para la AChE y que produce una reacción colorimétrica determinable mediante espectrofotometría; cuya intensidad es inversamente proporcional a la cantidad de hormona libre existente en la muestra.

El EIA de tipo “sándwich” es un ensayo inmunométrico, cuyo principio teórico se basa en el empleo de pocillos de microtitulación conjugados con estreptavidina. Tras la adición de las muestras, del Ac biotinilado y de un Ac de detección conjugado con HRP, se produce la unión del Ac biotinilado a la estreptavidina y al metabolito analizable, en tanto que el Ac de detección se une a un epítipo diferente de la molécula analizable. El complejo constituido queda inmovilizado en los pocillos de microtitulación, debido a la interacción de la estreptavidina con el Ac biotinilado. Tras la eliminación de los conjugados no unidos, la concentración del metabolito analizable es determinada mediante la medición de la actividad enzimática de HRP debida a la adición de un sustrato tetrametilbenzidina. Finalizado el período de incubación, la reacción se paraliza mediante la adición de un ácido que constituye la solución de parado, produciéndose una reacción colorimétrica; cuya intensidad es proporcional a la cantidad de metabolito analizable.

Protocolos aplicados para las determinaciones analíticas

Los niveles circulantes de FSH en el líquido folicular se cuantificaron mediante ELISA inmunoabsorbente de fase sólida, empleando el kit comercial *FSH (Human) ELISA Kit* (Abnova), atendiendo las indicaciones del fabricante. Los líquidos foliculares no fueron diluidos para la determinación de este metabolito; comprobándose previamente con diferentes diluciones. La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm. Detalladamente, el

rango de determinación del kit es de 0-200 mIU/mL; mientras que la reactividad con otras hormonas hipofisarias es inferior a 0,001%, los coeficientes de variación inter e intraensayo son del 12,3% y 4,5% y el límite de detección es de 2,5 mUI/mL.

Las concentraciones de LH en líquido folicular se determinaron mediante EIA inmunométrico de tipo “sándwich”, utilizando el kit comercial *Luteinizing Hormone EIA kit* (Cayman Chemical), siguiendo las instrucciones indicadas. Los líquidos foliculares analizados no requirieron ser diluidos para la determinación de esta hormona; habiéndose testado previamente con diferentes diluciones. Se realizó a 450 nm la lectura de la absorbancia. Específicamente, el rango de determinación del kit es de 0,5-200 mIU/mL. Asimismo, la reactividad con otras hormonas hipofisarias, es menor a 0,0001%, los coeficientes de variación inter e intraensayo son del 7,91% y 9,21%, respectivamente; y el límite de detección es de 0,5 mUI/mL.

Los niveles de A₄ existentes en el líquido folicular se cuantificaron mediante la técnica ELISA de fase sólida, con el kit comercial *DRG® Androstenedione ELISA* (DRG) siguiendo las indicaciones del fabricante; habiéndose requerido diluir los líquidos foliculares con una solución estándar de 0 ng/mL a una dilución 1/10, previamente testada. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 450 nm. Concretamente, el rango de determinación del kit está entre 0,019-10 ng/mL; en tanto que la reactividad con otras hormonas esteroideas como E₂ y P₄ es inferior al 0,01% y de 0,6% para la T. Asimismo, los coeficientes de variación inter e intraensayo son del 8,3% y 5,3%, respectivamente y el límite de detección es de 0,021 ng/mL.

Las cantidades de P₄ presentes en el líquido folicular se determinaron a través de ensayo EIA competitivo, mediante el uso del kit comercial Progesterone EIA kit (Cayman Chemical) según las instrucciones del fabricante; habiéndose precisado diluir los líquidos foliculares en una solución reconstituida, denominada solución EIA, a una dilución 1/5000, anteriormente testada. Detalladamente, la lectura de la absorbancia se hizo a una longitud de onda de 405 nm y el rango de detección del kit está entre 7,8-1.000 pg/mL. A su vez, la reactividad con el E₂ es de 7,2% y con la T es inferior a 0,05%; mientras que los

coeficientes de variación inter e intraensayo para una concentración de 250 pg/mL de P₄ es de 1,5% y 4,9%, respectivamente, y el límite de detección del kit es de 10 pg/mL.

Los niveles de T circulantes en el líquido folicular se determinaron mediante ensayo EIA competitivo, con el kit comercial *Testosterone EIA kit* (Cayman Chemical) en concordancia a las indicaciones del fabricante; habiendo sido necesario diluir los líquidos foliculares en una solución reconstituida EIA, a una dilución 1/25, previamente testada. La lectura de la absorbancia se realizó a 405 nm de longitud de onda. Específicamente, el rango de determinación del kit está entre 3,9-500 pg/mL; mientras que la reactividad con otras hormonas esteroideas es inferior a 0,01 % para el E₂, de un 0,14% para la P₄ y 3,7% para la A₄. A su vez, los coeficientes de variación inter e intraensayo para una concentración de 250 pg/mL de T, son 2,8% y 4,6% respectivamente; siendo el límite de detección del kit de 6 pg/mL.

Las concentraciones del E₂ presentes en el líquido folicular se cuantificaron mediante EIA competitivo, con el kit comercial *Estradiol EIA kit* (Cayman Chemical) siguiendo las indicaciones del fabricante; habiéndose requerido diluir los líquidos foliculares en una solución reconstituida EIA, a una dilución 1/5000, anteriormente testada. La lectura de la absorbancia se realizó a 405 nm. Detalladamente, el rango de determinación del kit es de 6,6-4000 pg/mL; y la reactividad con las hormonas esteroideas P₄ y T es inferior al 0,01%. Asimismo, los coeficientes de variación inter e intraensayo a una concentración de 256 pg/mL son del 5,5% y del 12,3%, respectivamente; en tanto que el límite de detección del kit es de 20 pg/mL.

La lectura de las absorbancias se realizó en el espectrofotómetro SPECTRAMaxPLUS 384 (Molecular Device) a la longitud de onda indicada, mediante adquisición de los datos con el programa (SoftMaxPro4.3 LS). Los valores de las concentraciones hormonales se calcularon considerando el factor de dilución empleado en cada uno de los metabolitos.

4.7.- Análisis estadístico y procesamiento de los datos obtenidos

4.7.1.- Estadística descriptiva de las variables de estudio

La descripción de las variables cuantitativas con distribución normal se realizó por medio de la media \pm error estándar de la media; las variables de distribución no normal a través de la mediana y del rango intercuartil. Las variables cualitativas se expresaron con sus frecuencias absolutas.

4.7.2.- Estadística analítica de las variables analizadas

Se comprobó la normalidad de la distribución mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov para una muestra, en cada variable de estudio.

El análisis de las variables clínicas de estudio de las pacientes normo y bajas respondedoras de la fase I, se realizó mediante la prueba para muestras independientes. Concretamente, en las variables cuantitativas de distribución normal, se consideró el estadístico F de la prueba de Levene para la igualdad de varianzas y el estadístico t de la prueba T para la igualdad de medias con su nivel crítico bilateral (significación bilateral). A su vez, en el análisis de las variables biológicas, se consideró el estadístico *U* con el nivel crítico bilateral en la prueba *U* de Mann-Whitney para las variables cuantitativas de distribución no normal en las dos subpoblaciones de estudio.

Respecto al análisis de las variables evaluadas en la fase II, se procedió mediante una prueba T de Student para datos pareados en las variables cuantitativas con distribución normal (variables clínicas), con la prueba de Wilcoxon de los rangos con signo para dos muestras relacionadas en las variables cuantitativas de distribución no normal (variables biológicas de recuento celular, de expresión génica relativa y determinación en líquido folicular).

El nivel de significación estadística elegido fue el de p -valor $< 0,05$.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, SPSS versión 19.0 (SPSS® *Statistical software, an IBM Company, USA*).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1.- Fase I: Evaluación clínica y biológica del rendimiento ovárico en pacientes con sospecha de respuesta ovárica inadecuada

5.1.1.- Identificación de las pacientes con baja respuesta ovárica confirmada

El ciclo de estimulación ovárica controlada correspondiente a la fase I lo finalizaron un total de 89 pacientes de las 99 mujeres incluidas por sospecha de presentar una inadecuada respuesta ovárica. En concreto, se produjo la cancelación de la estimulación ovárica en 9 pacientes y se excluyó del ensayo clínico a 1 paciente por incumplimiento de la administración farmacológica.

A estas 89 pacientes potencialmente bajas respondedoras se les realizó la intervención de aspiración punción folicular transvaginal ecoguiada. El número total de ovocitos en estadio maduro MII recuperados confirmó la respuesta ovárica de cada paciente; considerándose verdadera baja respondedora aquella paciente con una recuperación ovocitaria igual o inferior a 4 ovocitos en estadio maduro MII. Esta variable clínica permitió identificar, en función de la respuesta ovárica obtenida, dos subpoblaciones de pacientes de entre la población de estudio constituida inicialmente por mujeres potencialmente bajas respondedoras.

Específicamente se identificaron 74 pacientes con una respuesta ovárica disminuida, confirmándose como verdaderas bajas respondedoras; mientras que 15 pacientes presentaron una adecuada respuesta ovárica, a las que se les refirió como pacientes normo-respondedoras.

Los resultados obtenidos en las variables clínicas y biológicas evaluadas en las dos subpoblaciones de pacientes a estudio, se describen detalladamente a continuación.

5.1.2.- Evaluación clínica de la estimulación ovárica controlada y de resultado del ciclo en las pacientes bajas y normo-respondedoras durante la fase I

Las dos subpoblaciones de estudio presentaron un promedio de 36 años de edad, un IMC inferior a 25 kg/m² y una duración de la esterilidad con la pareja superior a los 4 años; sin haberse detectado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de estos parámetros entre las pacientes con respuesta ovárica disminuida y las normo-respondedoras.

En condiciones basales, los niveles circulantes de DHEA-S, A₄, T y E₂ no difirieron significativamente entre las pacientes bajas y normo-respondedoras, a excepción de la concentración sérica de FSH, con un nivel superior a 10 mUI/mL, determinada en las 74 pacientes verdaderas bajas respondedoras. En dichas pacientes se contabilizó ecográficamente un RFA significativamente reducido al inicio de la estimulación ovárica, respecto al RFA visualizado en las pacientes normo-respondedoras.

El día de la inducción de la ovulación, las dos subpoblaciones de estudio presentaron unas concentraciones sanguíneas hormonales similares de LH y P₄. Por el contrario, los niveles circulantes de A₄, T y E₂ determinados en las 74 pacientes verdaderas bajas respondedoras, fueron estadísticamente disminuidos, en comparación a las determinaciones hormonales de las normo-respondedoras. Ecográficamente, en las pacientes con baja respuesta ovárica confirmada, se visualizó una cantidad reducida significativamente a casi la mitad tanto de folículos >16 mm de diámetro como de folículos totales, respecto al recuento folicular contabilizado en las normo-respondedoras.

Se evidenciaron notables diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo folicular, y en la cantidad y calidad ovocitaria entre las dos subpoblaciones de estudio. Específicamente, en las 74 pacientes verdaderas bajas respondedoras, se obtuvo tanto una recuperación folicular como ovocitaria total y en estadio maduro MII, estadísticamente disminuida a más de la mitad, respecto al recuento folicular y ovocitario recuperado en las pacientes normo-respondedoras. A pesar de la reducida recuperación ovocitaria en estadio MII obtenida en las pacientes bajas respondedoras, no se detectó una tasa de fecundación

significativamente menor en comparación a la tasa de fecundación que presentaron las pacientes normo-respondedoras.

El desarrollo ovocitario significativamente diferencial obtenido entre las pacientes bajas y normo-respondedoras, no se tradujo en una calidad embrionaria estadísticamente diferente entre ambas subpoblaciones. Globalmente, se detectó una menor calidad de los embriones transferibles en las pacientes bajas respondedoras. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la calidad embrionaria de las transferencias únicas y dobles embrionarias realizadas en el día 2 y 3 de desarrollo embrionario entre las pacientes de estudio, independientemente de su respuesta ovárica.

Finalmente se obtuvieron unas tasas de gestación por ciclo iniciado y de implantación en las pacientes con inadecuada respuesta ovárica del 13,9% y 12,5% respectivamente; mientras que las pacientes normo-respondedoras presentaron una tasa de gestación del 46,66% y de implantación del 35,71%.

En la **Tabla 1** se reflejan las variables clínicas evaluadas en las dos subpoblaciones de estudio, tanto en el día de inicio de la estimulación ovárica controlada como en el día de la inducción de la maduración ovocitaria; y de resultado de ciclo.

RESULTADOS

		Bajas Respondedoras	Normo Respondedoras	Valor de <i>p</i>
Inicio de la estimulación	FSH (mUI/mL)	11,57±0,70	8,10±0,39	0,000*
	DHEA-S (ng/mL)	1.268,70±101,60	1.505,31±292,78	0,357
	A ₄ (ng/mL)	1,54±0,11	2,01±0,41	0,144
	T (ng/mL)	0,29±0,02	0,04±0,06	0,060
	E ₂ (pg/mL)	38,81±2,91	38,93±6,20	0,986
	Recuento folicular antral	4,79±0,21	6,40±0,59	0,005*
Inducción de la ovulación	LH (mUI/mL)	2,50±0,37	1,44±0,29	0,189
	A ₄ (ng/mL)	2,13±0,15	2,97±0,36	0,025*
	T (ng/mL)	0,34±0,02	0,49±0,05	0,014*
	E ₂ (pg/mL)	875,85±53,89	1463,87±146,58	0,000*
	P ₄ (ng/mL)	0,55±0,07	0,70±0,08	0,357
	Nº de foliculos ≥16 mm Ø	2,64±0,16	4,87±0,27	0,000*
	Recuento folicular total	5,69±0,28	10,00±0,63	0,000*
Resultado de ciclo	Nº de foliculos puncionados	3,83±0,24	8,20±0,62	0,000*
	Nº total ovocitos recuperados	2,27±0,18	7,80±0,67	0,000*
	Nº de ovocitos en estadio maduro MII recuperados	1,72±0,14	6,73±0,52	0,000*
	Tasa de fecundación (%)	78,33	79,64	0,894

Tabla 1.- Características clínicas analizadas al inicio de la estimulación ovárica controlada, el día de la inducción de la ovulación y de resultado del ciclo, en las dos subpoblaciones de estudio. **p*-valor <0,05.

5.1.3.- Determinación del porcentaje de células de la granulosa luteinizadas potenciales que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de expresión de dichos receptores en las pacientes bajas y normo-respondedoras

El análisis de las células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ identificadas en los líquidos foliculares recuperados de cada una de las pacientes incluidas en la fase I, reveló que no existieron diferencias estadísticamente significativas ni en el porcentaje de células de la granulosa CD45⁻/IP⁺ putativas que expresaron FSHR (*Figura 16 A*), ni en la intensidad media de la fluorescencia (*Figura 17 A*) emitida por este receptor, independientemente del tipo de respuesta ovárica presentada por las pacientes. Por el contrario, tanto el porcentaje de células de la granulosa CD45⁻/IP⁺ positivas para AR (*Figura 16 B*), como la frecuencia de la intensidad de fluorescencia emitida por dicho receptor (*Figura 17 B*), difirieron estadísticamente entre las pacientes con inadecuada respuesta ovárica y las pacientes normo-respondedoras.

Específicamente, las 74 pacientes con baja respuesta ovárica presentaron un recuento de 16,93[1,51-79,22] % de células de interés CD45⁻/IP⁺ positivas para FSHR, que emitieron una intensidad media de fluorescencia de 78,00[15,80-484,00] unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf). El recuento celular cuantificado y la fluorescencia emitida por las células de estudio FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ determinada, fue ligeramente superior al 14,67[0,73-47,44] % de células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ y 47,68[26,90-123,00] uaf obtenido en las 15 pacientes que presentaron una adecuada respuesta ovárica.

Respecto a la cantidad de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ positivas para AR y la intensidad media de fluorescencia emitida por estas células que expresan dicho receptor, se cuantificó 4,73[0,01-66,44] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺ y 63,70[0,01-879,00] uaf, respectivamente, en las pacientes bajas respondedoras. Tanto la cantidad de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺ como la intensidad de fluorescencia emitida por éstas fue estadísticamente superior al recuento de 3,78[0,11-20,42] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺ (p=0,004), e intensidad media de fluorescencia de 37,50[7,65-85,40] uaf (p=0,001) cuantificado en las normo-respondedoras

RESULTADOS

Los datos obtenidos por la citometría de flujo evidenciaron una considerable variabilidad tanto en la cuantificación de las células de interés $CD45^+/IP^+$ identificadas en base a los receptores celulares FSHR y AR, y en la intensidad de fluorescencia emitida por éstos, entre las dos subpoblaciones de estudio. La información ilustrativa de la distribución de las dos poblaciones de estudio, así como las diferencias existentes en relación al porcentaje de células de interés $CD45^+/IP^+$ y a la intensidad media de fluorescencia, y el grado de significatividad se ilustran en las figuras siguientes.

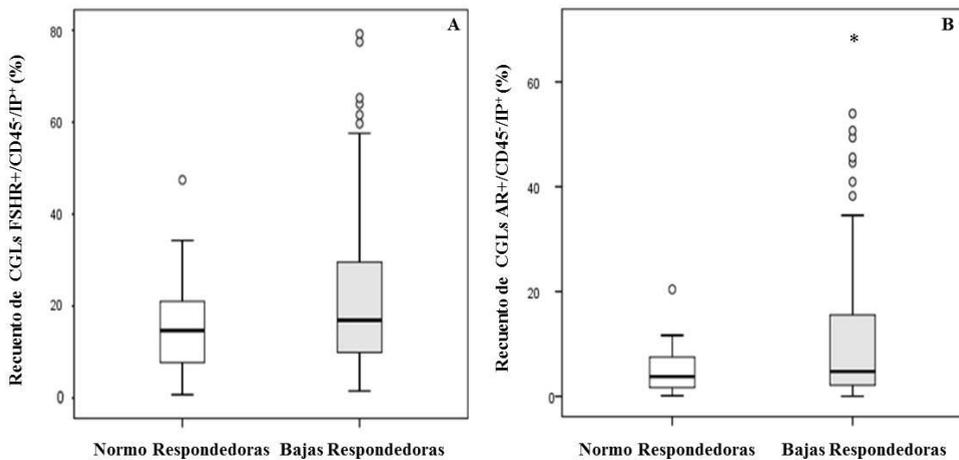


Figura 16.- Diagramas de cajas correspondientes al porcentaje de células de la granulosa luteinizadas $CD45^+/IP^+$ que expresaron FSHR (A) y AR (B), obtenidos para las dos subpoblaciones de estudio. Se detectó un porcentaje de células $AR^+/CD45^+/IP^+$ significativamente superior en las pacientes bajas respondedoras. *p-valor <0,05.

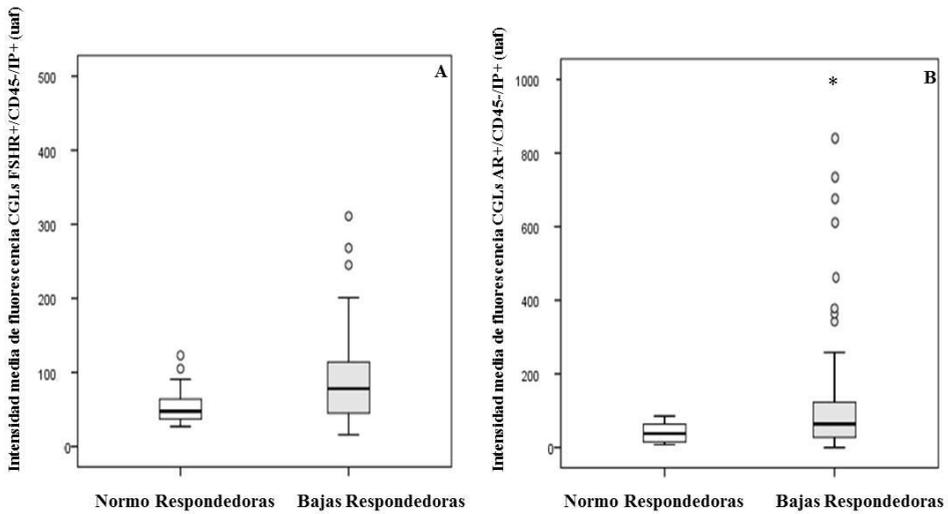


Figura 17.- Diagramas de cajas obtenidos en relación a la intensidad media de fluorescencia emitida por las células de la granulosa luteinizadas CD45⁺/IP⁺ que expresaron FSHR (A) y AR (B) en las dos subpoblaciones de estudio. Se cuantificó una intensidad media de fluorescencia emitida por las células AR⁺/CD45⁺/IP⁺ estadísticamente mayor en las pacientes bajas respondedoras *p-valor <0,05.

5.1.4.- Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus de las pacientes bajas y normo-respondedoras

Tras la determinación del recuento de células de interés que expresaron FSHR y AR, y de la intensidad media de fluorescencia expresada por estos receptores en las células de la granulosa luteinizadas, se procedió a la cuantificación por QF-RT-PCR de la expresión relativa génica de *FSHR*, *AR*, *LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* en las células del cumulus de las dos subpoblaciones de estudio.

Los valores de ΔCt detectados para *FSHR* y *LHR/LHCGR* no mostraron diferencias estadísticamente significativas independientemente del tipo de respuesta ovárica presentada. Por el contrario, la cantidad relativa de ARNm para *AR* fue significativamente elevada en las 74 pacientes bajas respondedoras, respecto al nivel génico cuantificado para *AR* en las 15 pacientes normo-respondedoras. En relación a la expresión relativa de los genes codificantes de las tres principales enzimas esteroidogénicas ováricas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de ΔCt para *StAR* y *CYP11A1* entre las dos subpoblaciones de estudio (**Figura18**).

De manera concreta, en las pacientes verdaderas bajas respondedoras, se obtuvieron unos valores ΔCt para *FSHR* de 17,49[10,33-22,16] unidades relativas (ur) y de 13,36[7,19-18,75] ur para *LHR/LHCGR*. Estas cantidades relativas de ARNm difirieron moderadamente respecto a las cuantificadas en las pacientes normo-respondedoras. En estas pacientes se cuantificaron unos valores ΔCt para *FSHR* de 17,45[13,65-25,75] ur y de 15,25[10,25-19,25] ur para *LHR/LHCGR*. Por el contrario, en las pacientes bajas respondedoras se detectaron unos valores ΔCt para *AR* estadísticamente superiores, de 12,05[8,59-20,11] ur ($p=0,008$), en comparación a los cuantificados en las pacientes normo-respondedoras correspondientes a 10,36[7,35-16,48] ur.

A su vez, se obtuvieron unos valores ΔCt para *StAR* de 6,64[4,26-11,26] ur ($p=0,000$) y para *CYP11A1* de 6,90[4,41-12,63] ur ($p=0,025$), significativamente disminuidas respecto a las cuantificadas en las pacientes normo-respondedoras; en las que se detectaron unos valores de ΔCt para *StAR* de 9,50[7,14-16,37] ur y de 9,20[6,40-11,40] ur para *CYP11A1*. Sin embargo, los niveles relativos de ARNm para *CYP19A1* no difirieron significativamente independientemente del tipo de respuesta ovárica; habiéndose cuantificado un ΔCt de 8,45[5,26-15,43] ur en las pacientes bajas respondedoras, y de 8,50[7,10-14,20] en las normo-respondedoras.

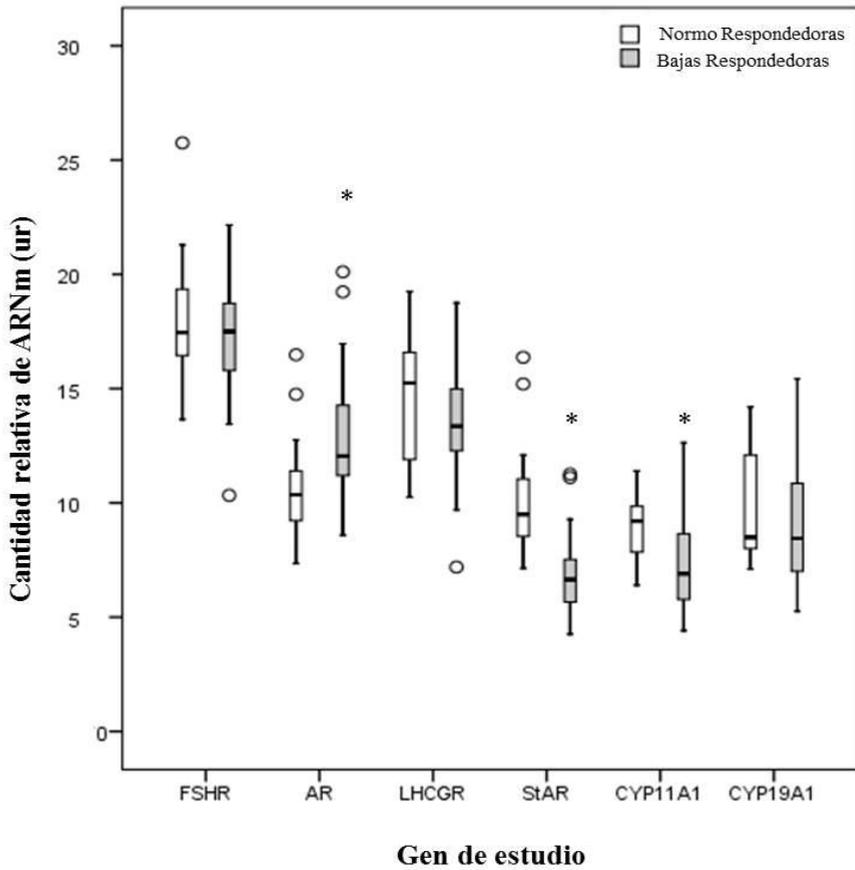


Figura 18.- Expresión de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 normalizada respecto al control endógeno 18S, cuantificada en las células del cumulus mediante análisis por QF-RT-PCR. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad relativa de ARNm para AR, StAR y CYP11A1 entre las dos subpoblaciones de estudio. *p-valor < 0,05.

5.1.5.- Determinación de los niveles hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular en las pacientes bajas y normo-respondedoras

La evaluación de la actividad enzimática aromatasa de las pacientes potencialmente bajas respondedoras se realizó mediante la determinación en líquido folicular de las principales hormonas esteroideas sexuales, además de las hormonas FSH y LH.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones hormonales de FSH y P₄ en el líquido folicular, independientemente del tipo de respuesta ovárica presentada. Por el contrario, en los líquidos foliculares de las 30 pacientes con baja respuesta confirmada, se determinó una concentración de LH significativamente superior a la cuantificada en los líquidos foliculares correspondientes a las 15 pacientes normo-respondedoras. Asimismo, las pacientes verdaderas bajas respondedoras presentaron unas concentraciones estadísticamente disminuidas de A₄, T y E₂ en comparación a las determinaciones obtenidas para dichas hormonas en las pacientes normo-respondedoras.

La **Tabla 2** resume las determinaciones hormonales para FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ cuantificadas en líquido folicular de las dos subpoblaciones de estudio.

Concentración hormonal en líquido folicular	Bajas Respondedoras	Normo Respondedoras	Valor de <i>p</i>
FSH (mUI/mL)	7,95±0,32	7,41±0,67	0,414
LH (mUI/mL)	5,49±0,51	3,24±0,48	0,008*
A ₄ (ng/mL)	4,37[0,53-29,65]	8,41[3,99-12,82]	0,010*
P ₄ (ng/mL)	17.055,18[2.113,44-107.697,07]	15.548,63[9.017,82-16.569,13]	0,664
T (ng/mL)	11,20[2,91-31,92]	13,45[9,47-53,88]	0,021*
E ₂ (ng/mL)	803,14[63,70-2.089,76]	2.753,46[772,70-7.392,75]	0,000*

Tabla 2.- Concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ cuantificadas en el líquido folicular de las pacientes bajas y normo-respondedoras analizadas. p-valor <0,05.*

5.2.- Fase II: Análisis comparativo del rendimiento ovárico en términos clínicos y biológicos, de las pacientes verdaderas bajas respondedoras sometidas a preparación folicular respecto a su respuesta ovárica durante el ciclo de estimulación previo sin preparación folicular (fase I)

5.2.1.- Evaluación de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular con andrógenos

Se asignaron aleatoriamente 22 pacientes verdaderas bajas respondedoras a la estrategia de androgenización del entorno folicular mediante la administración de

testosterona transdérmica durante 7 días en la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada.

El potencial efecto beneficioso del pretratamiento folicular androgénico sobre el rendimiento ovárico, se evaluó respecto a la respuesta ovárica obtenida en dichas pacientes en el ciclo anterior en ausencia de preparación folicular.

De entre las 22 pacientes aleatorizadas a esta estrategia de preparación folicular, finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada tras recibir el pretratamiento de andrógenos, 19 pacientes. Cabe mencionar que el ciclo previo de fase I no se completó en 5 de estas 22 pacientes. Por lo tanto, el análisis comparativo del rendimiento ovárico finalmente se realizó en 15 bajas respondedoras.

A continuación se describen detalladamente los aspectos clínicos y biológicos de la respuesta ovárica obtenida en las 15 pacientes evaluadas que finalizaron el ciclo de fase I en ausencia de preparación folicular y el ciclo de estimulación ovárica previo pretratamiento de testosterona transdérmica en parches.

5.2.1.1- Parámetros clínicos de la estimulación ovárica controlada y de resultado de ciclo

En condiciones basales del ciclo de estimulación ovárica tras preparación folicular mediante andrógenos, los niveles séricos circulantes de FSH, DHEA-S, A₄ y E₂, no difirieron significativamente respecto a las concentraciones sanguíneas determinadas al inicio del ciclo de estimulación ovárica de la fase I. Por el contrario, se determinó una concentración de T significativamente mayor en el día siguiente de la última aplicación del parche de testosterona transdérmica. Ecográficamente no se visualizó una diferencia estadísticamente significativa en el RFA de ambos ovarios, entre los dos ciclos de estimulación ovárica controlada, con independencia de haber recibido o no suplementación temprana de andrógenos.

En el día de la inducción de la ovulación no se obtuvieron diferencias en las determinaciones hormonales de A₄, T, E₂ y P₄, respecto a las concentraciones séricas obtenidas en el anterior ciclo; salvo en el nivel circulante de LH, con una concentración estadísticamente superior al valor sérico determinado en la fase I. El desarrollo folicular

tras suplementación con andrógenos, no se incrementó significativamente en términos de cantidad de folículos en crecimiento. En las bajas respondedoras pretratadas con testosterona transdérmica se contabilizó un recuento de folículos con un tamaño ≥ 16 mm ligeramente inferior al visualizado en fase I. Sin embargo, el RFA total visualizado en ambos ovarios aumentó moderadamente en el ciclo de estimulación tras preparación folicular, en comparación al RFA ecográficamente evaluado en la fase I.

La androgenización del entorno folicular no mejoró significativamente el rendimiento de los ovarios en cuanto a la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados. No obstante, tras la preparación folicular con andrógenos se consiguió una cantidad de folículos puncionados estadísticamente mayor respecto a la obtenida en la fase I. Sin embargo, este significativo aumento en el recuento folicular no se tradujo en una recuperación ovocitaria estadísticamente aumentada, ni en una mejora significativa del grado madurativo de los ovocitos recuperados, ni en un aumento plausible de la capacidad fecundante ovocitaria.

No se detectaron diferencias estadísticas en la calidad de los embriones únicos y dobles transferidos en el día 2 o día 3 de desarrollo embrionario, en las pacientes que recibieron suplementación temprana de andrógenos. Sin embargo, tan sólo en 3 de las 12 pacientes aleatorizadas que tuvieron transferencia embrionaria, los embriones fueron de buena calidad.

Finalmente se obtuvieron unas tasas de gestación por ciclo iniciado y de implantación en las pacientes que recibieron suplementación temprana de testosterona transdérmica del 31,81% y 26,08%, respectivamente.

En la **Tabla 3** se resumen los datos comparativos correspondientes a los parámetros clínicos evaluados en condición basal, el día de la maduración final ovocitaria, y de resultado de ciclo de las bajas respondedoras estudiadas.

RESULTADOS

	Ciclo de EOC sin preparación folicular	Ciclo de EOC tras preparación folicular con testosterona transdérmica	Valor de <i>p</i>	
Inicio de la estimulación	FSH (mUI/mL)	10,44±1,59	10,48±1,14	0,982
	DHEA-S (ng/mL)	1.465,38±175,03	1.496,61±170,72	0,128
	A ₄ (ng/mL)	2,08±0,26	2,27±0,21	0,422
	T (ng/mL)	0,36±0,05	3,62±1,21	0,020*
	E ₂ (pg/mL)	77,20±40,35	43,26±9,71	0,438
	Recuento folicular antral	5,07±0,34	4,46±0,53	0,329
Inducción de la ovulación	LH (mUI/mL)	2,30±1,24	3,85±1,48	0,038*
	A ₄ (ng/mL)	2,09±0,38	2,53±0,38	0,175
	T (ng/mL)	0,38±0,04	0,37±0,07	0,901
	E ₂ (pg/mL)	812,07±101,19	906,60±143,69	0,432
	P ₄ (ng/mL)	0,55±0,09	0,63±0,13	0,636
	Nº de folículos ≥16 mm Ø	2,53±0,30	2,26±0,24	0,512
	Recuento folicular total	5,26±0,58	6,80±1,10	0,147
Resultado de ciclo	Nº de folículos puncionados	3,60±0,45	5,00±0,60	0,037*
	Nº total ovocitos recuperados	2,46±0,47	2,93±0,53	0,380
	Nº de ovocitos en estadio maduro MII recuperados	1,93±0,39	2,40±0,56	0,450
	Tasa de fecundación (%)	81,88	77,27	0,330

Tabla 3.- Determinación de los parámetros clínicos analizados el día de inicio de la estimulación ovárica controlada, el día de la inducción de la ovulación, y de resultado de ciclo en las pacientes bajas respondedoras aleatorizadas al pretratamiento con testosterona transdérmica. El panel muestra los datos comparativos entre fase I (ciclo de EOC en ausencia de preparación folicular) y fase II (ciclo de EOC tras administración temprana de andrógenos). *p-valor<0,05.

5.2.1.2- Parámetros biológicos de la estimulación ovárica controlada

5.2.1.2.1-Determinación del porcentaje de células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de estos receptores

El posible efecto de la preparación folicular con andrógenos sobre el número de receptores celulares, se abordó mediante el análisis comparativo del porcentaje de células de la granulosa luteinizadas que expresaron FSHR y AR, y de la intensidad media de fluorescencia emitida por los receptores existentes en las células de interés CD45⁻/IP⁺.

Los datos proporcionados por la citometría de flujo demostraron que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos ciclos de estimulación ovárica, en cuanto al recuento de células CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR y AR (**Figura 19 A y B**), y a la intensidad media de fluorescencia emitida por estos receptores celulares (**Figura 20 A y B**).

De manera detallada, en las 15 pacientes bajas respondedoras analizadas que recibieron suplementación de testosterona transdérmica, se cuantificó un porcentaje de 12,28[2,42-45,59] % de células CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR, así como una intensidad media de fluorescencia de 65,30[19,90-231,00] uaf emitida por las células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺. En tanto que en el ciclo previo de fase I, la cantidad celular obtenida fue ligeramente superior, habiéndose detectado un 13,55[2,21-43,33] % de células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺, que emitieron una fluorescencia de 87,10[20,60-415] uaf. En relación al recuento de células de interés CD45⁻/IP⁺ que expresaron AR, en el ciclo de estimulación ovárica tras preparación folicular, se cuantificó un porcentaje de 3,99[0,35-51,27] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺, que

RESULTADOS

emitieron una intensidad media de fluorescencia de 57,20[9,16-499,00] uaf. En el ciclo de fase I, se obtuvo una cantidad de células de la granulosa luteinizadas AR⁺/CD45⁻/IP⁺ ligeramente inferior, correspondiente a un 3,51[0,01-45,58] % de células CD45⁻/IP⁺ positivas para AR; mientras que la fluorescencia emitida por AR existente en las células CD45⁻/IP⁺ fue moderadamente superior, siendo de 62,30[0,01-733,00] uaf.

Los datos obtenidos en relación a la cuantificación del porcentaje de las células de estudio y de la fluorescencia emitida por FSHR y AR existentes en éstas, sugirieron que la preparación folicular con andrógenos no indujo un cambio significativo ni en la cantidad de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ positivas para FSHR y AR, ni en la fluorescencia emitida por estos receptores, a pesar de haberse detectado un incremento no significativo en el recuento de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺ en el ciclo de estimulación ovárica controlada tras suplementación de testosterona transdérmica. Finalmente, los datos proporcionados por la citometría de flujo evidenciaron la dispersión existente en la cuantificación tanto del recuento celular como de la intensidad de la fluorescencia emitida, independientemente de haber recibido o no pretratamiento con andrógenos.

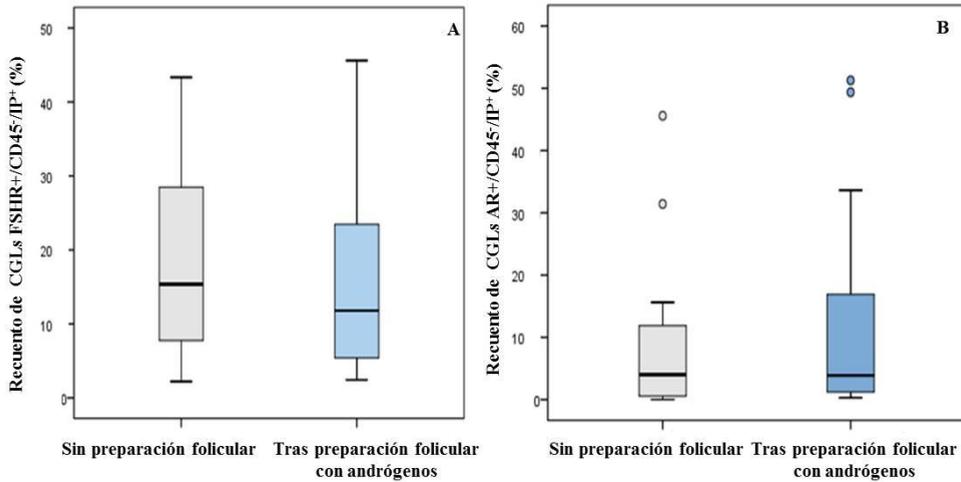


Figura 19.- Recuento de células de la granulosa luteinizadas CD45⁺/IP⁺ identificadas en base a la presencia de FSHR (A) y AR (B), en las pacientes bajas respondedoras que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras administración temprana de andrógenos). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

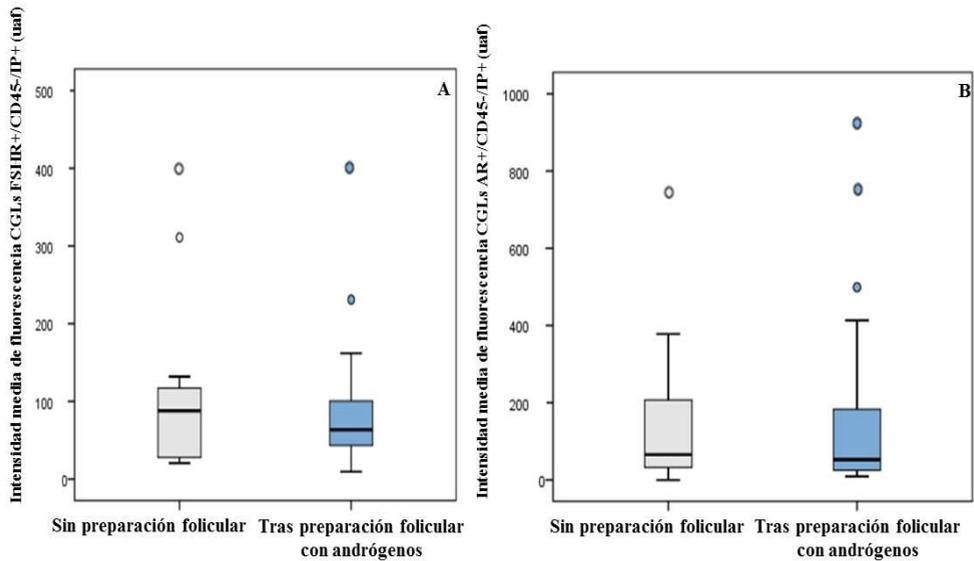


Figura 20.- Intensidad media de fluorescencia emitida por las células de la granulosa luteinizadas $CD45^-/IP^+$ que expresaron *FSHR* (A) y *AR* (B), cuantificada en las pacientes bajas respondedoras que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras administración temprana de andrógenos). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

5.2.1.2.2.- Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de *FSHR*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* en las células del cumulus

Posteriormente a la identificación y cuantificación de las potenciales células de la granulosa luteinizadas $CD45^-/IP^+$ que expresaron *FSHR* y *AR*, se procedió al análisis cuantitativo por QF-RT-PCR de los niveles de expresión relativa de los genes *FSHR*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1*, en las células del cumulus.

Cabe mencionar que de entre las 15 bajas respondedoras que cumplieron los ciclos de estimulación ovárica de fase I y tras preparación folicular, se obtuvo al menos un

ovocito en estadio maduro MII en los dos ciclos de estimulación, en 10 pacientes. Por tanto, el análisis cuantitativo de la expresión génica diferencial finalmente se procedió en estas 10 bajas respondedoras.

Con independencia de haber recibido o no pretratamiento folicular de testosterona transdérmica, en las células del cumulus aisladas de las pacientes analizadas, la variable ΔCt para *FSHR* y *LHR/LHCGR* no difirió de manera estadísticamente significativa. Por el contrario, el nivel de expresión génica relativa para *AR* sí difirió significativamente entre los dos ciclos de estimulación ovárica controlada (**Figura 21**).

En las células del cumulus aisladas de los COC recuperados tras el ciclo de estimulación ovárica controlada previa administración de testosterona transdérmica, se cuantificaron unos valores ΔCt para *FSHR* de 16,90[14,29-20,11] ur y de 16,44[7,94-20,11] ur para *LHCGR*. Estos valores de expresión relativa génica obtenidos para estos receptores celulares, no difirieron significativamente en comparación a los obtenidos en el ciclo previo de fase I, en el que se cuantificó un ΔCt de 17,76[16,01-21,58] ur para *FSHR* y 14,95[11,40-19,23] ur para *LHR/LHCGR*. Por el contrario, en el ciclo tras administración temprana de andrógenos se cuantificó una cantidad relativa para *AR* estadísticamente superior, de 14,58[11,21-20,11] ur en comparación a la detectada en la fase I correspondiente a 12,88[8,96-19,23] ur ($p=0,047$).

En cuanto a los niveles de expresión relativa obtenidos para los genes *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en respuesta a la suplementación con andrógenos, en comparación a los valores ΔCt cuantificados en la fase I (**Figura 21**).

En el ciclo de estimulación ovárica controlada tras pretratamiento con andrógenos, se obtuvieron unos valores ΔCt para *StAR* de 7,13[1,51-9,50] ur, y de 8,79[3,59-10,48] ur y 9,20[3,09-17,01] ur para *CYP11A1* y *CYP19A1*, respectivamente. Por contra en el ciclo previo en ausencia de preparación folicular, se detectaron unas cantidades relativas moderadamente disminuidas de ARNm para *StAR* de 5,63[1,64-11,11] ur; y para *CYP11A1* y *CYP19A1*, unos valores ΔCt de 7,13[3,70-12,59] ur y 8,78[1,64-15,43] ur, respectivamente.

RESULTADOS

Finalmente, la tasa de cambio calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada uno de los genes de estudio en las 10 bajas respondedoras analizadas, no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

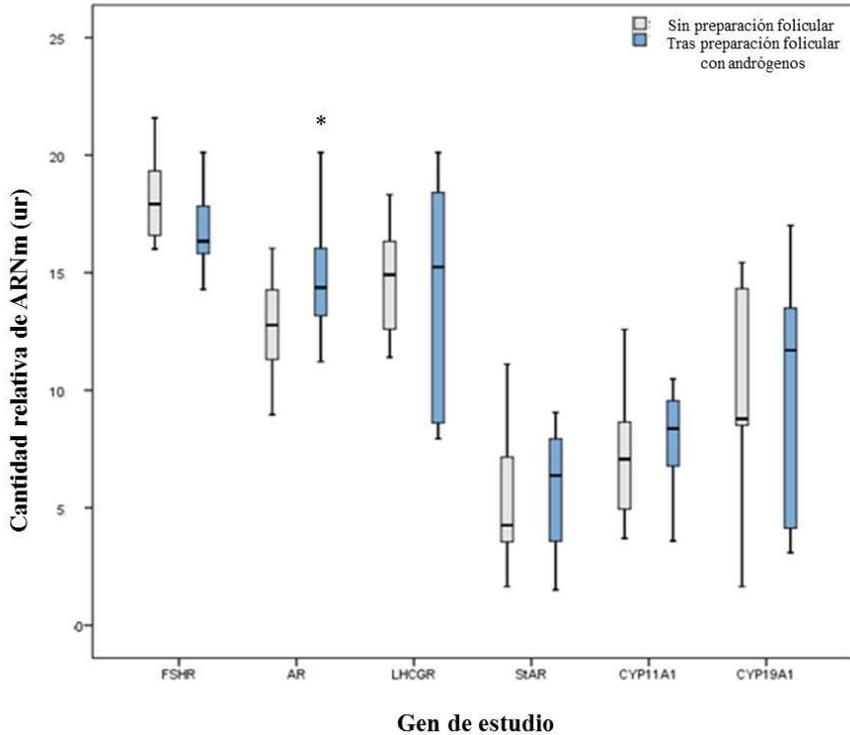


Figura 21.- Expresión relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 normalizada respecto al control endógeno 18S cuantificada mediante QF-RT-PCR en las células del cumulus aisladas de las 10 pacientes bajas respondedoras en las que se obtuvo al menos un ovocito en estadio maduro MII en los dos ciclos de estimulación ovárica controlada. *p-valor < 0,05.

5.2.1.2.3.- Determinación de las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular

Tras la cuantificación de la expresión diferencial en las células del cumulus de los principales genes codificantes de los receptores y enzimas esteroidogénicas ováricas estudiados, se procedió a determinar los valores hormonales en líquido folicular en una aproximación indirecta para la evaluación de la actividad aromatasas.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄ y T, independientemente de haber recibido o no un pretratamiento de testosterona transdérmica. Por el contrario, la concentración circulante de E₂ determinada en el ciclo de estimulación ovárica tras preparación folicular con andrógenos fue estadísticamente superior a la cuantificada en el ciclo previo de fase I.

La **Tabla 4** resume los valores circulantes de las hormonas FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ determinados en el líquido folicular de las pacientes bajas respondedoras aleatorizadas en la estrategia de preparación folicular mediante andrógenos, que fueron analizadas.

RESULTADOS

Concentración hormonal en líquido folicular	Ciclo de EOC sin preparación folicular	Ciclo de EOC tras preparación folicular con testosterona transdérmica	Valor de <i>p</i>
FSH (mUI/mL)	8,06±0,55	9,85±0,78	0,092
LH (mUI/mL)	6,16±0,58	7,90±1,30	0,252
A ₄ (ng/mL)	6,54 [2,56-29,65]	4,45[1,47-140,98]	0,889
P ₄ (ng/mL)	23.633,85±10.951,95	47.635,98±15.817,93	0,201
T (ng/mL)	13,25±2,36	22,02±5,42	0,159
E ₂ (ng/mL)	658,52±119,26	1.629,80±264,35	0,004*

*Tabla 5.- Concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ cuantificadas en el líquido folicular de las pacientes bajas respondedoras, que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras suplementación temprana de andrógenos). * p-valor <0,05.*

5.2.2.- Evaluación de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular con estrógenos

Se asignaron 24 pacientes bajas respondedoras a la estrategia de preparación folicular mediante la administración en parches de 17β-E₂ micronizado transdérmico durante 11 días en la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada.

Sin embargo, fueron finalmente 16 pacientes las que completaron el ciclo de estimulación ovárica tras la suplementación temprana de estrógenos.

La eficacia en términos clínicos y biológicos de este pretratamiento folicular sobre el rendimiento ovárico fue evaluada respecto a la respuesta ovárica obtenida en el ciclo previo de fase I, según se expone detalladamente a continuación.

5.2.2.1.- Parámetros clínicos de la estimulación ovárica controlada y de resultado de ciclo

Al inicio de la estimulación ovárica controlada tras la preparación folicular con estrógenos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos circulantes de DHEA-S, A₄ y T, en comparación a las concentraciones determinadas en el ciclo previo de fase I. Por el contrario, en el ciclo de fase II se detectaron unas concentraciones hormonales de FSH y E₂ que difirieron significativamente a los valores determinados en el ciclo previo en ausencia de preparación folicular mediante estrógenos. En condición basal, esta estrategia de preparación folicular supuso un aumento moderado del RFA, respecto al RFA ecográficamente contabilizado en ambos ovarios al inicio del ciclo previo de fase I.

El día de la inducción de la ovulación, las pacientes bajas respondedoras que recibieron 17β-E₂ micronizado transdérmico, presentaron unos niveles séricos androgénicos de A₄ y T significativamente reducidos, en comparación a las concentraciones sanguíneas determinadas en el ciclo previo en ausencia de preparación folicular. La suplementación temprana de estrógenos mejoró de manera significativa el desarrollo de los folículos en crecimiento. En concreto, en el día de la maduración final ovocitaria se visualizó ecográficamente una mayor cantidad de folículos preovulatorios. Este aumento del desarrollo folicular se reflejó en un recuento folicular total significativamente superior, respecto al contabilizado en el ciclo anterior de la fase I.

La significativa mejora del desarrollo folicular de las 16 bajas respondedoras pretratadas con 17β-E₂ micronizado transdérmico que fueron evaluadas, se tradujo en un aumento estadísticamente significativo del rendimiento ovárico. Específicamente, el incremento de la respuesta ovárica de la fase II se reflejó en un incremento estadístico tanto del número de folículos puncionados como del recuento de ovocitos totales y de la cantidad de ovocitos recuperados en estadio maduro MII, en comparación a la cantidad folicular y

RESULTADOS

ovocitaria recuperada en el ciclo previo en ausencia de preparación folicular. Sin embargo, esta mejora de la calidad ovocitaria no se tradujo en un aumento significativo de la capacidad fecundante ovocitaria; por lo que la tasa de fecundación no difirió estadísticamente entre los dos ciclos de estimulación ovárica controlada.

Mayoritariamente se obtuvieron embriones de buena y subóptima calidad embrionaria. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la calidad de los embriones únicos y dobles transferidos en el día 2 o día 3 de desarrollo embrionario en las bajas respondedoras aleatorizadas en la estrategia de preparación folicular mediante suplementación temprana de estrógenos.

Finalmente, en las pacientes que recibieron el pretratamiento de 17β -E₂ micronizado transdérmico presentaron unas tasas de gestación por ciclo iniciado y de implantación del 25% y 30,43%, respectivamente.

En la **Tabla 6** se resumen los datos comparativos correspondientes a los parámetros clínicos evaluados el día de inicio de la estimulación ovárica, el día de la inducción de la ovulación, y de resultado de ciclo obtenidos de las pacientes bajas respondedoras analizadas.

	Ciclo de EOC sin preparación folicular	Ciclo de EOC tras preparación folicular con 17β-E ₂ transdérmico	Valor de <i>p</i>	
Inicio de la estimulación	FSH (mUI/mL)	8,45±1,68	4,18±0,85	0,000*
	DHEA-S (ng/mL)	1.522,90±174,74	1.678,63±217,59	0,487
	A ₄ (ng/mL)	1,61±0,22	1,73±0,18	0,653
	T (ng/mL)	0,28±0,04	0,34±0,02	0,759
	E ₂ (pg/mL)	104,56±47,94	137,68±16,80	0,000*
	Recuento folicular antral	5,73±0,50	6,80±0,86	0,123
	Inducción de la ovulación	LH (mUI/mL)	2,79±0,56	4,53±3,52
A ₄ (ng/mL)		2,52±0,27	1,28±0,27	0,015*
T (ng/mL)		0,43±0,04	0,25±0,05	0,027*
E ₂ (pg/mL)		940,15±138,10	961,61±143,10	0,907
P ₄ (ng/mL)		0,53±0,07	0,55±0,11	0,835
Nº de folículos ≥16 mm Ø		2,75±0,39	3,75±0,51	0,021*
Recuento folicular total		6,25±0,69	7,75±0,96	0,050*
Resultado de ciclo	Nº de folículos puncionados	3,56±0,51	5,19±0,75	0,022
	Nº total ovocitos recuperados	2,25±0,33	3,56±0,62	0,033*
	Nº de ovocitos en estadio maduro MII recuperados	1,56±0,30	2,75±0,42	0,029*
	Tasa de fecundación (%)	76,66	83,40	0,717

Tabla 6.- *Parámetros clínicos evaluados en el día de inicio de la estimulación ovárica controlada, el día de la inducción de la ovulación, y de resultado de ciclo en las pacientes bajas respondedoras asignadas al pretratamiento con 17β -E₂ micronizado transdérmico. El panel muestra los datos comparativos entre fase I (ciclo de EOC en ausencia de preparación folicular) y fase II (ciclo de EOC tras administración temprana de estrógenos). *p-valor<0,05.*

5.2.2.2.- Parámetros biológicos de la estimulación ovárica controlada

5.2.2.2.1- Determinación del porcentaje de células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de estos receptores

Se procedió a la cuantificación de las células de la granulosa CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR y AR, y de la intensidad de fluorescencia emitida por estos receptores presentes en las células recuperadas de las 16 bajas respondedoras, que finalizaron el ciclo de fase I y de fase II.

Los datos proporcionados por la citometría de flujo informaron que la totalidad de las células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ fueron positivas tanto para la cuantificación del recuento celular en base a la presencia de FSHR (**Figura 22 A**) y AR (**Figura 22 B**), como para la detección de la fluorescencia emitida por los receptores FSHR (**Figura 23 A**) y AR (**Figura 23 B**) existentes en las células de interés CD45⁻/IP⁺, a pesar de no haberse obtenido diferencias estadísticamente significativas independientemente de haber recibido o no un pretratamiento temprano de estrógenos.

En el ciclo de estimulación ovárica tras suplementación con estrógenos se cuantificó un recuento correspondiente a 18,22[6,11-45,48] % de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR, las cuales emitieron una intensidad media de fluorescencia de 91,80[22,30-228,00] uaf. La cantidad de células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ cuantificada fue ligeramente superior respecto a la obtenida en el ciclo de estimulación ovárica previo de la fase I, en donde se obtuvo una cantidad de 14,76[2,19-65,29] % de

células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ ; en tanto que la intensidad de fluorescencia emitida en la fase I fue moderadamente inferior, correspondiente a 82,30[37,20-484,00] uaf.

En cuanto al recuento de células de interés CD45⁻/IP⁺ que expresaron AR, en el ciclo de estimulación ovárica tras pretratamiento con estrógenos, se obtuvo una cantidad de 5,17[0,36-17,97] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺; que emitieron una fluorescencia a una intensidad de 108,40[7,72-630,00] uaf. Este recuento celular e intensidad media de fluorescencia cuantificados difirieron moderadamente respecto a la cuantificación correspondiente de la fase I. En el ciclo previo en ausencia de preparación folicular se determinó una cantidad celular ligeramente superior, correspondiente a 7,15[2,25-53,96] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺, y una intensidad de fluorescencia levemente disminuida de 65,15[7,41-674,00] uaf.

Las cuantificaciones de las células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR y AR detectadas en las dos fases de estudio, evidenciaron una ineficiencia de la suplementación de estrógenos sobre la cantidad celular que poseen FSHR y AR. Del mismo modo, la intensidad media de fluorescencia emitida por FSHR y AR existentes en las células de interés CD45⁻/IP⁺ obtenidas en los dos ciclos de estimulación ovárica controlada, sugirieron un efecto nulo de la preparación folicular con estrógenos sobre la intensidad de fluorescencia emitida por FSHR y AR.

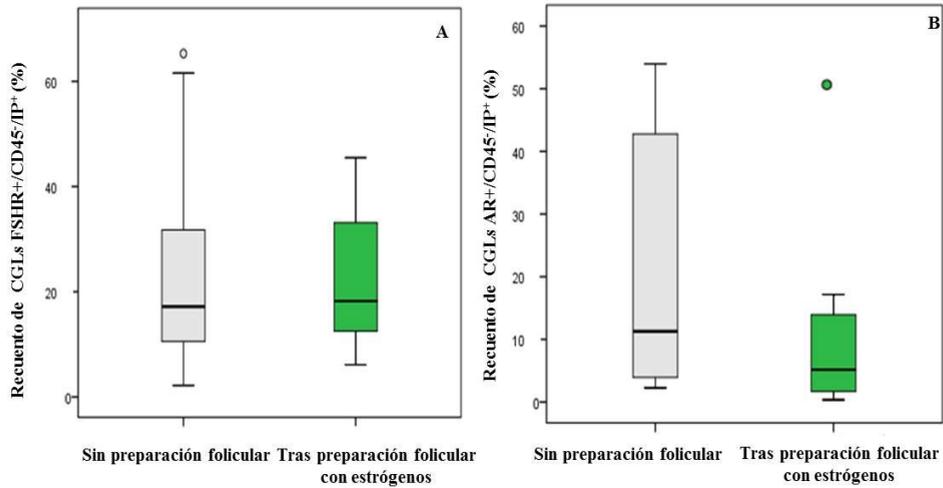


Figura 22.- Recuento de células de la granulosa luteinizadas CD45⁺/IP⁺ que expresaron FSHR (A) y AR (B), en las pacientes bajas respondedoras que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras administración temprana de ACOs conjugados con estrógenos). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

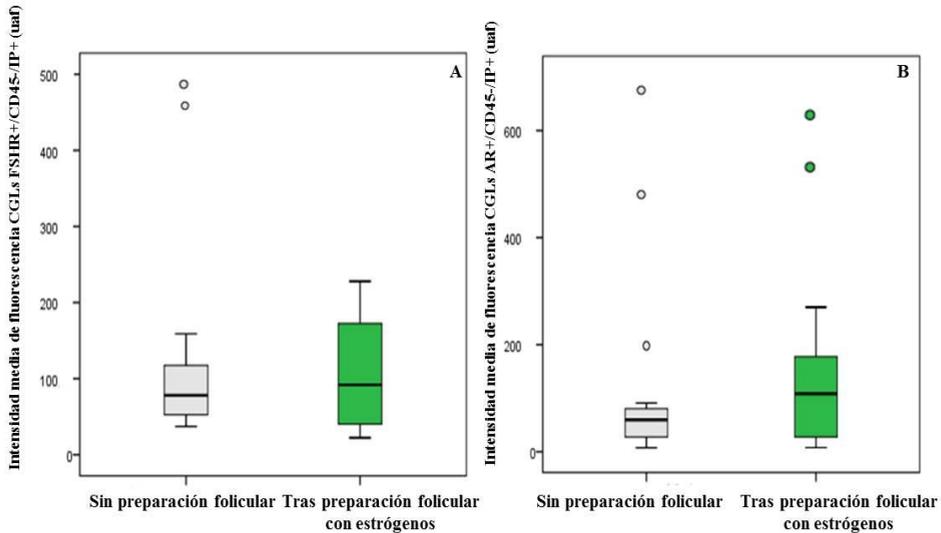


Figura 23.- Intensidad media de fluorescencia emitida por las células de la granulosa luteinizadas $CD45^-/IP^+$ que expresaron *FSHR* (A) y *AR* (B), cuantificada en las pacientes bajas respondedoras que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras administración temprana de estrógenos). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

5.2.2.2.2.- Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de *FSHR*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* en las células del cumulus

Una vez cuantificado el porcentaje de células de interés $CD45^-/IP^+$ que expresaron *FSHR* y *AR*, y evaluados los datos comparativos obtenidos en el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I y de fase II, se procedió al análisis de expresión génica relativa. En concreto se cuantificaron mediante QF-RT-PCR los niveles relativos de ARNm para *FSHR*, *AR*, *LHR/LHCGR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* en las células del cumulus.

De entre las 24 bajas respondedoras aleatorizadas a esta estrategia folicular, fueron 10 pacientes las que finalizaron los dos ciclos de estimulación ovárica controlada, y en las

RESULTADOS

que se obtuvo al menos un ovocito en estadio maduro MII. Por lo tanto, el análisis comparativo del efecto de la preparación folicular mediante estrógenos sobre el perfil de la expresión génica relativa fue finalmente evaluado en 10 bajas respondedoras.

Las cantidades relativas de ARNm cuantificadas para los receptores celulares *FSHR*, *AR* y *LHCGR* no difirieron significativamente en los dos ciclos de estimulación ovárica controlada, independientemente de haber recibido o no pretratamiento mediante administración de 17β -E₂ micronizado transdérmico (**Figura 24**).

En concreto, en el ciclo de estimulación ovárica tras suplementación con estrógenos, se cuantificaron unos valores Δ Ct para *FSHR* de 16,37[9,99-19,69] ur, para *AR* de 13,61[8,88-19,09] ur y de 11,67[2,92-17,28] ur para *LHCGR*. Estos niveles relativos de ARNm no difirieron significativamente a los cuantificados en el ciclo previo en ausencia de preparación folicular. En dicho ciclo de la fase I, se obtuvieron unos valores Δ Ct de 17,22[10,33-22,16] ur para *FSHR*, de 12,00[8,59-20,11] ur para *AR* y de 12,15[7,19-18,75] ur para *LHCGR*.

Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las cantidades relativas de ARNm de los genes codificantes de las enzimas *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1*, entre los dos ciclos de estimulación ovárica controlada, con independencia de haber recibido o no suplementación temprana de 17β -E₂ micronizado transdérmico (**Figura 24**).

En el ciclo de estimulación ovárica controlada tras pretratamiento folicular, se cuantificaron unos valores de Δ Ct para *StAR* de 4,93[1,75-9,90] ur; mientras que para *CYP11A1* y *CYP19A1* los valores Δ Ct fueron de 6,85[2,43-19,59] ur y de 8,78[4,22-15,51] ur, respectivamente. En tanto que en el ciclo previo en ausencia del pretratamiento con estrógenos, las cantidades relativas de ARNm obtenidas fueron moderadamente disminuidas; en concreto se cuantificaron unos valores de Δ Ct de 4,05[1,17-8,70] ur para *StAR*, para *CYP11A1* de 5,41[1,37-11,20] ur y de 6,79[2,33-11,62] ur para *CYP19A1*.

La tasa de cambio calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada uno de los genes considerados no informó de diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica, independientemente de haber recibido o no una administración temprana de estrógenos.

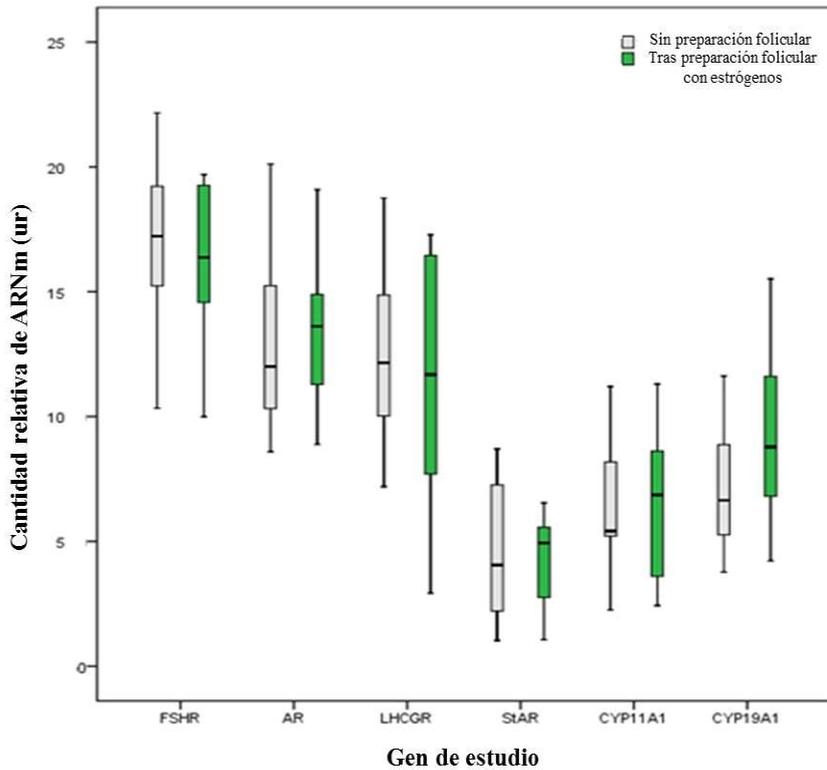


Figura 24.- Expresión relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 normalizada respecto al control endógeno 18S cuantificada mediante QF-RT-PCR en las células del cumulus aisladas de las 10 pacientes bajas respondedoras en las que se obtuvo al menos un ovocito en estadio maduro MII en los dos ciclos de estimulación ovárica controlada. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

5.2.2.2.3.- Determinación de las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular

Tras el análisis comparativo de los niveles de expresión relativa génica cuantificados en las células del cumulus, obtenidos en el ciclo de estimulación en ausencia de preparación

RESULTADOS

folicular y en el ciclo tras el pretratamiento lúteo con estrógenos, se procedió a determinar los valores hormonales circulantes del líquido folicular.

Las concentraciones hormonales de FSH, LH y P_4 no difirieron significativamente entre las dos fases de estudio; independientemente de haber recibido o no un pretratamiento de 17β - E_2 transdérmico. Por el contrario, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones hormonales de A_4 , T y E_2 entre los dos ciclos de estimulación ovárica controlada. Específicamente, se obtuvo una disminución estadística en la concentración de A_4 y de E_2 , y un nivel significativamente aumentado de T, respecto a las determinaciones hormonales obtenidas en la fase I.

En la **Tabla 7** se resumen las concentraciones hormonales de FSH, LH, A_4 , P_4 , T y E_2 determinadas en el líquido folicular de las bajas respondedoras asignadas a la estrategia de preparación folicular mediante estrógenos, que fueron evaluadas.

Concentración hormonal en líquido folicular	Ciclo de EOC sin preparación folicular	Ciclo de EOC tras preparación folicular con 17β-E ₂ micronizado	Valor de p
FSH (mUI/mL)	7,71±0,35	7,65±0,83	0,939
LH (mUI/mL)	6,23±1,11	4,60±0,49	0,159
A ₄ (ng/mL)	3,98[2,37-23,99]	1,89[1,33-3,56]	0,012*
P ₄ (ng/mL)	77.103,49[2.113,431-107.697,71]	58.944,03[2.901,19-987.423,99]	0,500
T (ng/mL)	10,64±1,18	13,51±1,34	0,027*
E ₂ (ng/mL)	733,75±113,38	1.184,53±163,72	0,003*

*Tabla 8.- Concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ cuantificadas en el líquido folicular de las pacientes bajas respondedoras, que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras suplementación temprana de estrógenos). * p-valor <0,05.*

5.2.3.- Evaluación de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular con gestágenos combinados con estrógenos

La estrategia farmacológica de administración oral de ACOs conjugados con valerato de E₂ durante dos ciclos previos al ciclo de estimulación ovárica controlada, se asignó aleatoriamente a 20 pacientes. Sin embargo, fueron 18 bajas respondedoras las que recibieron el pretratamiento folicular; habiéndose finalizado la estimulación ovárica controlada correspondiente a la fase II, en 14 pacientes. De estas 14 bajas respondedoras, 1 paciente no completó el ciclo previo de fase I. Por lo tanto, el análisis comparativo de la

posible mejora del rendimiento ovárico debido a la preparación folicular con ACOs conjugados con valerato de E₂, fue finalmente realizado en las 13 bajas respondedoras que completaron los dos ciclos de fase I y fase II, según se describe detalladamente a continuación.

5.2.3.1.- Parámetros clínicos de la estimulación ovárica controlada y de resultado de ciclo

En condiciones basales, las bajas respondedoras evaluadas que recibieron pretratamiento de ACOs conjugados con valerato de E₂, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos hormonales de FSH, A₄, T y E₂, respecto a las concentraciones sanguíneas determinadas en el anterior ciclo de fase I. Sin embargo presentaron una determinación de DHEA-S circulante significativamente disminuida en el ciclo de estimulación ovárica tras preparación folicular mediante gestágenos combinados con estrógenos. Ecográficamente no se visualizó una diferencia estadísticamente significativa del RFA entre las dos fases de estudio. No obstante, en las 13 bajas respondedoras que recibieron suplementación hormonal temprana, se contabilizó un RFA moderadamente superior que el visualizado ecográficamente en la fase I.

En el día de la inducción de la ovulación, los valores séricos hormonales correspondientes a LH, A₄, T, E₂ y P₄ determinados en las bajas respondedoras pretratadas con ACOs conjugados con valerato de E₂, no difirieron significativamente respecto a los obtenidos en el ciclo previo de fase I. Estas pacientes presentaron ecográficamente un reducido recuento tanto de folículos preovulatorios como de folículos totales en crecimiento, siendo moderadamente inferior al desarrollo folicular visualizado ecográficamente en el ciclo previo de fase I.

La administración temprana de ACOs conjugados con valerato de E₂, a pesar de no ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo folicular, tampoco aumentó significativamente la cantidad de los folículos puncionados, en comparación al recuento folicular obtenido en la fase I. Sin embargo, mejoró levemente la cantidad y calidad ovocitaria a pesar de no haberse detectado un incremento estadísticamente significativo, respecto al recuento ovocitario recuperado en el ciclo previo en ausencia de preparación

folicular mediante gestágenos combinados con estrógenos. Este moderado aumento de la calidad de los ovocitos, no supuso un incremento estadísticamente significativo de la capacidad ovocitaria fecundante; habiéndose obtenido una tasa de fecundación similar, independientemente de que las bajas respondedoras hubieran recibido o no el pretratamiento de ACOs conjugados con valerato de E₂.

A pesar de transferirse mayoritariamente embriones de subóptima calidad, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la calidad de los embriones únicos o dobles transferidos en el día 2 o día 3 de desarrollo embrionario en las 12 bajas respondedoras que tuvieron transferencia embrionaria, de entre las pacientes aleatorizadas a esta estrategia de preparación folicular.

Finalmente, las bajas respondedoras que tuvieron una preparación folicular mediante gestágenos combinados con estrógenos presentaron una tasa de gestación por ciclo iniciado y de implantación, del 15% y 16,66% respectivamente.

En la **Tabla 9** se resumen los datos comparativos correspondientes a los parámetros clínicos considerados en el día de inicio de la estimulación ovárica, el día de la inducción de la ovulación, y de resultado de ciclo, obtenidos en las pacientes bajas respondedoras analizadas.

RESULTADOS

	Ciclo de EOC sin preparación folicular	Ciclo de EOC tras preparación folicular con ACOs conjugados con valerato de E ₂	Valor de <i>p</i>	
Inicio de la estimulación	FSH (mUI/mL)	7,99±1,74	9,61±1,86	0,568
	DHEA-S (ng/mL)	1.940,77±436,63	1.495,11±336,17	0,023*
	A ₄ (ng/mL)	1,51±0,26	1,27±0,31	0,539
	T (ng/mL)	0,33±0,05	0,37±0,07	0,755
	E ₂ (pg/mL)	48,54±10,71	24,81±5,34	0,255
	Recuento folicular antral	4,25±0,55	5,25±1,01	0,413
	Inducción de la ovulación	LH (mUI/mL)	1,89±0,37	1,39±0,37
A ₄ (ng/mL)		2,50±0,38	2,54±0,35	0,927
T (ng/mL)		0,28±0,05	0,40±0,06	0,178
E ₂ (pg/mL)		917,38±110,94	776,69±110,73	0,338
P ₄ (ng/mL)		0,88±0,40	0,42±0,07	0,299
Nº de folículos ≥16 mm Ø		3,30±0,42	2,38±0,34	0,097
Recuento folicular total		6,23±0,55	5,23±0,57	0,161
Resultado de ciclo	Nº de folículos puncionados	4,38±0,64	3,38±0,38	0,090
	Nº total ovocitos recuperados	2,15±0,42	2,30±0,32	0,721
	Nº de ovocitos en estadio maduro MII recuperados	1,92±0,34	2,07±0,34	0,584
	Tasa de fecundación (%)	90,15	83,30	0,374

Tabla 9.- *Parámetros clínicos evaluados en el día de inicio de la estimulación ovárica controlada, el día de la inducción de la ovulación, y de resultado de ciclo de las pacientes bajas respondedoras aleatorizadas en la estrategia folicular de administración temprana de ACOs conjugados con valerato de E₂. El panel muestra los datos comparativos entre fase I (ciclo de EOC en ausencia de preparación folicular) y fase II (ciclo de EOC tras administración temprana de gestágenos combinados con estrógenos). *p-valor<0,05.*

5.2.3.2.- Parámetros biológicos de la estimulación ovárica controlada

5.2.3.2.1- Determinación del porcentaje de células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresan FSHR y AR, y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de estos receptores

Se cuantificó la cantidad de células de la granulosa CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR y AR, y la intensidad media de fluorescencia emitida por estos receptores existentes en las células de interés, recuperadas de las bajas respondedoras asignadas a esta estrategia de preparación folicular, que finalizaron el ciclo de fase I y fase II.

Los datos obtenidos por citometría de flujo evidenciaron que las células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ recuperadas en las dos fases de estudio, no difirieron significativamente en la cuantificación celular en base al reconocimiento de FSHR (**Figura 25 A**) y AR (**Figura 25 B**). Sin embargo, en la detección de la fluorescencia emitida por los receptores presentes en las células de interés CD45⁻/IP⁺ (**Figura 26 A y B**) se cuantificó una intensidad media de fluorescencia estadísticamente significativa en las células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ entre las dos fases de estudio, según se describe detalladamente a continuación.

En el ciclo de estimulación ovárica previo pretratamiento con gestágenos combinados con estrógenos; se cuantificó una cantidad de 15,81[2,63-65,48] % de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR, y una fluorescencia emitida por dicho receptor de 87,10[33,90-366,00] uaf. Este recuento celular difirió moderadamente al obtenido en el ciclo previo sin preparación folicular, donde se cuantificó un recuento

RESULTADOS

celular levemente incrementado, siendo de un 17,65[5,93-79,22] % de células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺. En tanto que las células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ emitieron una fluorescencia con una intensidad significativamente superior a la cuantificada en la fase I, de 57,25[22,70-171] uaf (p=0,030).

En relación a las células de interés CD45⁻/IP⁺ que expresaron AR, se cuantificó un recuento de 3,53[0,23-17,09] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺, con una intensidad en la emisión de fluorescencia por AR de 6,12[0,07-30,18] uaf, en el ciclo de estimulación ovárica tras pretratamiento de ACOs conjugados con valerato de E2. Esta cuantificación de la cantidad celular fue ligeramente inferior a la detectada en el ciclo previo de fase I, correspondiente a 6,12[0,07-30,18] % de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺. Sin embargo, la fluorescencia emitida por AR en la fase II fue de una intensidad mayor a la cuantificada en el ciclo previo de fase I, de 60,60[16,50-879,00] uaf.

La cuantificación del recuento de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ que expresaron FSHR y AR correspondiente a las dos fases de estudio, sugirieron una ineficiencia de la administración temprana de ACOs conjugados estrógenos sobre la cantidad celular que poseen FSHR y AR. Por el contrario, esta preparación folicular indujo una emisión de la fluorescencia significativamente aumentada en las células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺.

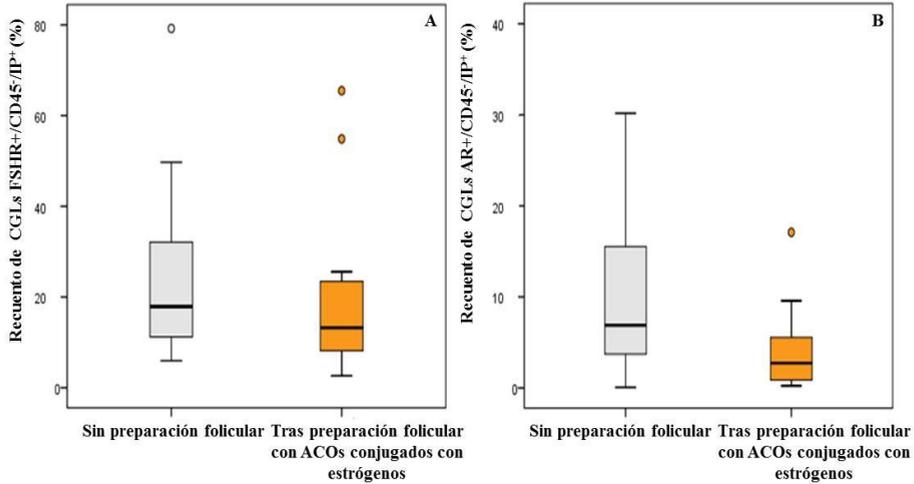


Figura 25.- Recuento de células de la granulosa luteinizadas $CD45^+/IP^+$ identificadas en base a la presencia de $FSHR$ (A) y AR (B), en las pacientes bajas respondedoras que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras administración temprana de ACOs conjugados con estrógenos). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

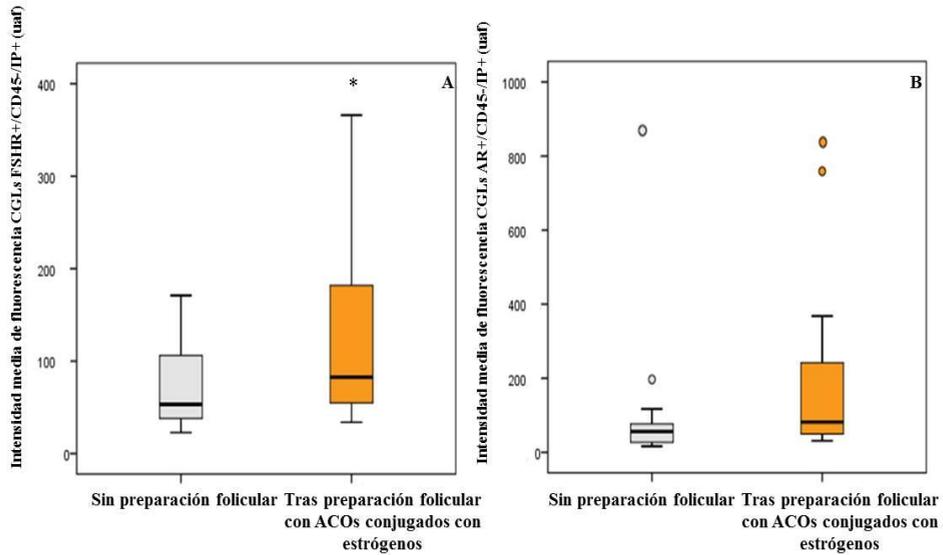


Figura 26.- Intensidad media de fluorescencia emitida por las células de la granulosa luteinizadas CD45⁺/IP⁺ que expresaron FSHR (A) y AR (B), cuantificada en las pacientes bajas respondedoras que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica controlada de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras administración temprana de ACOs conjugados con estrógenos). *p-valor <0,05.

5.2.3.2.2.- Análisis cuantitativo de la expresión génica relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 en las células del cumulus

Una vez identificadas y cuantificadas las células potenciales de la granulosa luteinizadas CD45⁺/IP⁺ que expresaron FSHR y AR, y la intensidad con la que emitieron fluorescencia estos receptores, se analizó la expresión relativa para los genes FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 mediante QF-RT-PCR en las células del cumulus.

De entre las 13 bajas respondedoras aleatorizadas a esta estrategia de preparación foliular que finalizaron el ciclo de fase I y de fase II, se recuperó un ovocito en estadio maduro MII en 10 pacientes. Por ello, el análisis comparativo de la expresión génica relativa se realizó finalmente en 10 bajas respondedoras.

Los valores de ΔCt detectados para *FSHR*, *AR* y *LHCGR* no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, independientemente de haber recibido o no un pretratamiento de gestágenos conjugados con estrógenos (**Figura 27**).

En el ciclo de estimulación ovárica controlada tras la preparación folicular, se cuantificó una cantidad relativa de ARNm para *FSHR* de 16,30[11,11-18,18] ur, para *AR* de 14,28[7,83-12,30] ur y un valor de ΔCt para *LHCGR* de 11,20[6,54-13,56] ur, respectivamente. En tanto que en el ciclo previo de fase I, se obtuvieron unos valores ΔCt moderadamente aumentados para *FSHR* y *LHR/LHCGR*; y ligeramente disminuidos para *AR*. En el ciclo de estimulación ovárica en ausencia de preparación folicular, se cuantificaron unos valores relativos de ARNm para *FSHR* de 16,73[13,69-21,61] ur, y unas concentraciones relativas de ARNm para *AR* y para *LHCGR* correspondientes a 11,56[9,64-16,96] ur y 13,43[12,22-17,50] ur.

La expresión relativa para los genes *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1*, fueron moderadamente superiores en respuesta al pretratamiento con ACOs conjugados con valerato de E_2 respecto a los niveles de ΔCt detectados en el ciclo previo de fase I (**Figura 27**).

La cantidad relativa de ARNm obtenida en el ciclo de estimulación ovárica controlada tras pretratamiento folicular para *StAR* fue de 8,20[1,23-12,44] ur, para *CYP11A1* de 8,28[3,50-14,64] ur y para *CYP19A1* de 9,91[5,30-16,87] ur. En tanto que en el ciclo previo de fase I se cuantificaron unos niveles de expresión relativa génica levemente inferiores; correspondientes a una cantidad relativa de ARNm para *StAR* de 5,17[1,86-11,26] ur, así como un nivel relativo de ARNm para *CYP11A1* y *CYP19A1* de 6,88[3,70-12,63] ur y 8,02[5,50-11,51] ur, respectivamente.

Finalmente, la tasa de cambio cuantificada a través del método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los genes de estudio.

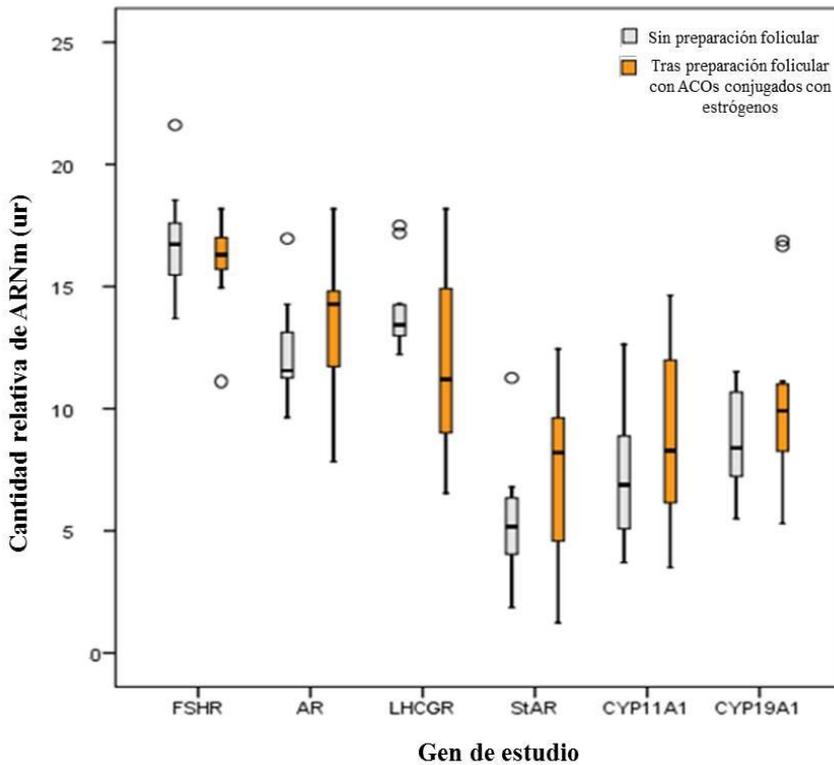


Figura 27.-. Expresión relativa de FSHR, AR, LHR/LHCGR, StAR, CYP11A1 y CYP19A1 normalizada respecto al control endógeno 18S cuantificada mediante QF-RT-PCR en las células del cumulus aisladas de las 10 pacientes bajas respondedoras en las que se obtuvo al menos un ovocito en estadio maduro MII en los dos ciclos de estimulación ovárica controlada. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

5.2.3.2.3.- Determinación de las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ en líquido folicular

Tras el análisis comparativo de los niveles de expresión relativa de los genes de estudio, cuantificados en las células del cumulus, recuperadas en las bajas respondedoras que finalizaron las dos fases del estudio, se procedió a la determinación hormonal en

líquido folicular para evaluar indirectamente la actividad aromatasas y esteroidogénica de estas pacientes.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones hormonales de FSH, LH, A₄ y P₄, independientemente de haber recibido o no un pretratamiento de ACOs conjugados con valerato de E₂. Por contra, las concentraciones hormonales de T y E₂ difirieron significativamente entre las dos fases del estudio, habiéndose obtenido unas estadísticamente elevadas en el ciclo de estimulación ovárica tras preparación folicular.

En la **Tabla 10** se muestran las concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ determinadas en el líquido folicular de las bajas respondedoras aleatorizadas en la estrategia de preparación folicular mediante administración temprana de ACOs conjugados con estrógenos, que fueron evaluadas.

RESULTADOS

Concentración hormonal en líquido folicular	Ciclo de EOC sin preparación folicular	Ciclo de EOC tras preparación folicular con ACOs conjugados con valerato de E ₂	Valor de p
FSH (mUI/mL)	8,08±0,75	7,81±0,77	0,585
LH (mUI/mL)	4,07±0,79	5,76±0,61	0,076
A ₄ (ng/mL)	1,99[0,50-7,73]	1,06[0,50-6,80]	0,575
P ₄ (ng/mL)	14.174,90±3.438,89	19.100,70±14.200	0,181
T (ng/mL)	9,27±1,03	11,88±1,07	0,045*
E ₂ (ng/mL)	581,47±222,82	1.176,35±179,22	0,033*

Tabla 10.- Concentraciones hormonales de FSH, LH, A₄, P₄, T y E₂ cuantificadas en el líquido folicular de las pacientes bajas respondedoras, que finalizaron el ciclo de estimulación ovárica de fase I (en ausencia de preparación folicular) y de fase II (tras suplementación temprana de ACOs conjugados con estrógenos). * p-valor <0,05.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

El ambiente folicular de las pacientes bajas respondedoras representa ser un escenario hormonal paradójico, debido a la insuficiente sensibilidad folicular de respuesta a los niveles suprafisiológicos de FSH circulantes. La disminución en la cantidad de receptores para la FSH presentes en las células de la granulosa, podría subyacer en dicha limitación de respuesta o en la desensibilización folicular, comprometiendo la respuesta folicular ante un aporte de FSH exógeno.

Son sumamente reducidos los estudios científicos que abordan la baja respuesta ovárica en función de parámetros biológicos. En la actualidad se ha profundizado el estudio de la reserva ovárica a través de una aproximación biológica mediante técnicas de alta biotecnología. Chin y colaboradores informaron por primera vez, tras analizar 5.300 genes, de una expresión génica diferencial en las células de la granulosa, en función de la reserva ovárica de las pacientes incluidas. Los niveles de expresión génica diferencialmente alterados descritos en las pacientes con disminuida reserva ovárica, se asociaron fundamentalmente a procesos biológicos que comprometían la viabilidad y la competencia de las células foliculares (Chin et al., 2002).

Recientemente diferentes autores han corroborado una expresión génica diferencial asociada a la función ovárica. En concreto se han propuesto genes íntimamente relacionados con el desarrollo gonadal, el ciclo ovárico, la foliculogénesis, la madurez ovocitaria y con la capacidad fecundante de la mujer. Sin embargo, no se ha alcanzado a establecer una sólida correlación de la baja respuesta ovárica con un conjunto determinado de genes asociados tanto a procesos biológicos específicos como a funciones celulares, implicados en la disminución de la reserva ovárica o que pudieran subyacer en dicha patología (Greenseid et al., 2011; May-Panloup et al., 2012; Skiadas et al., 2012). Del mismo modo, otros autores han abordado el estudio de las sustituciones de un único nucleótido existentes en los receptores de las gonadotropinas, que pudieran estar asociados a una reserva ovárica comprometida y ser considerados marcadores predictivos de la respuesta ovárica (Gerasimova et al., 2010; La Marca et al., 2013).

En los últimos años, el esfuerzo clínico se ha focalizado en el manejo clínico de la paciente baja respondedora mediante diferentes tratamientos adyuvantes a los protocolos de estimulación ovárica controlada convencionalmente ensayados. El propósito de tal fin es la mejora de la sensibilidad folicular y ovárica para alcanzar una conveniente sincronización del reclutamiento folicular, a través de la intervención y manipulación del entorno intrafolicular e intraovárico que exhiben estas pacientes.

De entre las diferentes terapias farmacológicas adyuvantes consideradas para el aumento de la mejora del rendimiento ovárico, cabe destacar la estrategia de androgenización del ambiente folicular. Los andrógenos administrados ejercen un efecto sinérgico con la FSH durante la foliculogénesis, promueven la expresión de FSHR en las células de la granulosa, y regulan positivamente la proliferación y crecimiento de los folículos. También se ha descrito que los andrógenos incrementan la respuesta folicular a las gonadotropinas, además de ser potenciadores de la diferenciación folicular a través de AR, así como el principal sustrato para la biosíntesis de estrógenos. En concreto, la suplementación con testosterona en gel o en parches transdérmicos en las pacientes bajas respondedoras, ha proporcionado esperanzadores resultados clínicos según han informado diferentes autores (Balasch et al., 2006; Kim et al., 2011b).

Un segundo abordaje farmacológico adyuvante destacable es la manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada convencional. Esta estrategia se basa en la hipótesis de que el reclutamiento folicular se inicia durante la fase lútea tardía, prolongándose durante la fase folicular temprana del siguiente ciclo ovárico. Específicamente, la administración temprana de estrógenos, debida a la acción de retroalimentación negativa que ejercen sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal, modulan la secreción lútea gonadotrópica, provocando una disminución en las variaciones interciclo de los niveles de FSH. En consecuencia, se favorece una prolongación de la ventana del reclutamiento folicular y la sincronización de la proliferación folicular. Esta temprana suplementación estrogénica oral o transdérmica, ha ofrecido prometedores resultados en la mejora de la eficacia del rendimiento ovárico de las pacientes bajas respondedoras según se ha publicado en diferentes estudios (Dragisic et al., 2005; Frattarelli et al., 2008b; Hill et al., 2009).

La sincronización de los folículos en proliferación también se puede alcanzar mediante la administración temprana de un anovulatorio, que debida a su actividad estrogénica y gestágena, ejerce una modulación en el eje hipotálamo hipofisario gonadal, enlenteciendo la secreción pulsátil gonadotrópica. A su vez se ha descrito, un papel de los anovulatorios en la coordinación de la proliferación de los folículos en crecimiento. Por estas razones, los ACOs se han considerado como tratamiento adyuvante de la estimulación de los ovarios de las pacientes bajas respondedoras (Fisch et al., 1996; Kim et al., 2009).

En base a la mejora de la eficacia ovárica proporcionada por las estrategias adyuvantes ensayadas individualmente por diferentes investigadores, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se postuló que la administración temprana de hormonas esteroideas sexuales, pudiera proporcionar un adecuado ambiente folicular y ejercer un efecto beneficioso sobre la respuesta ovárica.

Esta posible mejora de la sensibilidad folicular y del rendimiento ovárico alcanzada tras la preparación folicular, hipotetizamos que pudiera ser explicada por un incremento de la actividad de FSHR y de la aromatasas. Así pues se pretendió evaluar si dicho incremento en la actividad FSHR pudiera ser debida a un aumento en la cantidad de receptores celulares FSH y AR de las células de la granulosa. Del mismo modo, como parámetros indicadores de un incremento de la actividad aromatasas, hipotetizamos que dicha mejora podría ser consecuencia de un incremento en la expresión relativa de los genes codificantes de los principales receptores y enzimas implicados en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica. A su vez, en términos globales se esperaba que la posible disfuncionalidad de la enzima aromatasas y del proceso esteroidogénico que pudiera acontecer en los ovarios de las pacientes bajas respondedoras, se revirtiese tras la suplementación hormonal temprana. A consecuencia de la plausible restauración de la actividad enzimática de la aromatasas, se determinarían unos adecuados niveles de E₂ en líquido folicular, que reflejarían una correcta dinámica folicular.

Con el propósito de contrastar nuestra hipótesis de una posible modulación proteica y génica en las células foliculares de las pacientes bajas respondedoras, debida a la preparación folicular mediante la administración temprana de hormonas esteroideas sexuales, se hizo necesario abordar en términos biológicos el estudio de la respuesta ovárica. Por ello, nuestro estudio se focalizó fundamentalmente en la identificación de las

células potenciales de la granulosa luteinizadas que expresaron FSHR y AR, en la cuantificación de la expresión génica diferencial de las células del cúmulus, y en la determinación de los niveles hormonales en el líquido folicular. No obstante se tuvo en mente la limitación metodológica de trabajar con células foliculares ya luteinizadas y que por tanto, difieren de aquellas que verdaderamente experimentan y se exponen a la administración de los andrógenos, estrógenos o gestágenos combinados con estrógenos. Asimismo, se hizo necesario proceder metodológicamente con suspensiones celulares preaisladas de los líquidos foliculares, libres de componentes contaminantes constituidos fundamentalmente por células sanguíneas e inmunitarias.

Es sumamente destacable que en la actualidad no se ha publicado ningún estudio prospectivo, aleatorizado y controlado realizado en pacientes bajas respondedoras, en el que se comparen clínica y biológicamente las tres estrategias adyuvantes de preparación folicular ensayadas. Por esta razón el ensayo clínico sobre el que se vertebra fundamentalmente el presente trabajo de Tesis Doctoral; constituye ser un trabajo pionero y novedoso en el abordaje clínico y biológico de la baja respuesta ovárica.

Tan sólo se han publicado dos trabajos retrospectivos que comparan la eficacia de dos estrategias adyuvantes, concernientes a la manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada y a la androgenización del ambiente folicular.

Detalladamente, Shastri y colaboradores en un estudio retrospectivo con cohortes, compararon en 186 pacientes bajas respondedoras menores de 35 años, la eficacia de la administración lútea de ACOs con la temprana aplicación de E₂ transdérmico en parches. A pesar de obtener un desarrollo ovocitario similar entre los dos pretratamientos adyuvantes, en las bajas respondedoras que se administraron E₂ transdérmico, se informó de un incremento significativo de la cantidad de embriones transferibles, así como una ligera mejora en las tasas de implantación y de gestación clínica por ciclo iniciado (Shastri et al., 2011).

Elassar y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo, comparativo entre el tratamiento adyuvante correspondiente a la administración del inhibidor de la aromataasa letrozol y el pretratamiento de E₂ transdérmico, en 90 pacientes con historia previa de inadecuada respuesta ovárica. En las pacientes suplementadas con estrógenos se recuperó una cantidad y calidad ovocitaria significativamente mayor; a pesar de que ambas

estrategias adyuvantes no ofrecieron diferencias estadísticamente significativas en las tasas clínicas de resultado de ciclo (Elassar et al., 2011).

Asimismo, en la literatura científica se han publicado dos revisiones sistemáticas y de metaanálisis que evalúan la eficacia de diferentes tipos de estrategias adyuvantes para la androgenización del ambiente folicular de las pacientes bajas respondedoras. Sunkara y colaboradores compararon la eficacia de la administración de DHEA, de testosterona transdérmica o del inhibidor de la aromatasas letrozol, sobre la respuesta ovárica de dichas pacientes. Los resultados globales obtenidos permitieron concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en las variables ovocitarias, embriológicas y de resultado de ciclo, independientemente de haber recibido o no el tratamiento adyuvante de letrozol. Por el contrario, el pretratamiento con DHEA o testosterona transdérmica ofrecieron una mejora significativa en las tasas de gestación clínica y de recién nacido vivo (Sunkara et al., 2011). Del mismo modo, Bosdou y colaboradores analizaron diferentes estrategias adyuvantes y de androgenización ensayadas en pacientes con baja respuesta ovárica, incluyendo la administración del inhibidor de la aromatasas letrozol, de DHEA y de testosterona transdérmica, entre otras estudiadas. Se informó que tan sólo se alcanza una mejora plausible en las tasas de gestación clínica y de recién nacido vivo con el pretratamiento de testosterona transdérmica (Bosdou et al., 2012).

Otro desafío que plantea el estudio de la paciente baja respondedora, concierne a su correcta identificación *a priori* en base a parámetros predictivos de desarrollar un insuficiente crecimiento folicular e inadecuado rendimiento ovárico; probablemente debido a una insensibilidad ovárica de respuesta a la administración exógena de gonadotropinas.

Diferentes autores han considerado numerosos criterios para la caracterización y catalogación de las pacientes con sospecha de presentar una baja respuesta ovárica. Entre los diferentes criterios identificativos considerados en la práctica clínica, cabe destacar fundamentalmente la edad avanzada de la paciente, exhibir determinaciones séricas hormonales alteradas, un reducido reservorio folicular así como haber tenido un episodio previo de cancelación de ciclo. Sin embargo, no fue hasta el año 2010 cuando se consensuaron los parámetros definitorios, reconocidos conjuntamente como el criterio de Bolonia, por el que se estableció la identificación y definición de la paciente con baja respuesta ovárica a un protocolo de estimulación ovárica controlada (Ferraretti et al., 2011).

Una desventaja que representa la paciente con reserva ovárica disminuida y potencialmente baja respondedora, o con inadecuada respuesta ovárica previa, es que *per se* afecta al resultado de ciclo de las TRA. Por ello es sumamente importante la elección de una óptima pauta farmacológica de estimulación ovárica, supresión hipofisaria e inducción de la ovulación, que garantice el máximo reclutamiento folicular posible de manera sincrónica.

En este sentido, y en base a un pronóstico establecido de reserva ovárica disminuida o sospecha de pobre respuesta ovárica de la paciente, se han descrito ampliamente numerosas estrategias terapéuticas ensayadas de estimulación ovárica controlada. Las revisiones sistemáticas y de metaanálisis publicadas, no han establecido una pauta común consensuada de estimulación ovárica controlada que garantice un adecuado desarrollo folicular y apropiado rendimiento ovárico. Ello es debido en gran medida, a la falta de consenso y homogeneidad en la definición e identificación de la paciente baja respondedora, al tamaño muestral considerado, y a la heterogeneidad de los protocolos de estimulación ensayados y de las variables principales de estudio.

En los criterios de inclusión de la fase I para la identificación de las verdaderas bajas respondedoras entre aquellas pacientes con sospecha de inadecuada respuesta ovárica, se consideraron cuatro marcadores predictivos asociados al diagnóstico de reserva ovárica disminuida, ampliamente aceptados. De entre los diferentes criterios pronósticos existentes, se decidió incluir la edad reproductiva avanzada de la mujer (≥ 38 años), debido a la íntima relación existente entre la disminución de la capacidad fecundante y reproductora con la edad cronológica de la mujer. También se consideró un reducido RFA en condición basal (≤ 6 folículos antrales), al ser un reflejo directo de la reserva ovárica funcional. Y también se propusieron unos valores séricos basales alterados de FSH (≥ 10 mUI/mL) y de AMH (≤ 5 pM), al haberse establecido su íntima asociación con la reserva ovárica.

La población de estudio se seleccionó correctamente al haberse detectado una distribución homogénea en los parámetros diagnósticos de reserva ovárica disminuida y en las características de anamnesis. La subpoblación de pacientes con baja respuesta ovárica confirmada se identificó convenientemente en base a las diferencias estadísticamente significativas obtenidas respecto a las pacientes normo-respondedoras. Específicamente se detectó una elevada concentración sérica de FSH y disminuido recuento folicular en el día

de inicio de la estimulación ovárica. También se obtuvieron unos reducidos niveles circulantes de E_2 y un comprometido recuento de folículos preovulatorios en el día de la inducción de la ovulación. En tanto que en el día de la punción aspiración folicular, se alcanzó una inadecuada recuperación folicular y ovocitaria. Los valores significativamente reducidos obtenidos en estas variables clínicas evidenciaron un rendimiento ovárico disminuido, corroborando su perfil de paciente con baja respuesta ovárica confirmada.

Las pacientes potencialmente bajas respondedoras, sorprendentemente no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células de interés $CD45^+/IP^+$ que expresaron FSHR, ni en la intensidad media de fluorescencia emitida por FSHR, independientemente del tipo de respuesta ovárica presentada. Sin embargo, el recuento de células de la granulosa luteinizadas que expresaron AR y la intensidad de fluorescencia emitida por este receptor fue significativamente superior en las pacientes verdaderas bajas respondedoras.

Estas observaciones corroboran los resultados obtenidos por Thiruppathi y colaboradores, que informaron tanto de una proporción celular como de una intensidad media de fluorescencia cuantificada en las células de la granulosa positivas para FSHR, similar entre pacientes normo y bajas respondedoras (Thiruppathi et al., 2001). Por el contrario, nuestros datos de citometría de flujo difieren a los resultados publicados por Nielsen y colaboradores, en relación a la correlación descrita entre la expresión de FSHR y de AR en las células de la granulosa (Nielsen et al., 2011). La discrepancia con nuestros resultados se explica debido a que el incremento del recuento de células $AR^+/CD45^+/IP^+$ obtenido, no se ha asociado con la cantidad de células de interés positivas para FSHR. Los datos que se han obtenido sugieren que puede existir una posible alteración en la sensibilidad de los FSHR ante el aporte exógeno de FSH o concurrir una ineficacia de la LH endógena disponible en el ambiente, sobre la inducción de la expresión de nuevos FSHR en las células de la granulosa; además de una deficiente o alterada coordinación funcional entre FSHR y AR de los folículos maduros.

En las células del cumulus procedentes de la subpoblación de pacientes que exhibieron una inadecuada respuesta ovárica, se determinó una menor expresión génica para *LHR/LHCGR* y se cuantificó una cantidad relativa de ARNm estadísticamente superior para AR y significativamente inferior para StAR y CYP11A1, respecto a las cantidades

relativas de ARNm cuantificadas para los genes de estudio en las pacientes normo-respondedoras.

El leve descenso de la expresión de *LHR/LHCGR* detectado no concuerda con los resultados reportados por Maman y colaboradores. Estos autores describieron por QF-RT-PCR una expresión génica aumentada de *LHR/LHCGR* en las células del cumulus de pacientes bajas respondedoras, correlacionándose con una disfuncionalidad ovocitaria y disminuida tasa de fecundación (Maman et al., 2012), siendo ambas variables embriológicas alteradas, características de las pacientes bajas respondedoras. Sin embargo, nuestros datos difieren al análisis de expresión génica diferencial de Skiadas y colaboradores en el que se informó de una expresión diferencialmente significativa de *LHR/LHCGR*, entre otros genes, en pacientes con inadecuada respuesta ovárica, asociándose con el proceso de luteinización temprana (Skiadas et al., 2012).

En relación a la cantidad relativa de ARNm cuantificada para *StAR* y *CYP11A1* significativamente disminuida obtenida en las pacientes verdaderas bajas respondedoras, sugiere una expresión génica diferencial que se asemeja a los datos obtenidos por Phy y colaboradores. Estos autores mediante la técnica de análisis por inmunoblot sí detectaron una reducción del nivel proteico de hasta el 17% de StAR (Phy et al., 2002). La cuantificación de la expresión relativa génica para *FSHR* obtenida en las células del cumulus mediante QF-RT-PCR, difiere con los resultados publicados por González-Fernández y colaboradores, que informaron de una expresión génica significativamente aumentada de *FSHR*. Por el contrario, es acorde a la expresión relativa génica obtenida de *CYP19A1* entre pacientes con baja y adecuada respuesta ovárica, en donde no detectan diferencias estadísticamente significativas (Gonzalez-Fernandez et al., 2011).

Las concentraciones levemente aumentadas de FSH y P₄ determinadas en el líquido folicular de las pacientes verdaderas bajas respondedoras es acorde a los resultados obtenidos por De los Santos y colaboradores. Estos autores proponen que el nivel intrafolicular existente de FSH podría ser el responsable de la síntesis de P₄ en una acción combinada de los dos tipos de células foliculares. Por el contrario, la determinación disminuida de LH que informan, reflejo de un posible reservorio folicular alterado, difiere a la obtenida en la subpoblación de las verdaderas bajas respondedoras (de los Santos et al., 2013). A su vez, el moderado aumento determinado en la concentración de P₄ en el líquido

folicular de las pacientes con baja respuesta confirmada no alcanza una significancia tal que pudiera explicar una posible luteinización de los folículos maduros. Por el contrario, la determinación hormonal de A_4 y T significativamente disminuida obtenida en las pacientes bajas respondedoras, es acorde a la obtenida por García-Velasco en las bajas respondedoras que no recibieron una suplementación con letrozol respecto a las que sí lo fueron y que presentaron un adecuado rendimiento ovárico (García-Velasco et al., 2005).

El análisis clínico y biológico comparativo de la respuesta ovárica alcanzada tras preparación folicular correspondiente a la fase II, respecto al ciclo previo de fase I, se realizó en aras de esclarecer el efecto de las estrategias adyuvantes ensayadas, sobre el rendimiento ovárico de las pacientes verdaderas bajas respondedoras.

La estrategia de preparación folicular mediante suplementación de testosterona transdérmica en parches durante 7 días de la fase lútea previos al ciclo de estimulación ovárica controlada, ofreció un aumento estadísticamente significativo del número de folículos puncionados, de la cantidad relativa de ARNm para *AR*, del nivel de E_2 en líquido folicular; así como una aceptable tasa de embarazo clínico por ciclo iniciado del 31%.

El tratamiento adyuvante con andrógenos, a pesar de haber proporcionado una mejora significativa del recuento de folículos puncionados, no proporcionó una cantidad y calidad ovocitaria estadísticamente incrementada, en comparación al desarrollo folicular y ovocitario alcanzado en el ciclo previo en ausencia de preparación folicular. Estos resultados clínicos son acordes al trabajo publicado por Balasch y colaboradores, que consiguen un reclutamiento folicular de hasta 5 veces superior y una tasa de gestación clínica por ciclo iniciado del 24% tras la administración de parches de testosterona transdérmica (Balasch et al., 2006). Del mismo modo que con el estudio de Fábregues y colaboradores, en el que a pesar de no detectar diferencias estadísticamente significativas en las variables clínicas y de resultado de ciclo, informan de una mejora del desarrollo ovocitario tras la aplicación de testosterona transdérmica en parches (Fabregues et al., 2009). Los datos obtenidos concuerdan con las descripciones previas de otros autores en relación al aumento del número de folículos preantrales y antrales en crecimiento reclutados tras un aporte exógeno de andrógenos.

En términos biológicos, la suplementación de testosterona transdérmica no implicó un incremento en la cantidad de células de la granulosa luteinizadas que expresaron FSHR

ni en la fluorescencia emitida por FSHR, respecto al recuento de células FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺ obtenido en el ciclo previo de fase I. Sin embargo sí se cuantificó una leve mayor cantidad celular de AR⁺/CD45⁻/IP⁺ tras suplementación androgénica. Los resultados proporcionados por la citometría de flujo difieren de las observaciones realizadas por diferentes autores en relación a un aumento de la expresión de FSHR promovida ante un aporte exógeno de andrógenos. Estudios *in vitro* realizados en células de la granulosa, han informado de una modulación de la expresión de FSHR de manera dosis dependiente, debida a una suplementación exógena de T; habiéndose descrito un estancamiento del aumento de la expresión de FSHR a elevadas dosis de T (Garcia-Velasco et al., 2012).

La preparación folicular con andrógenos no varió significativamente las cantidades relativas de ARNm para los genes de estudio en las células del cumulus, a excepción de los niveles significativamente elevados cuantificados para AR, en comparación a los detectados en el ciclo previo de estimulación en ausencia de preparación folicular. Estudios previos realizados en primates y en humanos han corroborado una correlación positiva de los niveles de ARNm para AR con la proliferación de las células de la granulosa de los folículos antrales, además de un aumento de la sensibilidad folicular a la FSH potenciada por los andrógenos a través de AR (Weil et al., 1999; Nielsen et al., 2011). En base al moderado aumento del recuento de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺ y de la expresión relativa génica de AR significativamente incrementada, en combinación a la mejora del reclutamiento folicular, se sugiere que los andrógenos aportados podrían haber ejercido un efecto paracrino sobre sus propios receptores presentes en las células de la granulosa. Dicha acción podría haber promovido, a través de los AR existentes, el desarrollo de los folículos en crecimiento, además de haber estimulado moderadamente la producción de progesterona y de actuar como sustrato de la aromatasa.

En concreto, la acción estimuladora de los andrógenos aportados ejercida a través de su AR específico, podría reflejarse indirectamente por los niveles hormonales de P₄, T y E₂ determinados en el líquido folicular. Los valores cuantificados de estas hormonas esteroideas sexuales fueron sustancialmente elevados respecto a las determinaciones obtenidas en el ciclo previo en ausencia de aporte androgénico; lo que apoyaría el efecto estimulador paracrino propuesto de los andrógenos.

La segunda estrategia ensayada de preparación folicular correspondiente a la administración temprana de 17β -E₂ micronizado transdérmico durante los 11 días previos al ciclo de estimulación ovárica controlada, ofreció una mejora clínica estadísticamente significativa del desarrollo folicular y ovocitario. Sin embargo, no moduló significativamente la cantidad de receptores de las células de la granulosa luteinizadas, ni la fluorescencia emitida por éstos, ni la cantidad relativa de ARNm para los genes de estudio en las células del cumulus.

La suplementación temprana de estrógenos ejerció una correcta retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal, haciéndose evidente por una significativa disminución de la concentración de FSH en condición basal. La adición de estrógenos incrementó significativamente la cantidad de folículos en desarrollo, lo que se tradujo en un recuento folicular y ovocitario recuperado estadísticamente superior respecto al obtenido en el ciclo previo de fase I. Estos resultados clínicos, a pesar de no haber evidenciado una mejora de la calidad embrionaria, concuerdan con los proporcionados por Dragisic y colaboradores. Estos autores informaron de una mejora significativa del desarrollo ovocitario y del recuento de embriones óptimos transferibles tras la administración de 17β -E₂ micronizado transdérmico en parches (Dragisic et al., 2005). Por el contrario, los datos clínicos obtenidos son opuestos a los descritos por Weitzman y colaboradores, que informaron de una ineficiencia de la administración transdérmica de estrógenos sobre el rendimiento ovárico (Weitzman et al., 2009). Los resultados obtenidos sugieren que los estrógenos administrados podrían haber ejercido una función autocrina sobre las propias células de la granulosa, estimulando su proliferación y promoviendo una correcta orquestación del reclutamiento folicular antral, favoreciendo una sincronización de la sensibilidad folicular intrínseca a la FSH, y con ello un aumento del desarrollo folicular.

En relación a las variables biológicas evaluadas, la administración de 17β -E₂ micronizado transdérmico no incrementó significativamente la cantidad de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ que expresaron los receptores celulares FSHR y AR, respecto al recuento celular cuantificado en la fase I. Los datos proporcionados por la citometría de flujo podrían sugerir que los estrógenos administrados, no alcanzan a estimular a las células de la granulosa para que se incrementen los FSHR y LHR/LHCGR presentes en los folículos maduros. Debido a esta ineficiencia de los estrógenos aportados

exógenamente en aumentar la cantidad de FSHR, la mejora del desarrollo folicular y ovocitario observada podría ser explicada más por una correcta unión ligando-receptor que por la cantidad de receptores celulares existentes.

En el ciclo de estimulación ovárica tras pretratamiento de estrógenos, se obtuvo unas cantidades relativas de ARNm para *FSHR* y *LHR* moderadamente disminuidos y ligeramente aumentados de *AR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1*, en comparación al ciclo previo de fase I. Estas observaciones sugieren que, el aporte temprano de 17β -E₂ micronizado transdérmico tampoco indujo en las células del cumulus un aumento en la expresión de los receptores celulares, con los que poder alcanzar una mayor captación gonadotrófica que compense los reducidos niveles endógenos de FSH y LH, resultantes por el efecto de retroalimentación negativa ejercido por los estrógenos administrados. Asimismo, el leve aumento de la cantidad relativa de ARNm para *CYP11A1* y *CYP19A1* cuantificada en la fase II, podría influir moderadamente en la biosíntesis de estrógenos.

En concreto, los niveles hormonales estadísticamente incrementados de T y de E₂ determinados en el líquido folicular recuperado tras la preparación folicular con estrógenos, reflejarían una correcta actividad aromatasa y correcta biosíntesis hormonal esteroidea. La adecuada funcionalidad en ambos procesos biológicos, en combinación a la ligera disminución de FSH intrafolicular obtenida, podría explicar el correcto desarrollo folicular alcanzado, así como reflejar indirectamente el descenso de las variaciones interciclo de la FSH endógena, respectivamente.

La tercera estrategia de preparación folicular ensayada correspondiente a la administración de ACOs conjugados con valerato de E₂ durante dos ciclos previos al ciclo de estimulación ovárica controlada, no alcanzó a implementar significativamente el rendimiento ovárico en términos de desarrollo folicular y ovocitario.

Los ACOs conjugados con estrógenos administrados ejercieron correctamente su acción de retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo hipofisario gonadal al disminuir la secreción pulsátil gonadotropa; a pesar de no haberse detectado una significativa disminución en el nivel sanguíneo de FSH en condición basal. Asimismo, se evidenció un mayor frenado ovárico en las pacientes asignadas a este pretratamiento folicular, al haberse determinado una concentración sérica de E₂ ligeramente disminuida en el día de la inducción de la ovulación. Sin embargo no se comprometió el reclutamiento de

los folículos en crecimiento, habiéndose reflejado en un moderado desarrollo folicular y ovocitario. Los datos clínicos obtenidos concuerdan con los descritos por otros autores (al-Mizyen et al., 2000; Kovacs et al., 2001; Duvan et al., 2008). Se ha informado en pacientes bajas respondedoras, de una ineficiencia sobre la respuesta folicular y ovocitaria, y en las tasas clínicas de resultado de ciclo, tras la temprana administración oral de ACOs; contradiciendo el efecto beneficioso sobre el rendimiento ovárico de estas pacientes descrito por otros autores (Fisch et al., 1996; Kim et al., 2011b). Los datos obtenidos de las variables clínicas evaluadas podrían sugerir una ineficiencia en la sincronización de los folículos en crecimiento durante su reclutamiento, probablemente debido a los 6 días transcurridos desde la última toma de ACO y el inicio de la administración de FSHr. Durante ese intervalo de tiempo, el efecto supresor ovárico se habrá prolongado, además de haberse disminuido la sincronización del reclutamiento de aquellos folículos que exhibiesen una sensibilidad intrínseca superior al valor umbral de FSH, y en consecuencia, haberse producido la selección de un folículo dominante. Este supuesto evidenciaría que la respuesta ovárica de estas pacientes ha sido excesivamente susceptible a la supresión endógena gonadotrópica.

La temprana administración de ACOs conjugados con valerato de E₂ no ejerció un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de células de la granulosa luteinizadas CD45⁻/IP⁺ positivas para FSHR y AR, a excepción de una significativa mayor intensidad de fluorescencia emitida por FSHR⁺/CD45⁻/IP⁺, respecto al ciclo previo de fase I. Los datos de citometría de flujo podrían sugerir que ante un reducido nivel de FSH endógena y de concentraciones séricas de andrógenos en condiciones basales, no se induce un aumento de la cantidad de FSHR y AR en las células de la granulosa de los folículos maduros. Sin embargo, más bien podría estar modulándose la sensibilidad de estos receptores, lo que se refleja por una intensidad media de fluorescencia emitida por FSHR estadísticamente elevada y moderada en AR.

En relación a las cantidades relativas de ARNm cuantificadas de los genes de estudio, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las dos fases. Tras el pretratamiento con ACOs conjugados con estrógenos, en las células del cumulus se cuantificaron unos niveles relativos de expresión génica moderadamente inferior para *FSHR* y *LHR/LHCGR*, y levemente superior de *AR*, *StAR*, *CYP11A1* y *CYP19A1* respecto a

los observados en el primer ciclo en ausencia de preparación folicular. El patrón de expresión génica obtenido es similar al detectado en las células del cumulus recuperadas en la estrategia de preparación folicular mediante la administración temprana de 17β -E₂ micronizado transdérmico; sugiriendo que en este tipo de células foliculares tampoco se induce una expresión de FSHR, LHR/LHCGR y AR que permita una mayor captación de ligando. El leve aumento de la expresión relativa de los genes codificantes de las principales enzimas esteroidogénicas se reflejó en las elevadas concentraciones hormonales de P₄, T y E₂ obtenidas en el líquido folicular.

El abordaje comparativo del rendimiento ovárico de las pacientes verdaderas bajas respondedoras, sometidas a preparación folicular, mediante manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada, no ha evidenciado una eficacia prevalentemente significativa de las tasas clínicas, de resultado de ciclo o de las variables biológicas, en cualquiera de las tres estrategias ensayadas.

Asimismo se sugiere que la preparación folicular pudiera tener un mayor efecto en la sincronización de los folículos en proliferación cuando el tratamiento adyuvante se iniciase varios ciclos ováricos previos al propio ciclo de estimulación, según se evidencia en los esperanzadores estudios realizados en pacientes bajas respondedoras suplementadas prolongadamente con DHEA. De ese modo, se abarcaría una mayor cantidad de folículos potenciales a ser reclutados, que posteriormente proliferarían en correcta sincronización.

No obstante cabe resaltar la adecuada tasa de gestación clínica y de expresión génica relativa de AR alcanzada con el pretratamiento de testosterona transdérmica, y la significativa recuperación folicular y ovocitaria conseguida con la suplementación temprana de 17β -E₂ micronizado transdérmico. Sin embargo, estas mejoras del rendimiento ovárico, no se han podido explicar en base a un aumento de la cantidad de receptores y de la modulación de la expresión génica de las células foliculares o de la mejora de la actividad aromataasa. Por ello se postula que pudiera existir tanto una disfuncionalidad como una desregulación en las células foliculares de las pacientes bajas respondedoras, que potencialmente pudiera subyacer en una sensibilidad folicular alterada de respuesta ante un aporte exógeno de gonadotropinas o de hormonas esteroideas sexuales.

También se postula un papel clave de AR en la respuesta ovárica de las pacientes bajas respondedoras estudiadas. Según los datos obtenidos en la fase I, el inadecuado

desarrollo folicular y ovocitario descrito en las pacientes verdaderas bajas respondedoras, se puede asociar estadísticamente a un incremento en la cantidad de células AR⁺/CD45⁻/IP⁺, a un aumento en la intensidad de fluorescencia emitida por AR presentes en las células de la granulosa, y a un mayor nivel de expresión de AR en las células del cumulus. Sin embargo, los datos de la fase II correspondientes al pretratamiento folicular mediante andrógenos, sugieren que el nivel de expresión de AR en las células de la granulosa se revierte, mientras se mantiene significativamente incrementado AR en las células del cumulus. Esta dinámica diferencial de la expresión de AR dependiente del tipo de célula folicular en el que esté presente podría asociarse con el desarrollo folicular. En concreto, la plausible mejora del recuento folicular reclutado obtenido con dicha estrategia de preparación folicular, podría ser debida al mantenimiento de una expresión elevada de AR en las células del cumulus. Por el contrario, en la estrategia de preparación folicular mediante administración temprana de estrógenos, a pesar de la significativa mejora del rendimiento ovárico alcanzado, los niveles de expresión obtenidos de AR en las células de la granulosa y del cumulus no se diferencian respecto a los cuantificados en el ciclo previo en ausencia de administración lútea hormonal. Estas observación poría confirmar el papel paracrino que ejercen los andrógenos a través de AR y la función autocrina de los estrógenos administrados.

Cabría destacar que el putativo papel potenciador de los andrógenos a través de AR que se propone, ejercería una acción diferente a la que puede ocurrir en las pacientes con SOP. Estas pacientes, caracterizadas por presentar unos elevados niveles intrafolículos de LH y de andrógenos, y una expresión elevada de AR, tienen riesgo de experimentar una respuesta ovárica exagerada a la administración exógena de gonadotropinas, manifestándose en el síndrome de hiperestimulación ovárica. Sin embargo en las pacientes verdaderas bajas respondedoras, a pesar de presentar un incremento significativo de la expresión de AR, la respuesta ovárica a la administración exógena de gonadotropinas es comprometida. Pudiera ser necesario un correcto balance de la cantidad de AR presente en las células de la granulosa y del cumulus, esencial en las primeras etapas de la foliculogénesis y que no comprometiera al posterior reclutamiento folicular.

Un mecanismo patológico alternativo potencialmente subyacente en la baja respuesta ovárica pudiera ser un incorrecto desencadenamiento de las vías de señalización

inducidas tras la unión de FSH y de LH a sus receptores específicos. Una de las vías de señalización más característica que desencadena la unión de las gonadotropinas hipofisarias a FSHR y a LHR/LHCGR, involucra la activación de segundos mensajeros tales como AMPc, e induce un incremento del calcio intracelular y la participación de proteinquinasas de serina-treonina dependientes de APMc (Richards, 1994; George et al., 2011). Una aproximación para el estudio de las proteinquinasas podría realizarse mediante el análisis de la fosforilación de la proteína StAR inducida por estos intermediarios, o a través de la medición de la concentración del calcio intracelular mediante microfluorometría confocal. Para ello, y debido a la limitante celularidad existente en los líquidos foliculares aislados de cada paciente, se requeriría haber realizado estudios *in vitro* de las células de la granulosa luteinizadas preaisladas.

La menor funcionalidad de los receptores FSHR y LHR/LHCGR obtenida en las pacientes verdaderas bajas respondedoras también puede ser adicionalmente abordada en términos de alteraciones genéticas. Recientemente se han descrito 3 tipos de polimorfismos en FSHR que afectan a un único nucleótido, susceptibles de ser asociados con la respuesta ovárica. Por el contrario, a pesar de una microdelección homocigota referenciada en pacientes con resistencia ovárica, no se ha informado de la existencia de ningún polimorfismo localizado en el gen *LHR/LHCGR* asociado con la reserva ovárica (La Marca et al., 2013). En relación a los genes codificantes de las principales enzimas esteroidogénicas ovárica, se ha postulado una posible modulación sobre la respuesta ovárica debida al efecto de algunos polimorfismos localizados en el gen *CYP19A1* o en el gen *17 β -HSD* (Sowers et al., 2006).

También se debería considerar la existencia de otros factores que pudieran estar implicados en la regulación de la sensibilidad ovárica. Recientemente, se ha publicado un trabajo en modelo murino que revela una potencial participación en el descenso prematuro de la reserva folicular y en el temprano inicio de la anovulación, de los neuropéptidos implicados en el eje hipotálamo hipofisario gonadal denominados kisspeptinas (Gaytan et al., 2014).

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo de Tesis Doctoral fueron las siguientes.

1. Las pacientes bajas respondedoras presentaron un comprometido desarrollo folicular y rendimiento ovárico, ligado a una modulación diferencial de AR pero no de FSHR, ni de la actividad aromatasasa.
2. La androgenización del ambiente folicular mediante la administración de testosterona transdérmica mejoró significativamente el desarrollo folicular, asociado a un aumento en la expresión de AR en las células del cumulus. Se propone que los andrógenos administrados podrían estar ejerciendo un efecto paracrino potenciador de la sensibilidad folicular a la FSH mediado a través de AR.
3. El pretratamiento folicular mediante la suplementación de 17β -E₂ micronizado transdérmico incrementó significativamente el reclutamiento y desarrollo folicular, así como la cantidad y calidad ovocitaria. Esta mejora del rendimiento ovárico no se asoció a una modulación diferencial de FSHR y AR, o de los genes implicados en la esteroidogénesis ovárica.
4. La manipulación de la fase lútea previa al ciclo de estimulación ovárica controlada mediante el pretratamiento con ACOs conjugados con valerato de E₂ no potenció el rendimiento ovárico a pesar del incremento en la fluorescencia expresada por FSHR.
5. En términos globales, la mejora del rendimiento ovárico obtenido con las estrategias foliculares de androgenización del entorno folicular y de temprana administración de estrógenos, no se ha podido asociar a una modulación diferencial de la cantidad de receptores y de expresión génica de las células foliculares.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aghahosseini, M., Aleyassin, A., Khodaverdi, S., Esfahani, F., Mohammadbeigi, R., Movahedi, S., Kord Valeshabad, A., Mahdavi, A., Fallahi, P., Shabani, P., Rezaeian, Z., and Khodaverdi, M., (2011). Estradiol supplementation during the luteal phase in poor responder patients undergoing in vitro fertilization: a randomized clinical trial. *J. Assist. Reprod. Genet.* *28* , 785-790.

Akhtar, M., Njar, V.C., and Wright, J.N., (1993). Mechanistic studies on aromatase and related C-C bond cleaving P-450 enzymes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *44* , 375-387.

Akman, M.A., Erden, H.F., Tosun, S.B., Bayazit, N., Aksoy, E., and Bahceci, M., (2001). Comparison of agonistic flare-up-protocol and antagonistic multiple dose protocol in ovarian stimulation of poor responders: results of a prospective randomized trial. *Hum. Reprod.* *16* , 868-870.

al-Mizyen, E., Sabatini, L., Lower, A.M., Wilson, C.M., al-Shawaf, T., and Grudzinskas, J.G., (2000). Does pretreatment with progestogen or oral contraceptive pills in low responders followed by the GnRHa flare protocol improve the outcome of IVF-ET? *J. Assist. Reprod. Genet.* *17* , 140-146.

ALPHA Scientists In Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology, (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod. Biomed. Online* *22* , 632-646.

Applied Biosystems, (2007). Applied Biosystems 7500/7500 Fast. Real-Time PCR System Getting Started Guide. Applied Biosystems .

Ardoy, M., Calderón, G., (2008). Cuaderno de embriología clínica: criterios de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. *2º Ed.*

Ascoli, M., Fanelli, F., and Segaloff, D.L., (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr. Rev.* *23* , 141-174.

Ata, B., Yakin, K., Balaban, B., and Urman, B., (2008). Embryo implantation rates in natural and stimulated assisted reproduction treatment cycles in poor responders. *Reprod. Biomed. Online* *17* , 207-212.

Atger, M., Misrahi, M., Sar, S., Le Flem, L., Dessen, P., and Milgrom, E., (1995). Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol. Cell. Endocrinol.* *111* , 113-123.

Badawy, A., Wageah, A., El Gharib, M., and Osman, E.E., (2011). Prediction and diagnosis of poor ovarian response: the dilemma. *J. Reprod. Infertil* *12* , 241-248.

Bahceci, M., Ulug, U., Turan, E., and Akman, M.A., (2007). Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *130* , 93-98.

Balasz, J., Fabregues, F., Penarrubia, J., Carmona, F., Casamitjana, R., Creus, M., Manau, D., Casals, G., and Vanrell, J.A., (2006). Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Hum. Reprod.* *21* , 1884-1893.

Bancsi, L.F., Broekmans, F.J., Eijkemans, M.J., de Jong, F.H., Habbema, J.D., and te Velde, E.R., (2002). Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil. Steril.* *77* , 328-336.

Barad, D., Gleicher, N., (2006). Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF. *Hum. Reprod.* *21* , 2845-2849.

Barad, D., Brill, H., and Gleicher, N., (2007). Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *J. Assist. Reprod. Genet.* *24* , 629-634.

Barrenetxea, G., Agirregoikoa, J.A., Jimenez, M.R., de Larruzea, A.L., Ganzabal, T., and Carbonero, K., (2008). Ovarian response and pregnancy outcome in poor-responder women: a randomized controlled trial on the effect of luteinizing hormone supplementation on in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* *89* , 546-553.

Battaglia, C., Regnani, G., Marsella, T., Facchinetti, F., Volpe, A., Venturoli, S., and Flamigni, C., (2002). Adjuvant L-arginine treatment in controlled ovarian hyperstimulation: a double-blind, randomized study. *Hum. Reprod.* *17* , 659-665.

Beckers, N.G., Macklon, N.S., Eijkemans, M.J., and Fauser, B.C., (2002). Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil. Steril.* *78* , 291-297.

- Bencomo, E., Perez, R., Arteaga, M.F., Acosta, E., Pena, O., Lopez, L., Avila, J., and Palumbo, A.,** (2006). Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate. *Fertil. Steril.* 85 , 474-480.
- Berkkanoglu, M., Isikoglu, M., Aydin, D., and Ozgur, K.,** (2007). Clinical effects of ovulation induction with recombinant follicle-stimulating hormone supplemented with recombinant luteinizing hormone or low-dose recombinant human chorionic gonadotropin in the midfollicular phase in microdose cycles in poor responders. *Fertil. Steril.* 88 , 665-669.
- Billig, H., Furuta, I., and Hsueh, A.J.,** (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133 , 2204-2212.
- Borgbo, T., Povlsen, B.B., Andersen, C.Y., Borup, R., Humaidan, P., and Grondahl, M.L.,** (2013). Comparison of gene expression profiles in granulosa and cumulus cells after ovulation induction with either human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist trigger. *Fertil. Steril.* 100 , 994-1001.
- Bosdou, J.K., Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Toulis, K.A., Goulis, D.G., Zepiridis, L., and Tarlatzis, B.C.,** (2012). The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 18 , 127-145.
- Broekmans, F.J., Kwee, J., Hendriks, D.J., Mol, B.W., and Lambalk, C.B.,** (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update* 12 , 685-718.
- Broer, S.L., Mol, B., Dolleman, M., Fauser, B.C., and Broekmans, F.J.,** (2010). The role of anti-Mullerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 22 , 193-201.
- Brown, J.B.,** (1978). Pituitary control of ovarian function--concepts derived from gonadotrophin therapy. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 18 , 46-54.
- Buffet, N.C., Bouchard, P.,** (2001). The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiol. Int.* 18 , 893-919.
- Bukman, A., Heineman, M.J.,** (2001). Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum. Reprod. Update* 7 , 581-590.

Buyuk, E., Seifer, D.B., Younger, J., Grazi, R.V., and Lieman, H., (2011). Random anti-Mullerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels. *Fertil. Steril.* *95* , 2369-2372.

Cai, J., Lou, H.Y., Dong, M.Y., Lu, X.E., Zhu, Y.M., Gao, H.J., and Huang, H.F., (2007). Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. *Fertil. Steril.* *87* , 1350-1356.

Casarini, L., Pignatti, E., and Simoni, M., (2011). Effects of polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes on reproductive function. *Rev. Endocr Metab. Disord.* *12* , 303-321.

Casper, R.F., Mitwally, M.F., (2006). Review: aromatase inhibitors for ovulation induction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91* , 760-771.

Casson, P.R., Lindsay, M.S., Pisarska, M.D., Carson, S.A., and Buster, J.E., (2000). Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Hum. Reprod.* *15* , 2129-2132.

Casson, P.R., Santoro, N., Elkind-Hirsch, K., Carson, S.A., Hornsby, P.J., Abraham, G., and Buster, J.E., (1998). Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: a six-month trial. *Fertil. Steril.* *70* , 107-110.

Castelo Branco, A., Achour-Frydman, N., Kadoch, J., Fanchin, R., Tachdjian, G., and Frydman, R., (2005). In vitro fertilization and embryo transfer in seminatural cycles for patients with ovarian aging. *Fertil. Steril.* *84* , 875-880.

Catteau-Jonard, S., Jamin, S.P., Leclerc, A., Gonzales, J., Dewailly, D., and di Clemente, N., (2008). Anti-Mullerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93* , 4456-4461.

Chang, E.M., Han, J.E., Won, H.J., Kim, Y.S., Yoon, T.K., and Lee, W.S., (2012). Effect of estrogen priming through luteal phase and stimulation phase in poor responders in in-vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* *29* , 225-230.

Chang, M.Y., Chiang, C.H., Hsieh, T.T., Soong, Y.K., and Hsu, K.H., (1998). Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* *69* , 505-510.

Chang, X., Wu, J., (2013). Effects of luteal estradiol pre-treatment on the outcome of IVF in poor ovarian responders. *Gynecol. Endocrinol.* 29 , 196-200.

Cheung, L.P., Lam, P.M., Lok, I.H., Chiu, T.T., Yeung, S.Y., Tjer, C.C., and Haines, C.J., (2005). GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 20 , 616-621.

Chin, K.V., Seifer, D.B., Feng, B., Lin, Y., and Shih, W.C., (2002). DNA microarray analysis of the expression profiles of luteinized granulosa cells as a function of ovarian reserve. *Fertil. Steril.* 77 , 1214-1218.

Chong, A.P., Rafael, R.W., and Forte, C.C., (1986). Influence of weight in the induction of ovulation with human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 46 , 599-603.

Copperman, A.B., (2003). Antagonists in poor-responder patients. *Fertil. Steril.* 80 *Suppl 1* , S16-24; discussion S32-4.

Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J.W., Wilkinson, C.W., Matos, I.T., Baker, L.D., Cherrier, M., Lofgreen, C., Latendresse, S., Petrova, A., Plymate, S., Raskind, M., Grimwood, K., and Veith, R.C., (1999). Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch. Gen. Psychiatry* 56 , 1135-1140.

Davar, R., Oskouian, H., Ahmadi, S., and Firouzabadi, R.D., (2010). GnRH antagonist/letrozole versus microdose GnRH agonist flare protocol in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 49 , 297-301.

Daya, S., (2002). Updated meta-analysis of recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Fertil. Steril.* 77 , 711-714.

de Boer, E.J., den Tonkelaar, I., te Velde, E.R., Burger, C.W., Klip, H., van Leeuwen, F.E., and OMEGA-project group, (2002). A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil. Steril.* 77 , 978-985.

de los Santos, M.J., Garcia-Laez, V., Beltran, D., Labarta, E., Zuzuarregui, J.L., Alama, P., Gamiz, P., Crespo, J., Bosch, E., and Pellicer, A., (2013). The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: Is it hypoandrogenic? *Hum. Reprod.* 28 , 224-229.

De Placido, G., Mollo, A., Clarizia, R., Strina, I., Conforti, S., and Alviggi, C., (2006). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist plus recombinant luteinizing hormone

vs. a standard GnRH agonist short protocol in patients at risk for poor ovarian response. *Fertil. Steril.* *85* , 247-250.

De Placido, G., Alviggi, C., Mollo, A., Strina, I., Varricchio, M.T., and Molis, M., (2000). Recombinant follicle stimulating hormone is effective in poor responders to highly purified follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* *15* , 17-20.

de Vet, A., Laven, J.S., de Jong, F.H., Themmen, A.P., and Fauser, B.C., (2002). Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil. Steril.* *77* , 357-362.

Deti, L., Williams, D.B., Robins, J.C., Maxwell, R.A., and Thomas, M.A., (2005). A comparison of three downregulation approaches for poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *84* , 1401-1405.

Dias, J.A., Van Roey, P., (2001). Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch. Med. Res.* *32* , 510-519.

Diedrich, K., Diedrich, C., Santos, E., Zoll, C., al-Hasani, S., Reissmann, T., Krebs, D., and Klingmuller, D., (1994). Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum. Reprod.* *9* , 788-791.

Dor, J., Seidman, D.S., Amudai, E., Bider, D., Levran, D., and Mashiach, S., (1995). Adjuvant growth hormone therapy in poor responders to in-vitro fertilization: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Hum. Reprod.* *10* , 40-43.

Dowsett, M., Jones, A., Johnston, S.R., Jacobs, S., Trunet, P., and Smith, I.E., (1995). In vivo measurement of aromatase inhibition by letrozole (CGS 20267) in postmenopausal patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *1* , 1511-1515.

Dragisic, K.G., Davis, O.K., Fasouliotis, S.J., and Rosenwaks, Z., (2005). Use of a luteal estradiol patch and a gonadotropin-releasing hormone antagonist suppression protocol before gonadotropin stimulation for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil. Steril.* *84* , 1023-1026.

Droesch, K., Muasher, S.J., Brzyski, R.G., Jones, G.S., Simonetti, S., Liu, H.C., and Rosenwaks, Z., (1989). Value of suppression with a gonadotropin-releasing hormone agonist prior to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *51* , 292-297.

Durlinger, A.L., Visser, J.A., and Themmen, A.P., (2002). Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* *124* , 601-609.

- Duvan, C.I., Berker, B., Turhan, N.O., and Satiroglu, H.,** (2008). Oral contraceptive pretreatment does not improve outcome in microdose gonadotrophin-releasing hormone agonist protocol among poor responder intracytoplasmic sperm injection patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25 , 89-93.
- Ehlen, A., Bao, S., Lei, Z.M., Nakajima, S.T., and Rao, C.V.,** (2001). The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 , 2643-2648.
- Eckert, R.,** (2002). *Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones.* McGraw Hill - Interamericana .
- Elassar, A., Engmann, L., Nulsen, J., and Benadiva, C.,** (2011). Letrozole and gonadotropins versus luteal estradiol and gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in women with a prior low response to ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* 95 , 2330-2334.
- Elizur, S.E., Aslan, D., Shulman, A., Weisz, B., Bider, D., and Dor, J.,** (2005). Modified natural cycle using GnRH antagonist can be an optional treatment in poor responders undergoing IVF. *J. Assist. Reprod. Genet.* 22 , 75-79.
- Engmann, L., Romak, J., Nulsen, J., Benadiva, C., and Peluso, J.,** (2011). In vitro viability and secretory capacity of human luteinized granulosa cells after gonadotropin-releasing hormone agonist trigger of oocyte maturation. *Fertil. Steril.* 96 , 198-202.
- Faber, B.M., Mayer, J., Cox, B., Jones, D., Toner, J.P., Oehninger, S., and Muasher, S.J.,** (1998). Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders. *Fertil. Steril.* 69 , 826-830.
- Fabregues, F., Creus, M., Penarrubia, J., Manau, D., Vanrell, J.A., and Balasch, J.,** (2006). Effects of recombinant human luteinizing hormone supplementation on ovarian stimulation and the implantation rate in down-regulated women of advanced reproductive age. *Fertil. Steril.* 85 , 925-931.
- Fabregues, F., Penarrubia, J., Creus, M., Manau, D., Casals, G., Carmona, F., and Balasch, J.,** (2009). Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotropins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. *Hum. Reprod.* 24 , 349-359.
- Fanchin, R., Schonauer, L.M., Cunha-Filho, J.S., Mendez Lozano, D.H., and Frydman, R.,** (2005a). Coordination of antral follicle growth: basis for innovative concepts of controlled ovarian hyperstimulation. *Semin. Reprod. Med.* 23 , 354-362.

Fanchin, R., Mendez Lozano, D.H., Schonauer, L.M., Cunha-Filho, J.S., and Frydman, R., (2005b). Hormonal manipulations in the luteal phase to coordinate subsequent antral follicle growth during ovarian stimulation. *Reprod. Biomed. Online* *10* , 721-728.

Fanchin, R., Cunha-Filho, J.S., Schonauer, L.M., Kadoch, I.J., Cohen-Bacri, P., and Frydman, R., (2003a). Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. *Fertil. Steril.* *79* , 316-321.

Fanchin, R., Cunha-Filho, J.S., Schonauer, L.M., Righini, C., de Ziegler, D., and Frydman, R., (2003b). Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil. Steril.* *79* , 585-589.

Fanchin, R., Salomon, L., Castelo-Branco, A., Olivennes, F., Frydman, N., and Frydman, R., (2003c). Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum. Reprod.* *18* , 2698-2703.

Fanchin, R., de Ziegler, D., Olivennes, F., Taieb, J., Dzik, A., and Frydman, R., (1994). Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting 'poor responders' in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* *9* , 1607-1611.

Fanelli, F., Puett, D., (2002). Structural aspects of luteinizing hormone receptor: information from molecular modeling and mutagenesis. *Endocrine* *18* , 285-293.

Fanelli, F., Themmen, A.P., and Puett, D., (2001). Lutropin receptor function: insights from natural, engineered, and computer-simulated mutations. *IUBMB Life* *51* , 149-155.

Fauser, B.C., (1996). Interference with follicle stimulating hormone regulation of human ovarian function. *Mol. Hum. Reprod.* *2* , 327-334.

Fauser, B.C., Van Heusden, A.M., (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* *18* , 71-106.

Feldberg, D., Farhi, J., Ashkenazi, J., Dicker, D., Shalev, J., and Ben-Rafael, Z., (1994). Minidose gonadotropin-releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil. Steril.* *62* , 343-346.

Ferraretti, A.P., La Marca, A., Fauser, B.C., Tarlatzis, B., Nargund, G., Gianaroli, L., and ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition, (2011). ESHRE

consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum. Reprod.* 26 , 1616-1624.

Figueiredo, J.B., Nastri, C.O., Vieira, A.D., and Martins, W.P., (2013). Clomiphene combined with gonadotropins and GnRH antagonist versus conventional controlled ovarian hyperstimulation without clomiphene in women undergoing assisted reproductive techniques: systematic review and meta-analysis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 287 , 779-790.

Fisch, B., Royburt, M., Pinkas, H., Avrech, O.M., Goldman, G.A., Bar, J., Tadir, Y., and Ovadia, J., (1996). Augmentation of low ovarian response to superovulation before in vitro fertilization following priming with contraceptive pills. *Isr. J. Med. Sci.* 32 , 1172-1176.

Fouany, M.R., Sharara, F.I., (2013). Is there a role for DHEA supplementation in women with diminished ovarian reserve? *J. Assist. Reprod. Genet.* 30 , 1239-1244.

Frattarelli, J.L., Levi, A.J., Miller, B.T., and Segars, J.H., (2004). Prognostic use of mean ovarian volume in in vitro fertilization cycles: a prospective assessment. *Fertil. Steril.* 82 , 811-815.

Frattarelli, J.L., McWilliams, G.D., Hill, M.J., Miller, K.A., and Scott, R.T., Jr, (2008a). Low-dose aspirin use does not improve in vitro fertilization outcomes in poor responders. *Fertil. Steril.* 89 , 1113-1117.

Frattarelli, J.L., Lauria-Costab, D.F., Miller, B.T., Bergh, P.A., and Scott, R.T., (2000). Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.* 74 , 512-517.

Frattarelli, J.L., Hill, M.J., McWilliams, G.D., Miller, K.A., Bergh, P.A., and Scott, R.T., Jr, (2008b). A luteal estradiol protocol for expected poor-responders improves embryo number and quality. *Fertil. Steril.* 89 , 1118-1122.

Fridstrom, M., Akerlof, E., Sjoblom, P., and Hillensjo, T., (1997). Serum levels of luteinizing and follicle-stimulating hormones in normal and poor-responding patients undergoing ovarian stimulation with urofollitropin after pituitary downregulation. *Gynecol. Endocrinol.* 11 , 25-28.

Fried, G., Remaeus, K., Harlin, J., Krog, E., Csemiczky, G., Aanesen, A., and Tally, M., (2003). Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20 , 167-176.

Friedman, C.I., Danforth, D.R., Herbosa-Encarnacion, C., Arbogast, L., Alak, B.M., and Seifer, D.B., (1997). Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil. Steril.* *68* , 607-612.

Garay, J.P., Park, B.H., (2012). Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. *Am. J. Cancer. Res.* *2* , 434-445.

Garcia, J.E., Jones, G.S., Acosta, A.A., and Wright, G., Jr, (1983). Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981. *Fertil. Steril.* *39* , 174-179.

García-Velasco, J.A., Remohí, J., (2007). Baja respuesta a la estimulación ovárica en el 2006. *Cuadernos de Medicina Reproductiva.* *13*.

Garcia-Velasco, J.A., Rodriguez, S., Agudo, D., Pacheco, A., Schneider, J., and Pellicer, A., (2012). FSH receptor in vitro modulation by testosterone and hCG in human luteinized granulosa cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *165* , 259-264.

Garcia-Velasco, J.A., Moreno, L., Pacheco, A., Guillen, A., Duque, L., Requena, A., and Pellicer, A., (2005). The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil. Steril.* *84* , 82-87.

Garcia-Velasco, J.A., Isaza, V., Requena, A., Martinez-Salazar, F.J., Landazabal, A., Remohi, J., Pellicer, A., and Simon, C., (2000). High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum. Reprod.* *15* , 2292-2296.

Garrido, N., Meseguer, M., Remohi, J., Pellicer, A., and Simon, C., (2002). Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecol. Endocrinol.* *16* , 505-521.

Gawronska, B., Pauku, T., Huhtaniemi, I., Wasowicz, G., and Ziecik, A.J., (1999). Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig Fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. *J. Reprod. Fertil.* *115* , 293-301.

Gaytan, F., Garcia-Galiano, D., Dorfman, M.D., Manfredi-Lozano, M., Castellano, J.M., Dissen, G.A., Ojeda, S.R., and Tena-Sempere, M., (2014). Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure in spite of preserved gonadotropin secretion. *Endocrinology* , en20141110.

George, J.W., Dille, E.A., and Heckert, L.L., (2011). Current concepts of follicle-stimulating hormone receptor gene regulation. *Biol. Reprod.* *84* , 7-17.

- Gerasimova, T., Thanasoula, M.N., Zattas, D., Seli, E., Sakkas, D., and Lalioti, M.D.,** (2010). Identification and in vitro characterization of follicle stimulating hormone (FSH) receptor variants associated with abnormal ovarian response to FSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95* , 529-536.
- Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., and Chin, W.W.,** (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr. Rev.* *11* , 177-199.
- Gleicher, N., Barad, D.H.,** (2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve (DOR). *Reprod. Biol. Endocrinol.* *9* , 67-7827-9-67.
- Gonzalez-Comadran, M., Duran, M., Sola, I., Fabregues, F., Carreras, R., and Checa, M.A.,** (2012). Effects of transdermal testosterone in poor responders undergoing IVF: systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* *25* , 450-459.
- Gonzalez-Fernandez, R., Pena, O., Hernandez, J., Martin-Vasallo, P., Palumbo, A., and Avila, J.,** (2011). Patients with endometriosis and patients with poor ovarian reserve have abnormal follicle-stimulating hormone receptor signaling pathways. *Fertil. Steril.* *95* , 2373-2378.
- Goswami, S.K., Das, T., Chattopadhyay, R., Sawhney, V., Kumar, J., Chaudhury, K., Chakravarty, B.N., and Kabir, S.N.,** (2004). A randomized single-blind controlled trial of letrozole as a low-cost IVF protocol in women with poor ovarian response: a preliminary report. *Hum. Reprod.* *19* , 2031-2035.
- Gougeon, A.,** (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* *17* , 121-155.
- Gougeon, A., Ecochard, R., and Thalabard, J.C.,** (1994). Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol. Reprod.* *50* , 653-663.
- Greenseid, K., Jindal, S., Hurwitz, J., Santoro, N., and Pal, L.,** (2011). Differential granulosa cell gene expression in young women with diminished ovarian reserve. *Reprod. Sci.* *18* , 892-899.
- Griesinger, G., Diedrich, K., Tarlatzis, B.C., and Kolibianakis, E.M.,** (2006). GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* *13* , 628-638.
- Griswold, M.D., Heckert, L., and Linder, C.,** (1995). The molecular biology of the FSH receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *53* , 215-218.

Gromoll, J., Pekel, E., and Nieschlag, E., (1996). The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. *Genomics* 35 , 308-311.

Harlow, C.R., Hillier, S.G., and Hodges, J.K., (1986). Androgen modulation of follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell steroidogenesis in the primate ovary. *Endocrinology* 119 , 1403-1405.

Hazout, A., Bouchard, P., Seifer, D.B., Aussage, P., Junca, A.M., and Cohen-Bacrie, P., (2004). 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.* 82 , 1323-1329.

Hendriks, D.J., Broekmans, F.J., Bancsi, L.F., de Jong, F.H., Looman, C.W., and Te Velde, E.R., (2005). Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 20 , 163-169.

Hill, M.J., McWilliams, G.D., Miller, K.A., Scott, R.T., Jr, and Frattarelli, J.L., (2009). A luteal estradiol protocol for anticipated poor-responder patients may improve delivery rates. *Fertil. Steril.* 91 , 739-743.

Hillier, S.G., (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179 , 39-46.

Hillier, S.G., De Zwart, F.A., (1981). Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology* 109 , 1303-1305.

Hillier, S.G., Ross, G.T., (1979). Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol. Reprod.* 20 , 261-268.

Hillier, S.G., Tetsuka, M., and Fraser, H.M., (1997). Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum. Reprod.* 12 , 107-111.

Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., and Smyth, C.D., (1994). Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100 , 51-54.

Hillier, S.G., Wickings, E.J., Afnan, M., Margara, R.A., and Winston, R.M., (1984). Granulosa cell steroidogenesis before in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 31 , 679-686.

- Hofmann, G.E., Toner, J.P., Muasher, S.J., and Jones, G.S.,** (1989). High-dose follicle-stimulating hormone (FSH) ovarian stimulation in low-responder patients for in vitro fertilization. *J. In. Vitro. Fert. Embryo. Transf.* 6 , 285-289.
- Hofmann, G.E., Scott, R.T., Jr, Horowitz, G.M., Thie, J., and Navot, D.,** (1995). Evaluation of the reproductive performance of women with elevated day 10 progesterone levels during ovarian reserve screening. *Fertil. Steril.* 63 , 979-983.
- Horie, K., Takakura, K., Imai, K., Liao, S., and Mori, T.,** (1992). Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium. *Hum. Reprod.* 7 , 1461-1466.
- Hu, Y.C., Wang, P.H., Yeh, S., Wang, R.S., Xie, C., Xu, Q., Zhou, X., Chao, H.T., Tsai, M.Y., and Chang, C.,** (2004). Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 , 11209-11214.
- Hughes, S.M., Huang, Z.H., Morris, I.D., Matson, P.L., Buck, P., and Lieberman, B.A.,** (1994). A double-blind cross-over controlled study to evaluate the effect of human biosynthetic growth hormone on ovarian stimulation in previous poor responders to in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 9 , 13-18.
- Humaidan, P., Bredkjaer, H.E., Bungum, L., Bungum, M., Grondahl, M.L., Westergaard, L., and Andersen, C.Y.,** (2005). GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Hum. Reprod.* 20 , 1213-1220.
- Hurst, B.S., Zacur, H.A., Schlaff, W.D., and Berkovitz, G.D.,** (1992). Use of granulosa-luteal cell culture to evaluate low and high clinical responses to menotropin stimulation. *J. Endocrinol. Invest.* 15 , 567-572.
- Hussein, T.S., Froiland, D.A., Amato, F., Thompson, J.G., and Gilchrist, R.B.,** (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell. Sci.* 118 , 5257-5268.
- Jamnonjitt, M., Hammes, S.R.,** (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell. Cycle* 5 , 1178-1183.
- Jayaprakasan, K., Campbell, B., Hopkisson, J., Johnson, I., and Raine-Fenning, N.,** (2010). A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* 93 , 855-864.

Jovanovic, V.P., Kort, D.H., Guarnaccia, M.M., Sauer, M.V., and Lobo, R.A., (2011). Does the addition of clomiphene citrate or letrozole to gonadotropin treatment enhance the oocyte yield in poor responders undergoing IVF? *J. Assist. Reprod. Genet.* *28* , 1067-1072.

Kadoch, I.J., Phillips, S.J., and Bissonnette, F., (2011). Modified natural-cycle in vitro fertilization should be considered as the first approach in young poor responders. *Fertil. Steril.* *96* , 1066-1068.

Kahraman, K., Berker, B., Atabekoglu, C.S., Sonmezer, M., Cetinkaya, E., Aytac, R., and Satiroglu, H., (2009). Microdose gonadotropin-releasing hormone agonist flare-up protocol versus multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in poor responders undergoing intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer cycle. *Fertil. Steril.* *91* , 2437-2444.

Kailasam, C., Keay, S.D., Wilson, P., Ford, W.C., and Jenkins, J.M., (2004). Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. *Hum. Reprod.* *19* , 1544-1547.

Kaipia, A., Hsueh, A.J., (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol.* *59* , 349-363.

Kansal Kalra, S., Ratcliffe, S., Gracia, C.R., Martino, L., Coutifaris, C., and Barnhart, K.T., (2008). Randomized controlled pilot trial of luteal phase recombinant FSH stimulation in poor responders. *Reprod. Biomed. Online* *17* , 745-750.

Kara, M., Aydin, T., Aran, T., Turktekin, N., and Ozdemir, B., (2014). Does dehydroepiandrosterone supplementation really affect IVF-ICSI outcome in women with poor ovarian reserve? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *173* , 63-65.

Karande, V., Gleicher, N., (1999). A rational approach to the management of low responders in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* *14* , 1744-1748.

Karande, V., Morris, R., Rinehart, J., Miller, C., Rao, R., and Gleicher, N., (1997). Limited success using the "flare" protocol in poor responders in cycles with low basal follicle-stimulating hormone levels during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *67* , 900-903.

Karande, V.C., Jones, G.S., Veeck, L.L., and Muasher, S.J., (1990). High-dose follicle-stimulating hormone stimulation at the onset of the menstrual cycle does not improve the in vitro fertilization outcome in low-responder patients. *Fertil. Steril.* *53* , 486-489.

Keay, S.D., Liversedge, N.H., Mathur, R.S., and Jenkins, J.M., (1997). Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *104* , 521-527.

- Kim, J.F., Liu, J.H., Phillipou, G., and Yen, S.S.,** (1985). Evidence for a hypothalamic site of action of clomiphene citrate in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *61* , 265-268.
- Kim, C.H., Howles, C.M., and Lee, H.A.,** (2011a). The effect of transdermal testosterone gel pretreatment on controlled ovarian stimulation and IVF outcome in low responders. *Fertil. Steril.* *95* , 679-683.
- Kim, C.H., Jeon, G.H., Cheon, Y.P., Jeon, I., Kim, S.H., Chae, H.D., and Kang, B.M.,** (2009). Comparison of GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pill pretreatment and GnRH agonist low-dose long protocol in low responders undergoing IVF/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* *92* , 1758-1760.
- Kim, C.H., You, R.M., Kang, H.J., Ahn, J.W., Jeon, I., Lee, J.W., Kim, S.H., Chae, H.D., and Kang, B.M.,** (2011b). GnRH antagonist multiple dose protocol with oral contraceptive pill pretreatment in poor responders undergoing IVF/ICSI. *Clin. Exp. Reprod. Med.* *38* , 228-233.
- Klinkert, E.R., Broekmans, F.J., Looman, C.W., Habbema, J.D., and te Velde, E.R.,** (2005). 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.* *20* , 611-615.
- Kolibianakis, E.M., Venetis, C.A., Diedrich, K., Tarlatzis, B.C., and Griesinger, G.,** (2009). Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* *15* , 613-622.
- Konig, T.E., van der Houwen, L.E., Overbeek, A., Hendriks, M.L., Beutler-Beemsterboer, S.N., Kuchenbecker, W.K., Renckens, C.N., Bernardus, R.E., Schats, R., Homburg, R., Hompes, P.G., and Lambalk, C.B.,** (2013). Recombinant LH supplementation to a standard GnRH antagonist protocol in women of 35 years or older undergoing IVF/ICSI: a randomized controlled multicentre study. *Hum. Reprod.* *28* , 2804-2812.
- Kovacs, P., Barg, P.E., and Witt, B.R.,** (2001). Hypothalamic-pituitary suppression with oral contraceptive pills does not improve outcome in poor responder patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.* *18* , 391-394.
- Kronenberg, H., Memed, S., Polonsky, K., and Larsen, P.,** (2008). The physiology and pathology of the female reproductive axis. *Williams textbook of endocrinology* .
- Ku, S.Y., Choi, Y.S., Jee, B.C., Suh, C.S., Choi, Y.M., Kim, J.G., Moon, S.Y., and Kim, S.H.,** (2005). A preliminary study on reduced dose (33 or 25 microg) gonadotropin-

releasing hormone agonist long protocol for multifollicular ovarian stimulation in patients with high basal serum follicle-stimulating hormone levels undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol. Endocrinol.* 21 , 227-231.

Kucuk, T., Sozen, E., (2007). Luteal start of exogenous FSH in poor responder women. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24 , 635-638.

Kucuk, T., Goktolga, U., and Sozen, E., (2008a). Efficiency of follicle-stimulating hormone, commenced in the luteal phase, for overcoming a poor response in assisted reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 34 , 574-577.

Kucuk, T., Kozinoglu, H., and Kaba, A., (2008b). Growth hormone co-treatment within a GnRH agonist long protocol in patients with poor ovarian response: a prospective, randomized, clinical trial. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25 , 123-127.

Kunt, C., Ozaksit, G., Keskin Kurt, R., Cakir Gungor, A.N., Kanat-Pektas, M., Kilic, S., and Dede, A., (2011). Anti-Mullerian hormone is a better marker than inhibin B, follicle stimulating hormone, estradiol or antral follicle count in predicting the outcome of in vitro fertilization. *Arch. Gynecol. Obstet.* 283 , 1415-1421.

Kurl, R.N., Morris, I.D., (1978). Differential depletion of cytoplasmic high affinity oestrogen receptors after the in vivo administration of the antioestrogens, clomiphene, MER-25 and tamoxifen. *Br. J. Pharmacol.* 62 , 487-493.

Kwok, R., Johnson, N.P., (2012). Ovarian biopsy has no role as a routine diagnostic test of ovarian reserve: a systematic review. *Reprod. Biomed. Online* 24 , 492-495.

La Marca, A., Carducci Artensio, A., Stabile, G., Rivasi, F., and Volpe, A., (2005). Evidence for cycle-dependent expression of follicle-stimulating hormone receptor in human endometrium. *Gynecol. Endocrinol.* 21 , 303-306.

La Marca, A., Sighinolfi, G., Argento, C., Grisendi, V., Casarini, L., Volpe, A., and Simoni, M., (2013). Polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes as markers of ovarian reserve and response in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 99 , 970-8.e1.

La Marca, A., Giulini, S., Tirelli, A., Bertucci, E., Marsella, T., Xella, S., and Volpe, A., (2007). Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.* 22 , 766-771.

La Marca, A., Sighinolfi, G., Radi, D., Argento, C., Baraldi, E., Artensio, A.C., Stabile, G., and Volpe, A., (2010). Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum. Reprod. Update* 16 , 113-130.

- Land, J.A., Yarmolinskaya, M.I., Dumoulin, J.C., and Evers, J.L.,** (1996). High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* *65* , 961-965.
- Lass, A., Silye, R., Abrams, D.C., Krausz, T., Hovatta, O., Margara, R., and Winston, R.M.,** (1997). Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum. Reprod.* *12* , 1028-1031.
- Lee, D.W., Grasso, P., Dattatreymurty, B., Deziel, M.R., and Reichert, L.E., Jr,** (1993). Purification of a high molecular weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitor from human follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *77* , 163-168.
- Lei, Z.M., Toth, P., Rao, C.V., and Pridham, D.,** (1993). Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *77* , 863-872.
- Levallet, J., Pakarinen, P., and Huhtaniemi, I.T.,** (1999). Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Arch. Med. Res.* *30* , 486-494.
- Licciardi, F.L., Liu, H.C., and Rosenwaks, Z.,** (1995). Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *64* , 991-994.
- Lindheim, S.R., Barad, D.H., Witt, B., Ditkoff, E., and Sauer, M.V.,** (1996). Short-term gonadotropin suppression with oral contraceptives benefits poor responders prior to controlled ovarian hyperstimulation. *J. Assist. Reprod. Genet.* *13* , 745-747.
- Lok, I.H., Yip, S.K., Cheung, L.P., Yin Leung, P.H., and Haines, C.J.,** (2004). Adjuvant low-dose aspirin therapy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil. Steril.* *81* , 556-561.
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameso, J., and Loscalzo, J.,** (2011). *Harrison's Principles of International Medicine.* 18th Edition *McGraw Hill.*
- Loutradis, D., Vomvolaki, E., and Drakakis, P.,** (2008). Poor responder protocols for in vitro fertilization: options and results. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* *20* , 374-378.
- Loutradis, D., Drakakis, P., Vomvolaki, E., and Antsaklis, A.,** (2007). Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve. *J. Assist. Reprod. Genet.* *24* , 597-611.

- Loutradis, D., Drakakis, P., Milingos, S., Stefanidis, K., and Michalas, S.,** (2003). Alternative approaches in the management of poor response in controlled ovarian hyperstimulation (COH). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 997 , 112-119.
- Luborsky, J.L., Thiruppathi, P., Rivnay, B., Roussev, R., Coulam, C., and Radwanska, E.,** (2002). Evidence for different aetiologies of low estradiol response to FSH: age-related accelerated luteinization of follicles or presence of ovarian autoantibodies. *Hum. Reprod.* 17 , 2641-2649.
- Madani, T., Ashrafi, M., and Yeganeh, L.M.,** (2012). Comparison of different stimulation protocols efficacy in poor responders undergoing IVF: a retrospective study. *Gynecol. Endocrinol.* 28 , 102-105.
- Magoffin, D.A.,** (2005). Ovarian theca cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 , 1344-1349.
- Maheshwari, A., Gibreel, A., Bhattacharya, S., and Johnson, N.P.,** (2009). Dynamic tests of ovarian reserve: a systematic review of diagnostic accuracy. *Reprod. Biomed. Online* 18 , 717-734.
- Mahutte, N.G., Arici, A.,** (2002). Poor responders: does the protocol make a difference? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 14 , 275-281.
- Malmusi, S., La Marca, A., Giulini, S., Xella, S., Tagliasacchi, D., Marsella, T., and Volpe, A.,** (2005). Comparison of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in poor responders undergoing ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* 84 , 402-406.
- Maman, E., Yung, Y., Kedem, A., Yerushalmi, G.M., Konopnicki, S., Cohen, B., Dor, J., and Hourvitz, A.,** (2012). High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil. Steril.* 97 , 592-598.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M.,** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 , 835-839.
- Manzi, D.L., Thornton, K.L., Scott, L.B., and Nulsen, J.C.,** (1994). The value of increasing the dose of human menopausal gonadotropins in women who initially demonstrate a poor response. *Fertil. Steril.* 62 , 251-256.
- Mariani, S., Salvatori, L., Basciani, S., Arizzi, M., Franco, G., Petrangeli, E., Spera, G., and Gnassi, L.,** (2006). Expression and cellular localization of follicle-stimulating

hormone receptor in normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J. Urol.* *175* , 2072-7; discussion 2077.

Martinez, F., Barri, P.N., Coroleu, B., Tur, R., Sorsa-Leslie, T., Harris, W.J., Groome, N.P., Knight, P.G., and Fowler, P.A., (2002). Women with poor response to IVF have lowered circulating gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles. *Hum. Reprod.* *17* , 634-640.

Massin, N., Cedrin-Durnerin, I., Coussieu, C., Galey-Fontaine, J., Wolf, J.P., and Hugues, J.N., (2006). Effects of transdermal testosterone application on the ovarian response to FSH in poor responders undergoing assisted reproduction technique--a prospective, randomized, double-blind study. *Hum. Reprod.* *21* , 1204-1211.

May-Panloup, P., Ferre-L'Hotellier, V., Moriniere, C., Marcaillou, C., Lemerle, S., Coutolleau, A., Reynier, P., Descamps, P., and Guardiola, P., (2012). Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve. *Gynecol. Obstet. Fertil.* *40* , 500-506.

Mazer, N.A., (2000). New clinical applications of transdermal testosterone delivery in men and women. *J. Control. Release* *65* , 303-315.

McEwan, I.J., (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr. Relat. Cancer* *11* , 281-293.

McIlveen, M., Skull, J.D., and Ledger, W.L., (2007). 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.* *22* , 778-785.

Meduri, G., Bachelot, A., Cocca, M.P., Vasseur, C., Rodien, P., Kuttann, F., Touraine, P., and Misrahi, M., (2008). Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.* *282* , 130-142.

Meyer, W.R., Lavy, G., DeCherney, A.H., Visintin, I., Economy, K., and Luborsky, J.L., (1990). Evidence of gonadal and gonadotropin antibodies in women with a suboptimal ovarian response to exogenous gonadotropin. *Obstet. Gynecol.* *75* , 795-799.

Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Ibuki, Y., Igarashi, M., and Minegishi T [corrected to Minegishi, T.], (1991). Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *175* , 1125-1130.

Mitwally, M.F., Casper, R.F., (2002a). Aromatase inhibition for ovarian stimulation: future avenues for infertility management. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* *14* , 255-263.

- Mitwally, M.F., Casper, R.F.,** (2002b). Aromatase inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fertil. Steril.* *77* , 776-780.
- Moawad, A., Shaer, M.,** (2012). Long term androgen priming by use of DHEA improves IVF outcomes in poor responders: a randomized control study. *Middle East Fertil Soc J.* *17* , 268-74.
- Mochtar, M.H., Van der, V., Ziech, M., and van Wely, M.,** (2007). Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2) , CD005070.
- Mohamed, K.A., Davies, W.A., Allsopp, J., and Lashen, H.,** (2005). Agonist "flare-up" versus antagonist in the management of poor responders undergoing in vitro fertilization treatment. *Fertil. Steril.* *83* , 331-335.
- Morgia, F., Sbracia, M., Schimberni, M., Giallonardo, A., Piscitelli, C., Giannini, P., and Aragona, C.,** (2004). A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *81* , 1542-1547.
- Muhammad, F., Yivgi-Ohana, N., Shveiky, D., Orly, J., Alexander, S., and Laufer, N.,** (2009). Levels of steroidogenic acute regulatory protein and mitochondrial membrane potential in granulosa cells of older poor-responder women. *Fertil. Steril.* *91* , 220-225.
- Muttukrishna, S., McGarrigle, H., Wakim, R., Khadum, I., Ranieri, D.M., and Serhal, P.,** (2005). Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* *112* , 1384-1390.
- Narkwichean, A., Maalouf, W., Campbell, B.K., and Jayaprakasan, K.,** (2013). Efficacy of dehydroepiandrosterone to improve ovarian response in women with diminished ovarian reserve: a meta-analysis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *11* , 44-7827-11-44.
- Navot, D., Rosenwaks, Z., and Margalioth, E.J.,** (1987). Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* *2* , 645-647.
- Neal, M.S., Reade, C.J., Younglai, E.V., Holloway, A.C., and Goodrow, G.J.,** (2008). Granulosa cell aromatase activity in women undergoing IVF: a comparison of good and poor responders. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* *30* , 138-142.
- Nielsen, M.E., Rasmussen, I.A., Kristensen, S.G., Christensen, S.T., Mollgard, K., Wreford Andersen, E., Byskov, A.G., and Yding Andersen, C.,** (2011). In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Mol. Hum. Reprod.* *17* , 63-70.

- Nikolaou, D., Templeton, A.,** (2003). Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Hum. Reprod.* *18* , 1137-1139.
- Nikolettos, N., Al-Hasani, S., Felberbaum, R., Demirel, L.C., Kupker, W., Montzka, P., Xia, Y.X., Schopper, B., Sturm, R., and Diedrich, K.,** (2001). Gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a novel method of ovarian stimulation in poor responders. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *97* , 202-207.
- Ocal, P., Aydin, S., Cepni, I., Idil, S., Idil, M., Uzun, H., and Benian, A.,** (2004). Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *115* , 194-199.
- Oktay, K., Briggs, D., and Gosden, R.G.,** (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82* , 3748-3751.
- Olivennes, F., Righini, C., Fanchin, R., Torrisi, C., Hazout, A., Glissant, M., Fernandez, H., and Frydman, F.,** (1996). A protocol using a low dose of gonadotrophin-releasing hormone agonist might be the best protocol for patients with high follicle-stimulating hormone concentrations on day 3. *Hum. Reprod.* *11* , 1169-1172.
- Oosterhuis, G.J., Vermes, I., Lambalk, C.B., Michgelsen, H.W., and Schoemaker, J.,** (1998). Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum. Reprod.* *13* , 285-289.
- Out, H.J., Mannaerts, B.M., Driessen, S.G., and Coelingh Bennink, H.J.,** (1996). Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. *Hum. Reprod. Update* *2* , 162-171.
- Ozmen, B., Sonmezer, M., Atabekoglu, C.S., and Olmus, H.,** (2009). Use of aromatase inhibitors in poor-responder patients receiving GnRH antagonist protocols. *Reprod. Biomed. Online* *19* , 478-485.
- Pabon, J.E., Li, X., Lei, Z.M., Sanfilippo, J.S., Yussman, M.A., and Rao, C.V.,** (1996). Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81* , 2397-2400.
- Padilla, S.L., Dugan, K., Maruschak, V., Shalika, S., and Smith, R.D.,** (1996). Use of the flare-up protocol with high dose human follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil. Steril.* *65* , 796-799.

Pakkila, M., Rasanen, J., Heinonen, S., Tinkanen, H., Tuomivaara, L., Makikallio, K., Hippelainen, M., Tapanainen, J.S., and Martikainen, H., (2005). Low-dose aspirin does not improve ovarian responsiveness or pregnancy rate in IVF and ICSI patients: a randomized, placebo-controlled double-blind study. *Hum. Reprod.* *20* , 2211-2214.

Papamentzelopoulou, M., Mavrogianni, D., Partsinevelos, G.A., Marinopoulos, S., Dinopoulou, V., Theofanakis, C., Anagnostou, E., and Loutradis, D., (2012). LH receptor gene expression in cumulus cells in women entering an ART program. *J. Assist. Reprod. Genet.* *29* , 409-416.

Pavlik, E.J., DePriest, P.D., Gallion, H.H., Ueland, F.R., Reedy, M.B., Kryscio, R.J., and van Nagell, J.R., Jr, (2000). Ovarian volume related to age. *Gynecol. Oncol.* *77* , 410-412.

Pellicer, A., Ballester, M.J., Serrano, M.D., Mir, A., Serra-Serra, V., Remohi, J., and Bonilla-Musoles, F.M., (1994). Aetiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile women with normal basal serum follicle stimulating hormone levels. *Hum. Reprod.* *9* , 806-811.

Penarrubia, J., Fabregues, F., Manau, D., Creus, M., Carmona, F., Casamitjana, R., Vanrell, J.A., and Balasch, J., (2005). Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum. Reprod.* *20* , 622-628.

Perrier d'Hauterive, S., Berndt, S., Tsampalas, M., Charlet-Renard, C., Dubois, M., Bourgain, C., Hazout, A., Foidart, J.M., and Geenen, V., (2007). Dialogue between blastocyst hCG and endometrial LH/hCG receptor: which role in implantation? *Gynecol. Obstet. Invest.* *64* , 156-160.

Phy, J., Stocco, D.M., and Prien, S.D., (2002). Differences in steroidogenic acute regulatory protein expression from the luteinizing-granulosa cells of patients undergoing in vitro fertilization with embryo transfer: implications for cycle outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *186* , 872-875.

Pinkas, H., Orvieto, R., Avrech, O.M., Rufas, O., Ferber, A., Ben-Rafael, Z., and Fisch, B., (2000). Gonadotropin stimulation following GnRH-a priming for poor responders in in vitro fertilization-embryo transfer programs. *Gynecol. Endocrinol.* *14* , 11-14.

Polyzos, N.P., Devroey, P., (2011). A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil. Steril.* *96* , 1058-61.e7.

- Pradeep, P.K., Li, X., Peegel, H., and Menon, K.M.,** (2002). Dihydrotestosterone inhibits granulosa cell proliferation by decreasing the cyclin D2 mRNA expression and cell cycle arrest at G1 phase. *Endocrinology* *143* , 2930-2935.
- Pu, D., Wu, J., and Liu, J.,** (2011). Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF. *Hum. Reprod.* *26* , 2742-2749.
- Radu, A., Pichon, C., Camparo, P., Antoine, M., Allory, Y., Couvelard, A., Fromont, G., Hai, M.T., and Ghinea, N.,** (2010). Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels. *N. Engl. J. Med.* *363* , 1621-1630.
- Raga, F., Bonilla-Musoles, F., Casan, E.M., and Bonilla, F.,** (1999). Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. *Hum. Reprod.* *14* , 1431-1434.
- Ranieri, D.M., Quinn, F., Makhlof, A., Khadum, I., Ghutmi, W., McGarrigle, H., Davies, M., and Serhal, P.,** (1998). Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil. Steril.* *70* , 227-233.
- Remohí, J., Bellver, J., Domingo, J., Bosch, E., and Pellicer, A.,** (2008). Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos. McGraw Hill - Interamericana 3^o Ed.
- Requena, A., Herrero, J., Landeras, J., Navarro, E., Neyro, J.L., Salvador, C., Tur, R., Callejo, J., Checa, M.A., Farre, M., Espinos, J.J., Fabregues, F., Grana-Barcia, M., and Reproductive Endocrinology Interest Group of Spanish Society of Fertility,** (2008). Use of letrozole in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* *14* , 571-582.
- Richards, J.S.,** (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev.* *15* , 725-751.
- Rombauts, L., Suikkari, A.M., MacLachlan, V., Trounson, A.O., and Healy, D.L.,** (1998). Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil. Steril.* *69* , 665-669.
- Rousseau-Merck, M.F., Atger, M., Loosfelt, H., Milgrom, E., and Berger, R.,** (1993). The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics* *15* , 222-224.

Saadat, P., Slater, C.C., Jain, J.K., Tourgeman, D.E., Stanczyk, F.Z., and Paulson, R.J., (2003). Treatment-associated serum FSH levels in very poor responders to ovarian stimulation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20 , 395-399.

Saldeen, P., Kallen, K., and Sundstrom, P., (2007). The probability of successful IVF outcome after poor ovarian response. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 86 , 457-461.

Salesse, R., Remy, J.J., Levin, J.M., Jallal, B., and Garnier, J., (1991). Towards understanding the glycoprotein hormone receptors. *Biochimie* 73 , 109-120.

Schachter, M., Friedler, S., Raziel, A., Strassburger, D., Bern, O., and Ron-el, R., (2001). Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase--a function of improved embryo quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18 , 197-204.

Scheffer, G.J., Broekmans, F.J., Dorland, M., Habbema, J.D., Looman, C.W., and te Velde, E.R., (1999). Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil. Steril.* 72 , 845-851.

Schimberni, M., Morgia, F., Colabianchi, J., Giallonardo, A., Piscitelli, C., Giannini, P., Montigiani, M., and Sbracia, M., (2009). Natural-cycle in vitro fertilization in poor responder patients: a survey of 500 consecutive cycles. *Fertil. Steril.* 92 , 1297-1301.

Schoolcraft, W., Schlenker, T., Gee, M., Stevens, J., and Wagley, L., (1997). Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare, growth hormone protocol. *Fertil. Steril.* 67 , 93-97.

Schoolcraft, W.B., Surrey, E.S., Minjarez, D.A., Stevens, J.M., and Gardner, D.K., (2008). Management of poor responders: can outcomes be improved with a novel gonadotropin-releasing hormone antagonist/letrozole protocol? *Fertil. Steril.* 89 , 151-156.

Scott, R.T., Navot, D., (1994). Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 61 , 880-885.

Segaloff, D.L., Sprengel, R., Nikolics, K., and Ascoli, M., (1990). Structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Recent Prog. Horm. Res.* 46 , 261-301; discussion 301-3.

Seifer, D.B., Lambert-Messerlian, G., Hogan, J.W., Gardiner, A.C., Blazar, A.S., and Berk, C.A., (1997). Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil. Steril.* 67 , 110-114.

- Seifer, D.B., Scott, R.T., Jr, Bergh, P.A., Abrogast, L.K., Friedman, C.I., Mack, C.K., and Danforth, D.R.,** (1999). Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil. Steril.* *72* , 63-65.
- Sen, A., Hammes, S.R.,** (2010). Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *Mol. Endocrinol.* *24* , 1393-1403.
- Sen, A., Prizant, H., Light, A., Biswas, A., Hayes, E., Lee, H.J., Barad, D., Gleicher, N., and Hammes, S.R.,** (2014). Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111* , 3008-3013.
- Shaker, A.G., Fleming, R., Jamieson, M.E., Yates, R.W., and Coutts, J.R.,** (1992). Absence of effect of adjuvant growth hormone therapy on follicular responses to exogenous gonadotropins in women: normal and poor responders. *Fertil. Steril.* *58* , 919-923.
- Shastri, S.M., Barbieri, E., Kligman, I., Schoyer, K.D., Davis, O.K., and Rosenwaks, Z.,** (2011). Stimulation of the young poor responder: comparison of the luteal estradiol/gonadotropin-releasing hormone antagonist priming protocol versus oral contraceptive microdose leuprolide. *Fertil. Steril.* *95* , 592-595.
- Shiina, H., Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J., Takemasa, S., Sakari, M., Takada, I., Nakamura, T., Metzger, D., Chambon, P., Kanno, J., Yoshikawa, H., and Kato, S.,** (2006). Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103* , 224-229.
- Simoni, M., Nieschlag, E., and Gromoll, J.,** (2002). Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum. Reprod. Update* *8* , 413-421.
- Simoni, M., Gromoll, J., and Nieschlag, E.,** (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* *18* , 739-773.
- Siristatidis, C.S., Hamilton, M.P.,** (2007). What should be the maximum FSH dose in IVF/ICSI in poor responders? *J. Obstet. Gynaecol.* *27* , 401-405.
- Skiadas, C.C., Duan, S., Correll, M., Rubio, R., Karaca, N., Ginsburg, E.S., Quackenbush, J., and Racowsky, C.,** (2012). Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression in membrana granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* *18* , 362-371.

Smotrich, D.B., Widra, E.A., Gindoff, P.R., Levy, M.J., Hall, J.L., and Stillman, R.J., (1995). Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* *64* , 1136-1140.

Sowers, M.R., Jannausch, M.L., McConnell, D.S., Kardia, S.R., and Randolph, J.F., Jr, (2006). Menstrual cycle markers of ovarian aging and sex steroid hormone genotypes. *Am. J. Med.* *119* , S31-43.

Stocco, D.M., (2000). Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Biophys. Acta* *1486* , 184-197.

Storino, F., (2011). Società Italiana di Citometria. .

Sun, L., Peng, Y., Sharrow, A.C., Iqbal, J., Zhang, Z., Papachristou, D.J., Zaidi, S., Zhu, L.L., Yaroslavskiy, B.B., Zhou, H., Zallone, A., Sairam, M.R., Kumar, T.R., Bo, W., Braun, J., Cardoso-Landa, L., Schaffler, M.B., Moonga, B.S., Blair, H.C., and Zaidi, M., (2006). FSH directly regulates bone mass. *Cell* *125* , 247-260.

Sunkara, S.K., Pundir, J., and Khalaf, Y., (2011). Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* *22* , 545-555.

Sunkara, S.K., Tuthill, J., Khairy, M., El-Toukhy, T., Coomarasamy, A., Khalaf, Y., and Braude, P., (2007). Pituitary suppression regimens in poor responders undergoing IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* *15* , 539-546.

Surrey, E.S., (2007). Management of the poor responder: the role of GnRH agonists and antagonists. *J. Assist. Reprod. Genet.* *24* , 613-619.

Surrey, E.S., Schoolcraft, W.B., (2000). Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil. Steril.* *73* , 667-676.

Surrey, E.S., Bower, J., Hill, D.M., Ramsey, J., and Surrey, M.W., (1998). Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *69* , 419-424.

Tarlatzis, B.C., Zepiridis, L., Grimbizis, G., and Bontis, J., (2003). Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* *9* , 61-76.

te Velde, E.R., Pearson, P.L., (2002). The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update* *8* , 141-154.

Teramoto, S., Kato, O., (2007). Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: a large-scale retrospective study. *Reprod. Biomed. Online* 15 , 134-148.

Thiruppathi, P., Shatavi, S., Dias, J.A., Radwanska, E., and Luborsky, J.L., (2001). Gonadotrophin receptor expression on human granulosa cells of low and normal responders to FSH. *Mol. Hum. Reprod.* 7 , 697-704.

Toner, J.P., Philput, C.B., Jones, G.S., and Muasher, S.J., (1991). Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil. Steril.* 55 , 784-791.

Toth, T.L., Awwad, J.T., Veeck, L.L., Jones, H.W., Jr, and Muasher, S.J., (1996). Suppression and flare regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist. Use in women with different basal gonadotropin values in an in vitro fertilization program. *J. Reprod. Med.* 41 , 321-326.

Tresguerres, J.A.F., Castillo, C., (1999). *Fisiología humana. Interamericana - McGraw Hill* .

Ulug, U., Ben-Shlomo, I., Turan, E., Erden, H.F., Akman, M.A., and Bahceci, M., (2003). Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles. *Reprod. Biomed. Online* 6 , 439-443.

van Hooff, M.H., Alberda, A.T., Huisman, G.J., Zeilmaker, G.H., and Leerentveld, R.A., (1993). Doubling the human menopausal gonadotrophin dose in the course of an in-vitro fertilization treatment cycle in low responders: a randomized study. *Hum. Reprod.* 8 , 369-373.

Van Rooijen, J.H., Van Assen, S., Van Der Kwast, T.H., De Rooij, D.G., Boersma, W.J., Vreeburg, J.T., and Weber, R.F., (1995). Androgen receptor immunoeexpression in the testes of subfertile men. *J. Androl.* 16 , 510-516.

van Rooij, I.A., Broekmans, F.J., te Velde, E.R., Fauser, B.C., Bancsi, L.F., de Jong, F.H., and Themmen, A.P., (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 17 , 3065-3071.

Veeck, L.L., (1986). *Atlas of the human oocyte and early conceptus. Williams and Wilkins, Baltimore. Vol 1.*

Vendola, K., Zhou, J., Wang, J., Famuyiwa, O.A., Bievre, M., and Bondy, C.A., (1999). Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol. Reprod.* 61 , 353-357.

Vendola, K.A., Zhou, J., Adesanya, O.O., Weil, S.J., and Bondy, C.A., (1998). Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J. Clin. Invest.* *101* , 2622-2629.

Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Tarlatzi, T.B., and Tarlatzis, B.C., (2010). Evidence-based management of poor ovarian response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1205* , 199-206.

Verhagen, T.E., Hendriks, D.J., Bancsi, L.F., Mol, B.W., and Broekmans, F.J., (2008). The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* *14* , 95-100.

Vital-Reyes, V., Chhieng, D., Rodriguez-Burford, C., Tellez-Velasco, S., Grizzle, W., Chavarria-Olarte, M.E., and Reyes-Fuentes, A., (2006). Ovarian biopsy in infertile patients with ovarian dysfunction. *Int. J. Gynecol. Pathol.* *25* , 90-94.

Walters, K.A., Middleton, L.J., Joseph, S.R., Hazra, R., Jimenez, M., Simanainen, U., Allan, C.M., and Handelsman, D.J., (2012). Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility. *Biol. Reprod.* *87* , 151.

Weil, S., Vendola, K., Zhou, J., and Bondy, C.A., (1999). Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84* , 2951-2956.

Weil, S.J., Vendola, K., Zhou, J., Adesanya, O.O., Wang, J., Okafor, J., and Bondy, C.A., (1998). Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83* , 2479-2485.

Weitzman, V.N., Engmann, L., DiLuigi, A., Maier, D., Nulsen, J., and Benadiva, C., (2009). Comparison of luteal estradiol patch and gonadotropin-releasing hormone antagonist suppression protocol before gonadotropin stimulation versus microdose gonadotropin-releasing hormone agonist protocol for patients with a history of poor in vitro fertilization outcomes. *Fertil. Steril.* *92* , 226-230.

Welt, C.K., Schneyer, A.L., (2001). Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86* , 330-336.

Winer, E.P., Hudis, C., Burstein, H.J., Chlebowski, R.T., Ingle, J.N., Edge, S.B., Mamounas, E.P., Gralow, J., Goldstein, L.J., Pritchard, K.I., Braun, S., Cobleigh, M.A., Langer, A.S., Perotti, J., Powles, T.J., Whelan, T.J., and Browman, G.P., (2002). American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase

inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2002. *J. Clin. Oncol.* 20 , 3317-3327.

Wiser, A., Gonen, O., Ghetler, Y., Shavit, T., Berkovitz, A., and Shulman, A., (2010). Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: a randomized prospective study. *Hum. Reprod.* 25 , 2496-2500.

Woods, D.C., Tilly, J.L., (2012). The next (re)generation of ovarian biology and fertility in women: is current science tomorrow's practice? *Fertil. Steril.* 98 , 3-10.

Yarali, H., Esinler, I., Polat, M., Bozdog, G., and Tiras, B., (2009). Antagonist/letrozole protocol in poor ovarian responders for intracytoplasmic sperm injection: a comparative study with the microdose flare-up protocol. *Fertil. Steril.* 92 , 231-235.

Yen, S., Jaffe, R., and Barbieri, R., (2001). *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico.* Editorial Médica Panamericana .

Yoo, J.H., Cha, S.H., Park, C.W., Kim, J.Y., Yang, K.M., Song, I.O., Koong, M.K., Kang, I.S., and Kim, H.O., (2011). Comparison of mild ovarian stimulation with conventional ovarian stimulation in poor responders. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 38 , 159-163.

Younis, J.S., Matilsky, M., Radin, O., and Ben-Ami, M., (2001). Increased progesterone/estradiol ratio in the late follicular phase could be related to low ovarian reserve in in vitro fertilization-embryo transfer cycles with a long gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil. Steril.* 76 , 294-299.

Zaidi, J., Barber, J., Kyei-Mensah, A., Bekir, J., Campbell, S., and Tan, S.L., (1996). Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an in vitro fertilization program. *Obstet. Gynecol.* 88 , 779-784.

Zeleznik, A.J., (1981). Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. *Endocrinology* 109 , 352-355.

Zeleznik, A.J., Hillier, S.G., (1984). The role of gonadotropins in the selection of the preovulatory follicle. *Clin. Obstet. Gynecol.* 27 , 927-940.

Zeleznik, A.J., Hillier, S.G., and Ross, G.T., (1979). Follicle stimulating hormone-induced follicular development: an examination of the role of androgens. *Biol. Reprod.* 21 , 673-681.

Zheng, W., Magid, M.S., Kramer, E.E., and Chen, Y.T., (1996). Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am. J. Pathol.* *148* , 47-53.

Ziecik, A.J., Derecka-Reszka, K., and Rzucidlo, S.J., (1992). Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. *J. Physiol. Pharmacol.* *43* , 33-49.

Ziecik, A.J., Kaczmarek, M.M., Blitek, A., Kowalczyk, A.E., Li, X., and Rahman, N.A., (2007). Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *269* , 51-60.

IX. ANEXOS

IX. ANEXOS

Anexo 1

Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia.

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha 23 de febrero de 2010, la propuesta del Promotor **Fundación para la Investigación del Hospital la Fe** para que se realice el ensayo clínico titulado *"Preparación de folículos antrales, previa a fecundación in vitro tipo ICSI, en pacientes con baja respuesta ovárica. Ensayo clínico prospectivo aleatorizado controlado."*, con código del protocolo: **FOLLPRIM**, versión 1, de fecha 07 de diciembre de 2009 y con número EudraCT: 2009-018009-26, y considera que:

El ensayo se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de Febrero y las normas que lo desarrollan y su realización es pertinente.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El seguro o la garantía financiera previstos son adecuados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para el participante *versión 1 de fecha 07 de diciembre de 2009* y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por lo que, este CEIC, **APRUEBA** la realización de dicho ensayo clínico.

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente (Real Decreto 223/2004) para que la decisión del citado CEIC sea válida.

Que el CEIC, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y que su composición actual es la siguiente:

Presidente:

Dr. Joaquín Montalar Saicedo. (Jefe de Servicio-Oncología Médica)

Vicepresidente - Farmacólogo Clínico:

Dr. Salvador Aliño Pellicer. (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Secretario- Licenciado en Derecho:

D. Serafín Rodríguez Capellán.

Miembros:

Dr. Melchor Hoyos García. (Gerente del Departamento de salud Valencia-La Fe)

Dra. Adela Cañete Nieto. (Médico Adjunto-Oncología Pediátrica)

Dr. Marino Blanes Juliá. (Médico Adjunto-Unidad de Enfermedades Infecciosas)

Dr. Jorge Pallarés Delgado de Molina. (Jefe de Sección-Anestesia y Reanimación)

Dr. Antonio Salvador Sanz. (Jefe de Servicio-Cardiología)

Dra. Sara Brugger Frigols. (Médico Adjunto-Radiodiagnóstico)

Dr. Juan Jesús Vilchez Padilla. (Jefe de Servicio-Neurología)

Dr. Vicente Martínez Molina. (Médico Adjunto-Ginecología)

Dr. Pablo Miranda Lloret. (Médico Adjunto-Neurocirugía)

Dr. José Francisco Ibor Pica. (Médico de Atención Primaria)

Dra. María Tordera Baviera. (Farmacéutica del Hospital)

D^a. Elena Quintana Gallego. (Farmacéutica de Atención Primaria)

D^o. Jesús Delgado Ochando. (Diplomado en Enfermería)

D^o. Vicente Rosaies. (Subdirector Económico)

D. Carlos Tonda Cucarella. (Unión de Consumidores de la Comunidad Valenciana) (Miembro no vinculado al Hospital)

Lo que firmo en Valencia, 22 de febrero de 2010



Fdo.: Serafín Rodríguez Capellán
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

Anexo 2

Aprobación de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

REFERENCIA: MUH/CLIN

FECHA: 14/04/2010

ASUNTO: RESOLUCION DE AUTORIZACIÓN DE ENSAYO CLINICO

DESTINATARIO:

Fundación para la Investigación La Fe
Beatriz Alcayde Torres
Avda. Campanar 21
46009 Valencia

CONSELLERIA DE SANITAT
H. UNIVERSITARI "LA FE"

Data : - 4 MAYO 2010

ENTRADA N.º 014968
Registre Auxiliar

Adjunto se remite la resolución sobre el ensayo clínico titulado "Preparación de folículos antrales, previa fecundación in vitro tipo ICSI, en pacientes con baja respuesta ovárica. Ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado (incluye la versión 2, de 06/04/2010) N.º EudraCT "2009-018009-26"

El promotor o solicitante nombrado por éste deberá remitir la información pertinente o solicitar autorización a la AEMPS- según proceda y de acuerdo con lo que establece el Real Decreto 223/2004, de las modificaciones relevantes a la documentación del ensayo, informes de seguimiento, sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas, finalización del ensayo y demás circunstancias que establezca la legislación vigente.

**** El promotor debe comunicar al CEIC de referencia, para su información, la versión del protocolo autorizada por esta AEMPS.**



MINISTERIO SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL
REGISTRO AUXILIAR
AGENCIA E. DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS
SANITARIOS
SALIDA

N. de Registro: 19201 / RG 34684
Fecha: 28/04/2010 10:34:37

CORREO ELECTRÓNICO / E-MAIL

regaem@agamed.es

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
TEL: 91 822 51 74
FAX: 91 822 50 75



DIRECCIÓN DE LA
AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y
PRODUCTOS SANITARIOS

Referencia: MUH/CLIN

Fecha: 14/04/2010

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº EudraCT 2009-018009-26

DESTINATARIO: Fundación para la Investigación La Fe
Beatriz Alcayde Torres
Avda. Campanar 21
46009 Valencia
España

Vista la solicitud formulada por **Fundación para la Investigación La Fe** para la realización del ensayo clínico número EudraCT 2009-018009-26 titulado "**Preparación de folículos antrales, previa fecundación in vitro tipo ICSI, en pacientes con baja respuesta ovárica. Ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado (incluye la versión 2, de 06/04/2010)**", código de protocolo del promotor **FOLLPRIM**, cuyo promotor es **Fundación para la Investigación La Fe** se emite resolución a tenor de los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

PRIMERO: Con fecha 28/01/2010 presenta solicitud de autorización de ensayo clínico.

SEGUNDO: Con fecha 26/03/2010 se han solicitado aclaraciones que han sido respondidas de forma satisfactoria con fecha 09/04/2010.

A estos antecedentes de hechos le son de aplicación los siguientes:

FUNDAMENTOS DE DERECHO:

Único. Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de Medicamentos y Productos Sanitarios; el Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos; el Real Decreto 520/1999, de 26 de marzo, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española del Medicamento, y demás normas aplicables,

MINISTERIO
DE SANIDAD
Y POLÍTICA SOCIAL
Agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios



DIRECCION DE LA
AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y
PRODUCTOS SANITARIOS

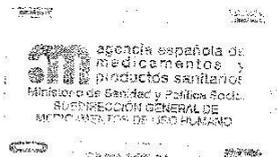
Así, del expediente se deduce que se cumplen los requisitos establecidos para su autorización de acuerdo con el Artículo 22 del Real Decreto 223/2004.

Por todo lo anteriormente expuesto la Directora de la Agencia de Medicamentos y Productos Sanitarios en el ejercicio de sus competencias **RESUELVE**:

1º.- AUTORIZAR la realización de este ensayo clínico número EudraCT 2009-018009-26,

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en el artículo 116 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones públicas y del Procedimiento Administrativo Común, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS



D^a. Cristina Avendaño Solá

