

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA RECIÉN
NACIDA Y EN LA MUJER SANA JOVEN MEDIANTE EL
USO DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA**

**Tesis doctoral presentada por María José Esquembre Gratacós,
licenciada en Medicina, para optar al título de Doctora en Medicina y
Cirugía**

**Dirigida por,
Prof. F. Bonilla-Musoles
Prof. F. Raga Baixauli
Prof. F. Bonilla Bartret**

VALENCIA, 2016

Yo, **Fernando María Bonilla-Musoles**, Doctor en Medicina y Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado

ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA RECIÉN NACIDA Y EN LA MUJER SANA JOVEN MEDIANTE EL USO DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA,

ha sido realizado íntegramente bajo mi dirección, compartida con los profesores Dr. Francisco Raga Baixauli y Dr. Francisco Bonilla Bartret, en este departamento, por Dña. María José Esquembre Gratacós, para optar al título de Doctora en Medicina y Cirugía; y que reúne las condiciones necesarias para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente

Prof. F. Bonilla-Musoles
Valencia, 2016

Yo, **Francisco Raga Baixauli**, Doctor en Medicina y profesor asociado del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado

ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA RECIÉN NACIDA Y EN LA MUJER SANA JOVEN MEDIANTE EL USO DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA,

ha sido realizado íntegramente bajo mi dirección, compartida con los profesores Dr. Fernando María Bonilla-Musoles y Dr. Francisco Bonilla Bartret, en este departamento, por Dña. María José Esquembre Gratacós, para optar al título de Doctora en Medicina y Cirugía; y que reúne las condiciones necesarias para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente

Prof. F. Raga Baixauli
Valencia, 2016

Yo, **Francisco Bonilla Bartret**, Doctor en Medicina y profesor asociado del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado

ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA EN LA RECIÉN NACIDA Y EN LA MUJER SANA JOVEN MEDIANTE EL USO DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA,

ha sido realizado íntegramente bajo mi dirección, compartida con los profesores Dr. Fernando María Bonilla-Musoles y Dr. Francisco Raga Baixauli, en este departamento, por Dña. María José Esquembre Gratacós, para optar al título de Doctora en Medicina y Cirugía; y que reúne las condiciones necesarias para ser defendida públicamente ante la comisión correspondiente

Prof. F. Bonilla Bartret
Valencia, 2016

Agradecimientos,

porque sin ellos, esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

En primer lugar, al Prof. Bonilla-Musoles, por poner a mi disposición la más avanzada tecnología ecográfica, su apoyo incondicional y dedicación. Gracias por el privilegio de haberle tenido como jefe, por su cariño y acogida desde el primer día que entré como residente en su servicio. Gracias, jefe, porque no solo es un grandísimo profesional, sino una persona excelente.

Al Prof. Raga Baixauli, por aconsejarme, orientarme y ayudarme en la elaboración de esta tesis, así como en todos los trabajos de investigación que he desarrollado a lo largo de mi residencia. Gracias Paco por tu confianza en mí desde el principio, por tu grandísima ayuda a lo largo de estos años, por tu apoyo incondicional desde que nos conocemos.

Al Prof. Bonilla Bartret, por sus constantes sugerencias y enseñanzas en esta área. Por todo lo que me ha enseñado en estos 4 años, por su cariño y ayuda en todos los trabajos que he hecho con él. Gracias Fran por todo lo compartido, por estar especialmente cerca ese 4 de julio, por ser como eres.

A mis compañeros de trabajo del Clínico. A residentes, adjuntos, matronas, enfermeras, auxiliares y celadores. Gracias a todos, porque más que compañeros sois grandes amigos. Gracias por ayudarme en la recogida de datos, por colaborar en este proyecto para que saliera adelante. Gracias a mis resis mayores, por todo lo que me habéis enseñado; a mis pequeños, por todo lo compartido; a mis adjuntos, por todo lo que he aprendido de vosotros. Grandísimo equipo de ginecólogos y matronas.

A mis co-r, Ana y Maite, porque no podía haber tenido mejores compañeras en estos 4 años. Gracias por ayudarme, por todas las risas, por multiplicar los buenos momentos y dividir los malos. Sois las mejores.

Y por supuesto, a mi familia. A mis padres y hermanos. Porque no imagino ni mejores padres ni mejores hermanos. Gracias por quererme, animarme, ayudarme, confiar en mí. Gracias papás por estar siempre a mi lado, sois un gran ejemplo en todos los sentidos. Os quiero.

Y finalmente, gracias a Pablo, mi marido. Porque desde que nos conocimos, cuando yo empezaba la residencia, ha sido un apoyo constante en todo. Gracias por poder compartir mi vida contigo, por tener la grandísima suerte de levantarme todos los días a tu lado. Gracias por quererme tanto y demostrármelo, por estar siempre ahí. Te admiro y te quiero.

*Para la mujer,
para que conociendo su reserva ovárica
pueda tomar sus propias decisiones
siendo consciente del grandísimo potencial que tiene*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS.....	2
1.2. RESERVA OVÁRICA.....	14
1.2.1 <i>Marcadores de reserva ovárica</i>	16
1.2.1.1 <i>Marcadores dinámicos</i>	17
1.2.1.2 <i>Marcadores estáticos</i>	19
1.2.1.3 <i>Marcadores ecográficos</i>	28
1.2.2 <i>Método combinado de cálculo de reserva ovárica</i>	31
1.3. ¿POR QUÉ ES IMPORTANTE CONOCER LA RESERVA OVÁRICA?	32
1.4. IMPORTANCIA DE LA TESIS	34
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
3.1. POBLACIÓN Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN	45
3.1.1 <i>Grupo de mujeres adultas</i>	45
3.1.1.1 <i>Grupo control positivo</i>	45
3.1.1.2 <i>Grupo control negativo</i>	46
3.1.1.3 <i>Grupo estudio</i>	47
3.1.2 <i>Grupo de recién nacidos</i>	49
3.2. ESTUDIO HORMONAL	50
3.3. ESTUDIO ECOGRÁFICO	54
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
3.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	57
4. RESULTADOS.....	59
4.1. GRUPO DE RECIÉN NACIDOS	59
4.2. GRUPO DE MUJERES ADULTAS	61

5. DISCUSIÓN	73
5.1 ¿POR QUÉ HACER UN SCREENING DE RESERVA OVÁRICA?	76
5.2 ¿CUMPLE EL SCREENING DE RESERVA OVÁRICA LOS PUNTOS QUE LA OMS CONSIDERA QUE DEBE CUMPLIR TODA PRUEBA DE SCREENING?	78
5.3 ¿ES ÉTICO EL CÁLCULO DE LA RESERVA OVÁRICA?	86
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFIA	93

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la aparición de los métodos anticonceptivos hormonales en los años 60 y a la incorporación progresiva de la mujer al mundo laboral, la edad media del primer embarazo se ha ido retrasando hasta calcularse actualmente en los 32 años (Schimidt et al., 2012; Martin et al., 2013; Bongaarts, 2015; Sander et al., 2015). No es de extrañar por tanto que problemas como la infertilidad y la esterilidad hayan doblado su incidencia en los últimos 20 años (te Velde et al., 2012) y que por eso, sociedades como la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) y la *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) hayan llevado a cabo programas educativos para informar a hombres y mujeres sobre los riesgos de retrasar la paternidad y la conveniencia de adelantar la edad media de la primera gestación (ASRM, 2003; Tremellen and Savulescu, 2014).

1

No obstante, es evidente que la edad (fundamentalmente de la mujer) no es el único factor que influye en la dificultad a la hora de tener hijos, si bien es uno de los más importantes, no sólo por la disminución en la reserva ovárica que comportan los años, sino también por la menor calidad de los ovocitos con el paso del tiempo (Broekmans et al., 2009; Lee et al., 2014). De hecho, el estudio de la reserva ovárica y sus marcadores (en concreto la hormona antimülleriana, HAM) es uno de los temas más en boga en los últimos años en reproducción asistida y el tema central de esta tesis.

Así, el objetivo del presente estudio es discutir la necesidad de analizar la reserva ovárica mediante posibles programas de screening para aconsejar a las mujeres de manera individual sobre la conveniencia o no de retrasar la maternidad o incluso de criopreservar ovocitos en caso de que en ese momento concreto no considerara conveniente ser madre por sus circunstancias personales (Stoop et al., 2015).

De ahí, por tanto, la importancia del estudio de la reserva ovárica y el conocimiento de la foliculogénesis que a continuación vamos a detallar, porque sólo conociendo en detalle los mecanismos por los que el desarrollo folicular se lleva a cabo, sus pasos y las sustancias que intervienen en la regulación de dicho proceso, se podrá hacer frente a esta situación que hoy en día constituye ya un problema de salud pública (Smeeding, 2014).

2

1.1. Oogénesis y foliculogénesis

La reserva ovárica se define como el número de folículos primordiales presentes en los ovarios de una mujer en edad reproductiva en un momento dado (Oktem and Urbam, 2010). La forma más inicial de las células germinales deriva del epiblasto proximal adyacente al ectodermo extraembrionario que se diferencia a partir de señales procedentes de dicho ectodermo generadas por las proteínas *BMP4* y *BMP2* (Ying et al., 2001; Ying and Zhao, 2001; Oktem and Urbam, 2010). El inicio de la actividad de las células germinales primordiales como tal, está marcado por la expresión de la proteína transmembrana *Fragilis* en dichas

células, que induce la expresión del gen *Stella*, exclusivo de las células germinales y que permite mantener su pluripotencialidad en su migración desde el endodermo de la pared dorsal del saco vitelino cerca del alantoides hacia la gónada definitiva (Saitou et al., 2002; Lange et al., 2003; Oktem and Urbam, 2010) entre las semanas 4 y 5 de gestación, momento en el que el número de células germinales primordiales es de aproximadamente 100 (Oktem and Urbam, 2010). De esta manera, alrededor de la semana 7, la colonización del tejido gonadal por las células germinales es completa (Fig. 1), lo cual es fundamental para la formación y desarrollo del ovario, pues sin ellas, las gónadas degenerarían (Merchant-Larios and Centeno, 1981; Oktem and Urbam, 2010).

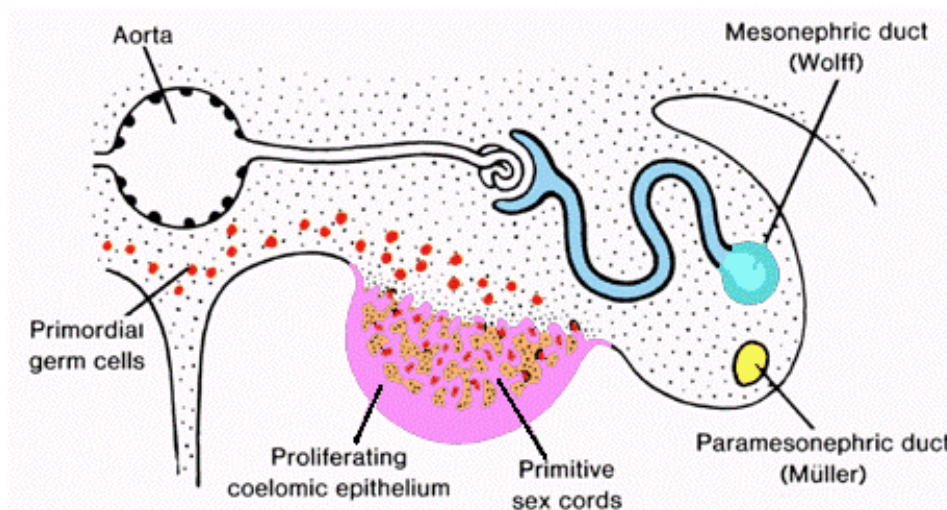


Figura 1. Colonización del tejido gonadal por las células germinales

Una vez ya en la gónada, las células germinales (llamadas oogonias a partir de este momento) inician un proceso de mitosis intenso, pasando de 10.000 en la semana 6 de gestación a 600.000 en la semana 8, llegando hasta los 6.000.000 en la semana 20. A partir de aquí, el ratio de división

mitótica empieza a declinar y finaliza en la semana 28, momento en el que también finaliza el proceso de atresia iniciado en la semana 8 que tiene su culmen en la semana 20. Como consecuencia de estos procesos de mitosis y atresia, la reserva ovárica pasa a ser de 6.000.000 de oogonias en la semana 20 de gestación a 1.000.000 de células al nacimiento (que ya son ovocitos primarios, pues a partir del séptimo mes de gestación las oogonias no pueden sobrevivir si no entran en meiosis y forman los folículos primordiales) y sólo 300.000-400.000 en la pubertad, de tal forma que menos del 1% de las células primordiales llega a madurar (menos de 300), quedando sólo unos 1.000 folículos en el momento de la menopausia (Oktem and Oktay, 2008; Oktem and Urbam, 2010), (Fig. 2).

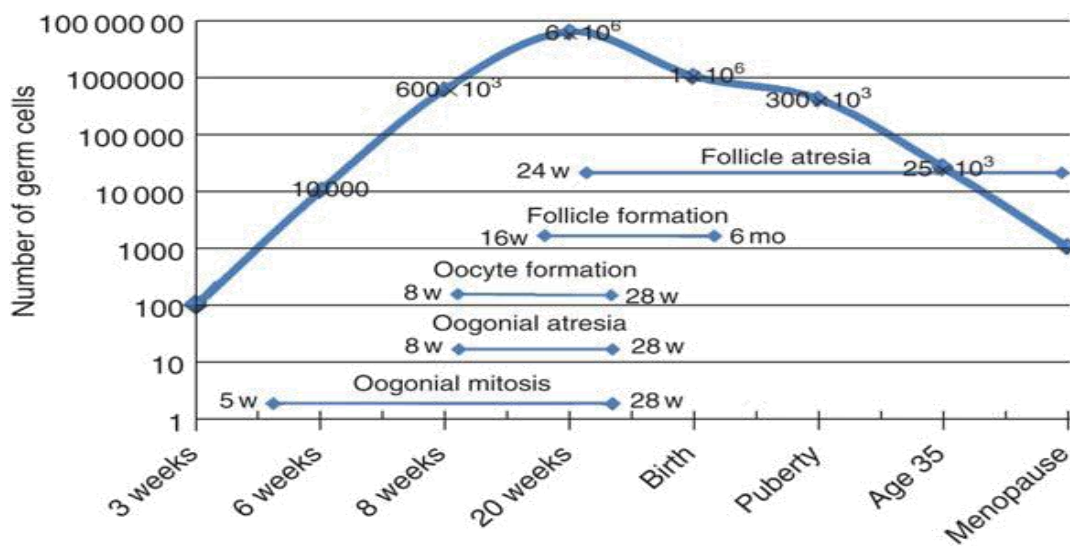


Figura 2. Evolución de las células germinales según el paso del tiempo. Procesos conjuntos de mitosis y atresia (tomado de Oktem and Urman, 2010)

Entender este proceso de mitosis y atresia que se lleva a cabo en la gónada primaria y cuyos motivos resultan inexplicables todavía para la

biología es fundamental, ya que la reserva ovárica de una mujer dependerá tanto de la actividad mitótica de las oogonias como de su atresia. De hecho, existe el dogma en medicina de que el número de ovocitos primarios no aumenta durante la vida del individuo y, por tanto, que la reserva ovárica viene ya determinada desde el momento del nacimiento. Sin embargo, estudios recientes han puesto esto en duda y numerosas investigaciones se están llevando a cabo en este sentido (Zou et al., 2009; White et al., 2012).

Las últimas fases de mitosis dan lugar a la formación de sincitios en los que las oogonias, conectadas unas con otras a través de puentes de membrana, sufren procesos de meiosis de manera simultánea entre las semanas 8 y 13 de gestación, antes de la formación de los folículos, siendo el gen *Stra8* fundamental en la síntesis del ADN premeiótico y en la progresión de la meiosis. A partir del inicio de la síntesis de ADN premeiótico, las oogonias pasan a llamarse ovocitos primarios (Oktem and Urbam, 2010) (Fig. 2).

Así, tras la formación de los ovocitos primarios en semana 15, comienza la formación de los folículos primordiales, proceso que se extiende hasta 6 meses después. Los folículos primordiales están formados por ovocitos primarios detenidos en la primera fase de la meiosis, con material genético doble (diploides) y rodeados de una capa de células de la pregranulosa. Estos folículos primordiales son los que determinan el tiempo de vida reproductivo de una mujer, es decir, su reserva ovárica y aún existiendo marcadores indirectos que nos permiten estudiar esta reserva, no se ha descubierto todavía ninguno que sea

directo. Múltiples genes intervienen en el paso de ovocito simple a la formación de los folículos primordiales, entre ellos: *Fig alpha*, *Notch*, *Daz la*, *Nerve growth factor* etc. y todos son fundamentales para que este proceso se lleve a cabo con normalidad (Oktem and Urbam, 2010).

Los folículos primordiales permanecen latentes (letargo controlado por el gen *PTEN* localizado en el cromosoma 10 que ejerce un efecto inhibitor sobre el desarrollo folicular) hasta que son reclutados en una primera fase de crecimiento para pasar a llamarse folículos primarios. Múltiples factores de activación y de inhibición participan en este proceso que transforma las células planas de la granulosa en células cuboideas y a los pequeños ovocitos en ovocitos más grandes (>60 micras) con zona pelúcida. Entre los factores que promueven dicho proceso nos encontramos con: *Kit ligand*, *FGF-2* (Basic fibroblastic growth factor), *KGF* (keratinocyte-growth factor), *BMP 4, 7, 15* etc., mientras que los que se encargan de inhibirlo son: *PTEN* (tumor supressor gene), *Foxl2*, *Foxo3a*, *AIRE*, *FMR*, la famosa *HAM* etc. Estos factores inhibidores son fundamentales, ya que la ausencia de los mismos o su mal funcionamiento derivarán en un agotamiento precoz de la reserva ovárica y, por tanto, en un fallo ovárico precoz (Oktem and Urbam, 2010) (Fig. 3). De hecho, estos genes implicados en el reclutamiento folicular determinarán la edad en que la mujer tendrá la menopausia, al estar implicados en el proceso de depleción folicular (Gleicher et al., 2015).

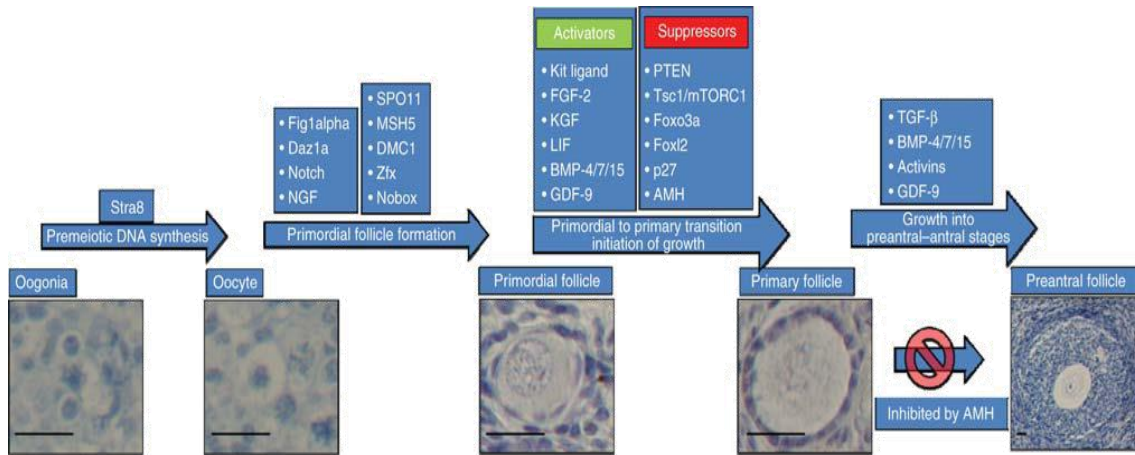


Figura 3. Sustancias inhibidoras y promotoras del desarrollo folicular en sus etapas iniciales (tomado de Oktem and Urman, 2010)

El reclutamiento de los folículos primordiales para dar lugar a los primarios comienza en la vida fetal y continúa hasta que la reserva ovárica se agota, dejando tan sólo alrededor de 1.000 folículos en el momento de la menopausia (Oktem and Urbam, 2010) (Fig. 2). Este proceso es continuo y diferente al reclutamiento cíclico de los folículos antrales que se hace bajo la acción de la FSH (hormona que en el paso previo de la diferenciación folicular no interviene). De hecho, podríamos hablar de 2 reservas ováricas: la primera formada por los folículos primordiales (que es la reserva ovárica fetén), independiente de las gonadotropinas y, la segunda que deriva de la primera y que depende de la FSH, siendo ésta una reserva dinámica que cíclicamente se va agotando (Oktem and Urbam, 2010; Monniaux et al, 2014). Estas 2 reservas están íntimamente relacionadas, reduciéndose con el paso del tiempo ambas, tanto en número como en calidad (Fig. 4 y 5).

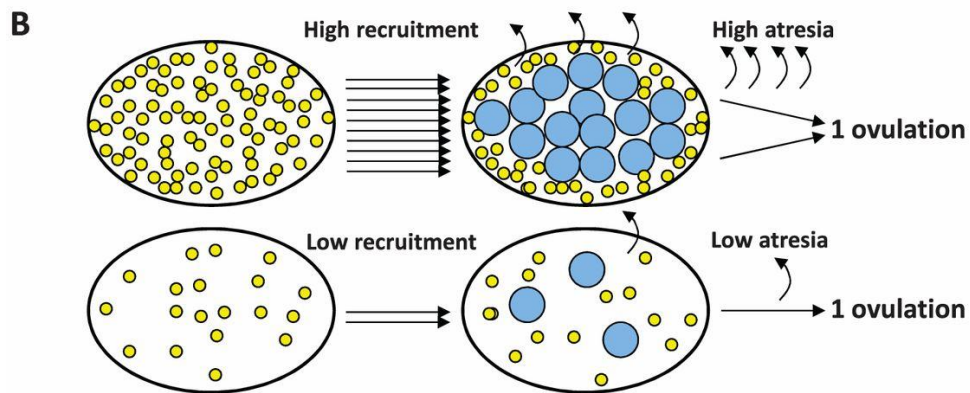
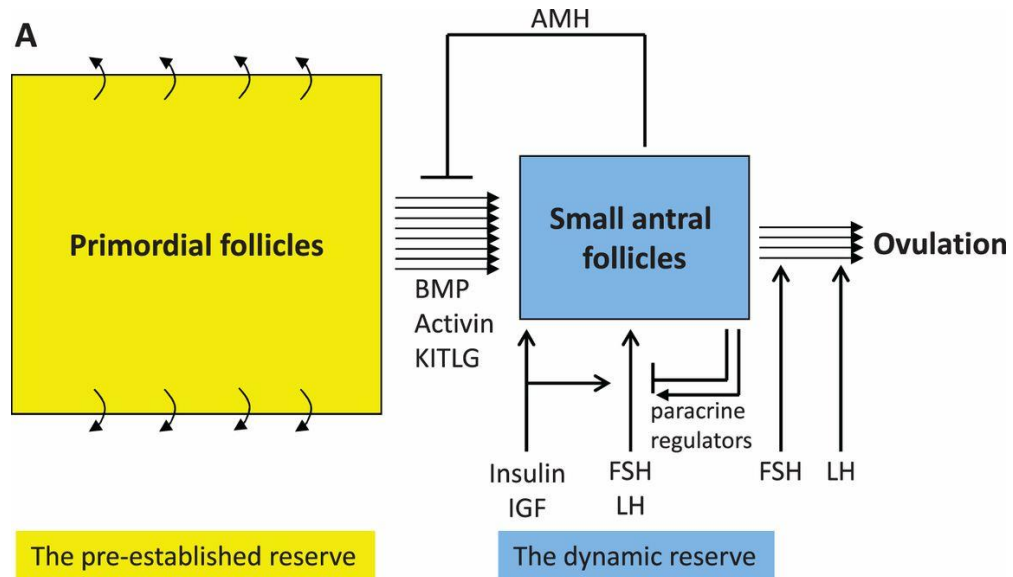


Figura 4. La reserva ovárica dinámica se nutre de la preestablecida, siendo varios los factores que regulan dicho proceso, entre ellos la HAM (a). Los procesos de reclutamiento y atresia son más rápidos en las reservas ováricas altas, aunque el número final de ovulaciones es el mismo (b) (tomado de Monniaux et al., 2014)

8

Siguiendo con esta idea de dos reservas coexistentes, queremos resaltar el siguiente esquema que ahonda en lo mismo (Fig. 5). En él, se representan 3 momentos distintos de la vida de la mujer: la pubertad, la

edad adulta y la perimenopausia. Las reservas vienen identificadas a su vez como dos tanques en cada columna, siendo los primeros los constituidos por la reserva fetén, la de los folículos primordiales y, estando los segundos formados por la reserva dinámica en continuo crecimiento que se nutre de los primeros. La relación entre HAM, FSH e Inhibina B viene representada a su vez por la balanza cuyo punto de apoyo es la HAM, cuyo triángulo varía en tamaño en función de la cantidad de folículos preantrales y antrales pequeños que existen y que por tanto la secretan.

Así, vemos que en la primera etapa de la vida, en torno a la pubertad, antes del inicio de los ciclos menstruales, hay un gran número de folículos primordiales, con mayoría de los formados en las primeras etapas de la oogénesis (bolas rojas). De éstos, muchos se atresian y otros pasan al segundo tanque, convirtiéndose en los folículos preantrales y antrales pequeños responsables de la secreción de HAM y de los procesos de reclutamiento y dominancia. En esta etapa, los niveles de Inhibina B son mayores que los de FSH.

En la segunda etapa de la vida, el número de folículos primordiales es menor y, la mayor parte de ellos se han formado más tardíamente que los primeros (bolas verdes). Los niveles de FSH e Inhibina B están equilibrados porque los procesos de selección y atresia son más equitativos.

Finalmente, en la perimenopausia, los folículos son de menor calidad por el tiempo transcurrido (bolas negras), los niveles de HAM son

muy bajos por haber menos cantidad de pequeños folículos antrales y preantrales y los niveles de FSH son muy elevados por feed-back desde el ovario al eje hipotálamo-hipófisis.

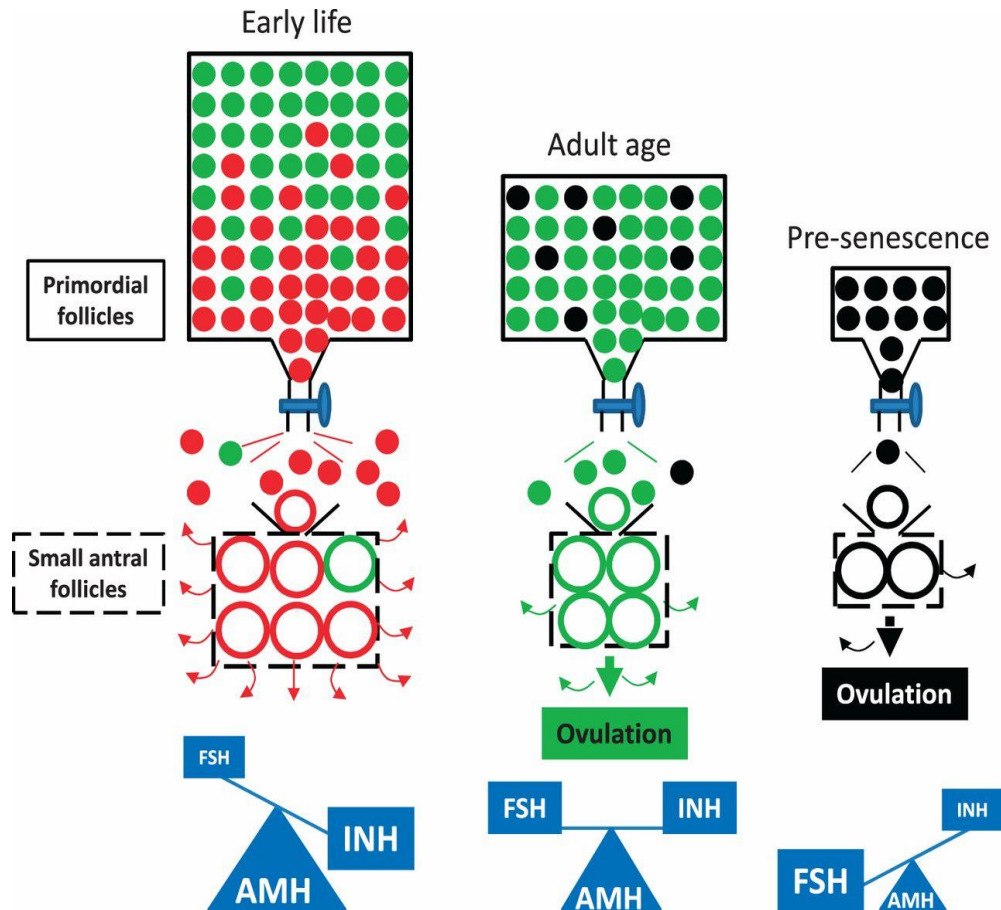


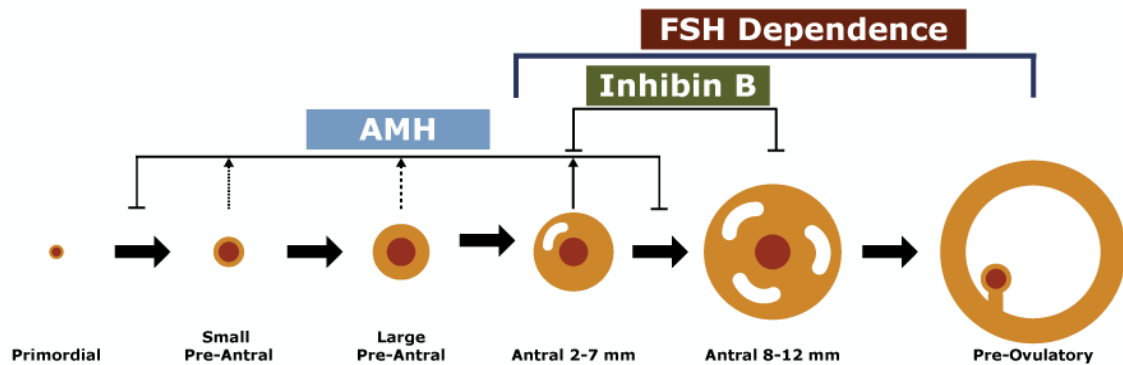
Figura 5. Relación entre las reservas ováricas y los cambios hormonales a lo largo de las etapas de la vida de la mujer (tomado de Monniaux et al., 2014)

Tras la formación de los folículos primarios, el crecimiento de los mismos continúa hasta formar los preantrales, antrales y ovulatorios (secundarios, terciarios y de Graaf respectivamente).

Los folículos secundarios se caracterizan por el crecimiento de las células de la granulosa, que se disponen en múltiples capas, así como por el crecimiento del ovocito (que de 40-60 micras en un estadio primario pasa a 120-150 micras) y por la formación de la lámina basal y de las células de la teca (Oktem and Urbam, 2010). El desarrollo de estos folículos secundarios dura meses y parece independiente de las gonadotropinas, ya que aunque sí expresan receptores para la FSH (Oktay et al., 1998), no parece tener esta hormona un papel decisivo en el crecimiento folicular en este estadio. El paso de folículo primario a secundario, viene determinado por otros factores, como por ejemplo: *TGF-Beta*, *BMP 4*, *7*, *15*, *GDF 9* (factor 9 de diferenciación) etc. y la ya mencionada *HAM*, de la que hablaremos extensamente más adelante y que tiene un papel inhibitor en el paso de folículo primario a preantral, protegiendo a la reserva ovárica de una depleción incontrolada y precoz. La *HAM* no se expresa en los folículos primordiales, sino en las células de la granulosa de los preantrales y antrales pequeños, teniendo su máxima expresión en los que miden menos de 4 mm (Oktem and Urbam, 2010; Borekmans et al., 2008) (Fig. 6 y 9).

Los folículos secundarios ya formados siguen creciendo y pasan a llamarse terciarios o antrales cuando las células de la granulosa y de la teca aumentan, aumenta también la vascularización y el crecimiento del ovocito y se produce la formación del antro, espacio líquido en torno al ovocito (Oktem and Urbam, 2010) (Fig. 7). El antro se forma cuando el folículo alcanza las 200-300 micras y se produce como consecuencia de la secreción de líquido por parte de las células foliculares y de lo que exudan las células de la teca. A partir de los 4-5 mm, estos folículos comienzan a

hacerse dependientes de la FSH en su crecimiento y progresivamente dejan de estar inhibidos por la HAM (Mc Gee and Hsueh, 2000) (Fig 6 y 9). Así, se constituye la reserva ovárica dinámica, que bajo la acción de la FSH estimula el crecimiento y maduración en oleadas de los folículos antrales de más de 4 mm, siendo su fuente de alimentación el grupo de folículos primordiales (Monniaux et al, 2014) (Fig. 4 y 5).



12

*Figura 6. Puntos específicos de acción de FSH, Inhibina B y HAM
(modificado de Broekmans et al., 2008)*

Del conjunto de folículos terciarios, uno de ellos será el dominante y el que finalmente se ovulará (folículo de Graaf), perdiéndose de esta forma miles de folículos por el camino. De hecho, partiendo aproximadamente de 400.000 folículos primordiales al llegar la pubertad y teniendo en cuenta que todos los meses se utilizan unos 1.000 folículos en los procesos de crecimiento y maduración, si asumimos que la mujer tiene unos 450 ciclos menstruales en su vida reproductiva (12-13 ciclos por año durante 30-35 años aproximadamente) al llegar a la menopausia una mujer contaría con sólo unos 1.000 folículos (un 0.25% de su reserva en la pubertad) (Fig. 2).

Es fundamental en este proceso de crecimiento y maduración la prevención de la luteinización precoz de los folículos antrales, siendo las proteínas *BMP-6*, *BMP-15* y el factor *GDF-9* claves para esto y para limitar la síntesis de progesterona. El efecto de estos factores inhibidores finalizará por tanto cuando el ovocito sea ovulado y sólo los folículos que expresen altos niveles de receptores de FSH y LH junto con actividad aromatasa inducida por la FSH serán los seleccionados para la dominancia y ovulación (Oktem and Urbam, 2010).

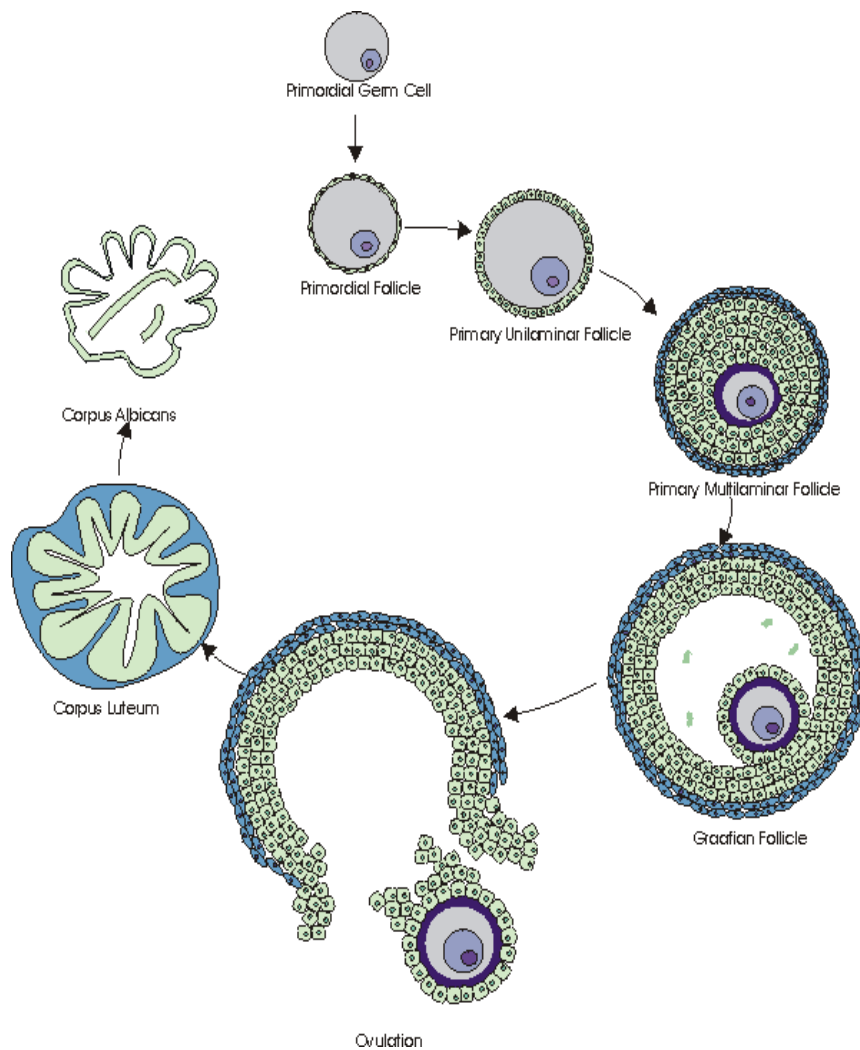


Figura 7. Crecimiento y maduración folicular

En cuanto al material genético, éste se mantiene diploide hasta el momento de la formación del ovocito secundario, punto en el que se desprende el primer corpúsculo polar 22 X, completándose así la primera meiosis. La segunda, se completará con la fecundación, momento en que se desprende el segundo corpúsculo polar y el óvulo ya maduro se une con el espermatozoide.

En el ovario de la mujer se producen a la vez la mayor parte de los procesos que acabamos de comentar. Folículos primordiales, preantrales y antrales conviven y múltiples oleadas de crecimiento folicular se producen a la vez según las últimas teorías (Baerwald et al., 2003), pero es a partir de la pubertad, con la ovulación, cuando se produce el paso de folículos primordiales a primarios (Fig. 7).

14

1.2. Reserva ovárica

Como ya hemos comentado, la reserva ovárica se define como el número de folículos primordiales presentes en los ovarios de una mujer en un momento dado, que en un principio es independiente de gonadotropinas. Nos referimos pues con este concepto a la reserva ovárica estática y fetén de la que hablábamos anteriormente.

Esta reserva es cambiante a lo largo de la vida de la mujer, tal y como hemos mencionado anteriormente. Al nacimiento, aproximadamente la reserva es de 1.000.000 de folículos, llegando a ser

unos 400.000-500.000 en la pubertad y apenas 1.000 en la menopausia (Fig. 2). Del tamaño de esta reserva dependerá la vida reproductiva de la mujer y el momento de la menopausia, pues sólo a partir de ella se podrán llevar a cabo los procesos de selección y dominancia de los folículos (reserva dinámica) (Forabosco and Sforza, 2007).

Esta reserva ovárica viene establecida desde el momento del nacimiento, no pudiendo ser aumentada posteriormente, aunque algunos autores están trabajando en la hipótesis de que con el estímulo adecuado sí que se podrían generar nuevas células primordiales, como ya hemos comentado anteriormente (White et al., 2011). Por eso, se han llevado a cabo trabajos que estudian dicha reserva en recién nacidas mediante la determinación de la HAM en sangre de cordón (Bergada et al., 2006; Sir-Petermann et al., 2010), pero los resultados que se han obtenido no han sido concluyentes a favor de realizar dicho procedimiento para conocer la reserva ovárica ya desde los primeros días de vida, como luego explicaremos.

15

La reserva ovárica comienza a disminuir en picado a partir de la segunda mitad de la década de los 30 y precede a la menopausia en 10-12 años (Lass, 2004). En un 1-2% de las mujeres por debajo de los 40 años, puede observarse una depleción prematura de los folículos que resultará en un fallo ovárico precoz, que en algunos casos viene determinado genéticamente (Monniaux et al., 2014) (Fig. 2).

De hecho, se sabe que aproximadamente el 10% de las mujeres sufren un envejecimiento ovárico precoz, que en el 8-9% de los casos se

define como insuficiencia ovárica primaria oculta y en el 1-2% restante como insuficiencia ovárica primaria o fallo ovárico prematuro. En la mayor parte de casos, el diagnóstico se produce en estadios clínicos avanzados, cuando la mujer presenta ya problemas de esterilidad (Gleicher et al., 2015). De ahí, la importancia de detectar estos casos de manera prematura.

Un trabajo publicado recientemente, recomienda el estudio de la reserva ovárica mediante dos determinaciones de HAM separadas un mes en pacientes con riesgo de sufrir un fallo ovárico precoz. Si los valores corresponden a la edad de la paciente, basta con repetir la AMH de manera anual, para después repetirla cada 2 años después de 3-5 años sin alteraciones (Gleicher et al., 2015). Por el contrario, si los valores son bajos para la edad de la paciente, defienden la medida de la HAM cada 3-6 meses (Gleicher et al., 2015).

Para conocer esta reserva ovárica, múltiples marcadores se han desarrollado a lo largo de los últimos años, pero ninguno se ha constituido como marcador directo y definitivo de la misma. Vamos a detallarlos a continuación.

1.2.1 Marcadores de reserva ovárica

El marcador perfecto de reserva ovárica no existe todavía. El test ideal sería aquel que pudiese determinar el tamaño y la calidad del pool de folículos primordiales tras un ciclo menstrual y, por tanto, que pudiese

identificar a las mujeres que van a presentar un fallo ovárico precoz. Sin embargo, no se ha desarrollado todavía ningún marcador directo que sea capaz de revelar el pool de folículos primordiales que quedan y que constituye el potencial reproductivo a largo plazo (de Carvalho et al., 2008).

Los marcadores de los que disponemos son marcadores indirectos que en mayor o menor medida nos aportan información más o menos valiosa y que pueden clasificarse en 3 grandes grupos: los dinámicos, los estáticos y los ecográficos (Committee on Gynecologic Practice, 2015; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015).

1.2.1.1 *Marcadores dinámicos*

Muy poco utilizados en la actualidad, aunque han tenido su importancia en años anteriores (de Carvalho et al., 2008).

Test de citrato de clomifeno

El clomifeno es capaz de actuar como antagónico en los receptores de estrógenos de la hipófisis, de tal forma que simula una privación estrogénica que produce de forma compensatoria el aumento de la FSH y por tanto el reclutamiento folicular. En pacientes con una reserva folicular buena, esto se traduce en un aumento del estradiol y una disminución posterior de la FSH por feed-back negativo, mientras que en pacientes con una reserva comprometida, el reclutamiento folicular se

produce en menor medida, siendo por tanto la producción de estradiol menor y la reducción de la FSH no tan manifiesta.

Con el paso del tiempo se ha visto que este test apenas aporta nada con respecto a la medición aislada de FSH sobretodo en mujeres jóvenes, por eso hoy en día apenas se utiliza, quedando relegado a casos excepcionales (de Carvalho et al., 2008).

Test agonista GnRH

Se basa en la inducción del pico de FSH, LH, estradiol e Inhibina B que ocurre 24 horas después de su administración, seguida de la inhibición de la hipófisis.

18

No aporta mayores beneficios que el recuento de folículos antrales o que cualquier otro marcador, por lo que debido a los riesgos que se derivan de la estimulación ovárica ha quedado relegado a un segundo plano (de Carvalho et al., 2008).

Test de FSH exógena

Con la administración de FSH exógena, si la reserva folicular es adecuada, se produce un incremento en el estradiol y la Inhibina B. Sin embargo, como los otros test ya comentados, no supone ningún beneficio frente al resto de marcadores, por lo que tampoco se utiliza actualmente con este fin exclusivamente (de Carvalho et al., 2008).

1.2.1.2 Marcadores estáticos

Estradiol basal

Es un predictor de respuesta ovárica en los ciclos de estimulación de reproducción asistida y, por tanto, se ha querido utilizar también como marcador indirecto de reserva ovárica. Sin embargo, debido a la baja sensibilidad y la falta de estandarización de unos valores homogéneos de corte, no se considera actualmente un marcador fiable de reserva (de Carvalho et al., 2008).

FSH

Ha sido uno de los marcadores más utilizados hasta ahora, de tal manera que valores altos se asocian con una respuesta ovárica baja. Sin embargo, se ha visto que sólo es útil cuando es muy alto y, por tanto, sólo es buen marcador cuando la reserva ovárica ya está realmente comprometida, no antes (de Carvalho et al., 2008).

Inhibina B

Es una glicoproteína de la súper familia de los factores de crecimiento beta (TGF BETA) secretada por las células de la granulosa y de la teca, que se encarga de inhibir la secreción de FSH; de tal forma que en los ciclos ovulatorios normales los niveles de FSH e Inhibina B están inversamente relacionados. Así, la Inhibina B asciende durante la fase

folicular hasta que alcanza un pico que coincide con el de la masa de las células de la granulosa para posteriormente descender y llegar a bajas concentraciones en la fase lútea.

De esto, se puede deducir que la Inhibina B juega un papel importante en el desarrollo folicular, reflejando la reserva ovárica. Sin embargo y, aunque constituye un buen marcador según la mayor parte de los estudios, otros defienden que estos resultados no son reproducibles y, por tanto, que no puede constituirse como único marcador de reserva (Scheffer et al., 2007; de Carvalho et al., 2008).

HAM

20

Sin duda el marcador de reserva ovárica estrella desde hace unos años, de hecho, sobre esta sustancia se basa el trabajo de investigación que hemos elaborado.

La hormona antimülleriana (HAM) es, al igual que la Inhibina B, una glicoproteína de la TGF-BETA súper familia (no una hormona a pesar de su nombre). La sintetizan las células de Sertoli en varones y las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños en mujeres. Tiene dos funciones cruciales: en hombres, favorecer la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación sexual en el estadio embrionario (Fig. 8); en mujeres, inhibir el paso de folículos primordiales a primarios y, por tanto, determinar el momento en que los folículos vuelven a entrar en meiosis y el ratio de depleción de los mismos (de Carvalho et al., 2008).

Debido a esto precisamente, la HAM se expresa de manera distinta en hombres y en mujeres: así, en varones empieza a detectarse desde la semana 8 de gestación y aumenta de manera progresiva a lo largo del embarazo y la primera infancia, declinando posteriormente de forma gradual hasta la pubertad; en mujeres, la expresión es totalmente contraria, como explicamos a continuación (Ledger, 2010).

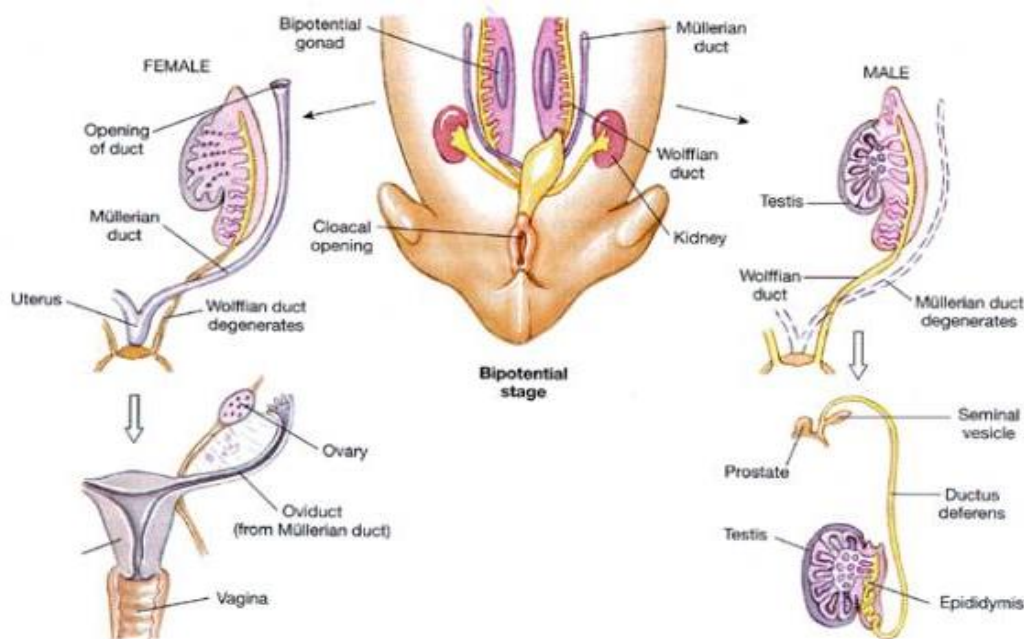


Figura 8. Desarrollo del aparato genital en embriones

En la diferenciación sexual de los embriones femeninos la HAM es inexistente. Ésta presenta 2 picos de aparición: el primero cuando empieza a sintetizarse por primera vez en las células de la granulosa al reclutarse los primeros folículos primordiales en torno a la

semana 36 de gestación; y el segundo en la pubertad, cuando el eje hipotálamo-hipófisis-ovario se activa y comienzan los ciclos ovulatorios (de Carvalho et al., 2008; Hagen et al., 2012 y 2012b; Lie Fong et al., 2012).

La HAM, como ya hemos comentado, se sintetiza por los folículos preantrales y antrales pequeños, siendo su expresión máxima cuando éstos miden por debajo de 4 mm y casi inexistente cuando alcanzan tamaños de 8-10 mm, momento en que la diferenciación es lo suficientemente importante como para empezar a ser controlados por la FSH y comenzar su crecimiento hasta la dominancia (Mc Gee and Hsueh, 2000; Broekmans et al., 2008; de Carvalho et al., 2008) (Fig 6 y 9).

Múltiples trabajos de investigación se han llevado a cabo con el fin de establecer cuál es el papel exacto de la HAM en la foliculogénesis y, por ende, en la reserva ovárica. Todos coinciden en que tiene un papel modulador en el reclutamiento folicular, ejerciendo un papel inhibitorio en los folículos primordiales. Así, actúa en las células de la granulosa para limitar el número de folículos que se reclutan, impidiendo que sean seleccionados por la FSH. De hecho, la HAM inhibe la sensibilidad de las células de la granulosa a la FSH, por lo que la progresión a folículo antral se produce por la expresión variable de los receptores de HAM y FSH, creciendo los que más receptores tienen para la FSH y menos para la HAM (de Carvalho et al., 2008) (Fig. 9).

De hecho, estudios con ratones demuestran este papel regulador de la HAM en estos 2 pasos importantes de la foliculogénesis: por una parte, en ratones sin HAM, los folículos primordiales se reclutan

mucho más rápidamente y, por tanto, el pool se termina de manera precoz llegando antes la menopausia al agotarse los ciclos ovulatorios (Durlinger et al., 1999; Visser et al., 2007; Broer et al., 2011); por otra parte, sin HAM, los folículos son más sensibles al efecto de la FSH. De hecho, cada folículo tiene un umbral determinado por encima del cual la FSH ejerce su acción y lo selecciona, de tal forma que se ha visto que unos niveles de HAM bajos se relacionan con una disminución en este umbral para la FSH y, por tanto, con una selección para el crecimiento mucho más rápida que si hubiera habido HAM (Visser et al., 2007) (Fig. 9).

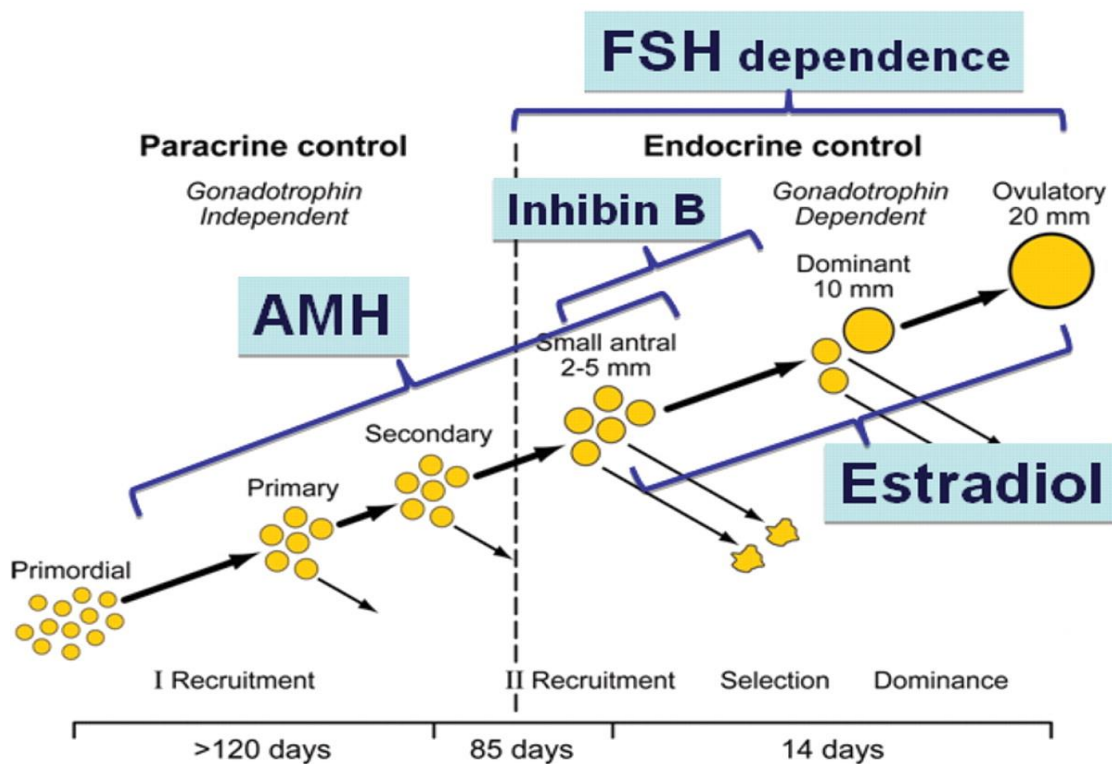
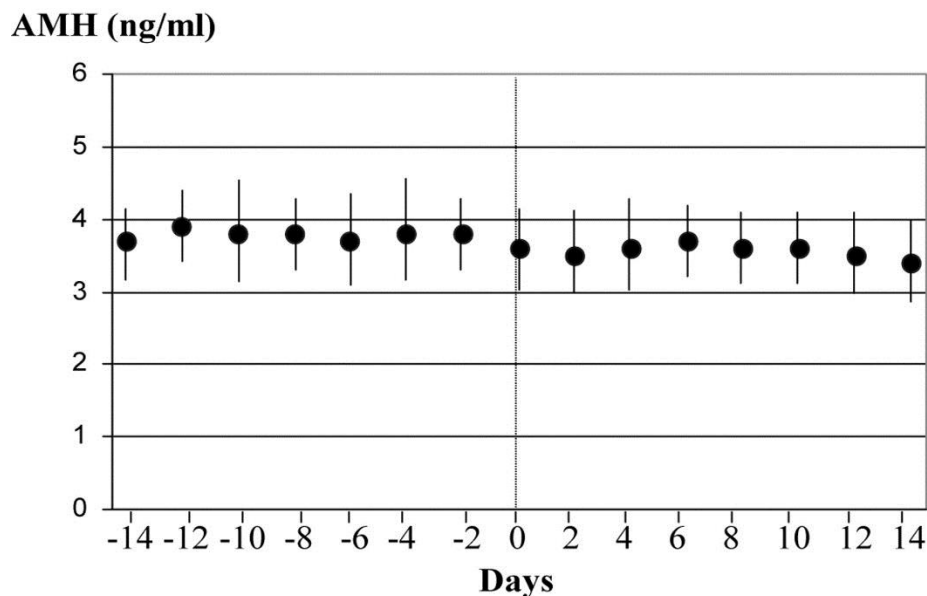


Figura 9. HAM, FSH, Inhibina B y Estradiol en el desarrollo folicular
(adaptado de Mc Gee and Hsueh, 2000)

Debido a todo esto, la HAM se ha erigido como marcador fundamental de la reserva ovárica, ya que indica de manera indirecta el stock de folículos primordiales al ser sólo expresada por los folículos primarios hasta un estadio de antral pequeño (Visser et al., 2007; Broekmans et al., 2009). El número de folículos que entra en crecimiento en cada ciclo menstrual decae con la edad y es proporcional al tamaño del pool de folículos primordiales restante, así que como sólo un folículo por mes alcanza la dominancia y el resto se atresia, el pool de folículos que crece cada mes no hace más que reflejar el número y la calidad de los folículos que quedan en el stock ovárico (Ledger, 2010).

Además, tiene la ventaja de que apenas muestra variaciones a lo largo del ciclo menstrual (acorde con el crecimiento continuo de los folículos pequeños que es independiente del estímulo de las gonadotropinas) (Cook et al., 2000; Visser et al., 2007) ni tampoco se ve afectada por la toma de anticonceptivos hormonales, análogos de GnRh ni embarazo (a diferencia de estradiol, Inhibina B o FSH), por lo que es un marcador bastante fiable y reproducible (Hehenkamp et al., 2006; La Marca et al., 2006; de Carvalho et al., 2008; La Marca et al., 2010) (Fig. 10). De todas maneras, también es cierto que han surgidos estudios en contra de esta supuesta estabilidad de la HAM: según algunos, los niveles de HAM disminuyen en el embarazo y con la toma de anticonceptivos, por lo que no sería un marcador útil en estas pacientes (Dewailly et al., 2014).



*Figura 10. Variabilidad de la HAM a lo largo del ciclo menstrual
(tomada de La Marca et al., 2006)*

Que la HAM es independiente de gonadotropinas, a pesar de las controversias, ha sido estudiado y demostrado tanto en ratones como en mujeres (Visser et al., 2007). Se ha visto que la HAM tiene un efecto paracrino más que sistémico y, por tanto, que no forma parte del feed-back hipófisis-ovario. En los protocolos de estimulación ovárica, los niveles de HAM se correlacionan bien con la disminución en el número de folículos antrales pequeños, reflejando la conversión de los pequeños en grandes en respuesta a la FSH exógena (Visser et al., 2007) (Fig. 9).

Además, es capaz de predecir la reserva ovárica con años de antelación, a diferencia de la FSH y otros marcadores, que se ven afectados cuando ya la reserva está muy disminuida (de Carvalho et al., 2008). De hecho, como vamos a comentar a lo largo del estudio que hemos desarrollado, una HAM baja en chicas jóvenes no necesariamente

indica una reserva ovárica ya comprometida, sino el riesgo de presentarla en un futuro y con antelación con respecto a otras pacientes de su misma edad y características con una HAM dentro de los límites normales.

Para la reproducción asistida, la HAM ha supuesto toda una revolución (La Marca et al., 2004; La Marca et al., 2010), ya que permite con una simple determinación analítica conocer no sólo cual es la reserva ovárica, sino también predecir la calidad de dicha reserva y cómo va a ser la respuesta de la mujer a los ciclos de estimulación. Valores bajos de HAM se relacionan con una respuesta muy pobre y un crecimiento folicular muy escaso cuando se estimula con gonadotropinas (independientemente del protocolo utilizado) (de Carvalho et al., 2008; Broer et al., 2013a).

26

Y no sólo esto, sino que 3 estudios publicados en 2013 demostraban que las pacientes con altos valores de HAM tenían una tasa mayor de embarazos y de niños vivos al nacer (aunque también es cierto que esto no es corroborado por otras publicaciones) (Arce et al., 2013; Brodin et al., 2013; Broer et al., 2013b).

El único caso que parece no beneficiarse del uso de HAM como marcador de reserva ovárica es el del hipogonadismo hipogonadotropo (Tran et al., 2011; Sönmezer et al., 2012; Chan and Kimberly, 2014). Lo que se observa en estas pacientes, que tienen una reserva escasa y por tanto niveles bajos de HAM, es un aumento de la misma con la administración de gonadotropinas y una posterior disminución cuando cesa el protocolo de estimulación. Sin embargo y,

aunque pueda parecer contrario a lo que hemos defendido hasta ahora, esto es comprensible si entendemos cual es la función y qué tipo de folículos sintetizan la HAM.

Las pacientes afectas de un hipogonadismo hipogonadotropo con un fallo ovárico primario oculto (reserva ovárica baja con ciclos menstruales “normales”) pueden ver aumentados sus niveles de HAM (que no su reserva ovárica) con una adecuada estimulación de los ovarios por gonadotropinas (Tran et al., 2011). Esto es porque existe un tamaño folicular que varía de los 6 a los 10 mm aproximadamente en que se encuentran receptores tanto para FSH como para HAM (Fig. 9). Si hay suficientes receptores para FSH, estos folículos crecerán y serán a su vez capaces de segregar también HAM hasta que pasen los 8-10 mm, momento en el que dejarán de sintetizarla. Por eso, si a estas pacientes las estimulamos con FSH, los niveles de HAM aumentarán, pero simplemente porque hemos estimulado folículos que tenían el tamaño adecuado tanto para ser estimulados por FSH como para segregar HAM.

27

Debido a esto, estas pacientes no se beneficiarán de la HAM como marcador de reserva ovárica, porque los niveles serán siempre falsamente más bajos de lo que ellas tienen en realidad, infraestimando la reserva ovárica real (Tran et al., 2011).

Además del papel que la HAM juega en el cálculo y predicción de la reserva ovárica y del rol que tiene en reproducción asistida, no debemos olvidar también que se utiliza como marcador de

fisiopatología ovárica, en el caso por ejemplo del síndrome de ovario poliquístico (SOP) (Visser et al., 2007; Hampl et al., 2011; Xi et al., 2016). De hecho, como la HAM es un indicador del número de folículos en crecimiento, en las mujeres con SOP suele estar aumentada. En estas pacientes, que presentan disovulación y por tanto un defecto en la selección y crecimiento folicular, al acumularse los folículos pequeños la HAM aumenta, disminuyendo la sensibilidad de los mismos a la FSH y empeorando el problema (Visser et al., 2007) (Fig. 11). Así, la HAM está llamada a convertirse en marcador de esta patología, no necesitando de esta manera solicitar ningún otro tipo de determinación hormonal (incluso algunos afirman que la ecografía tampoco sería necesaria).

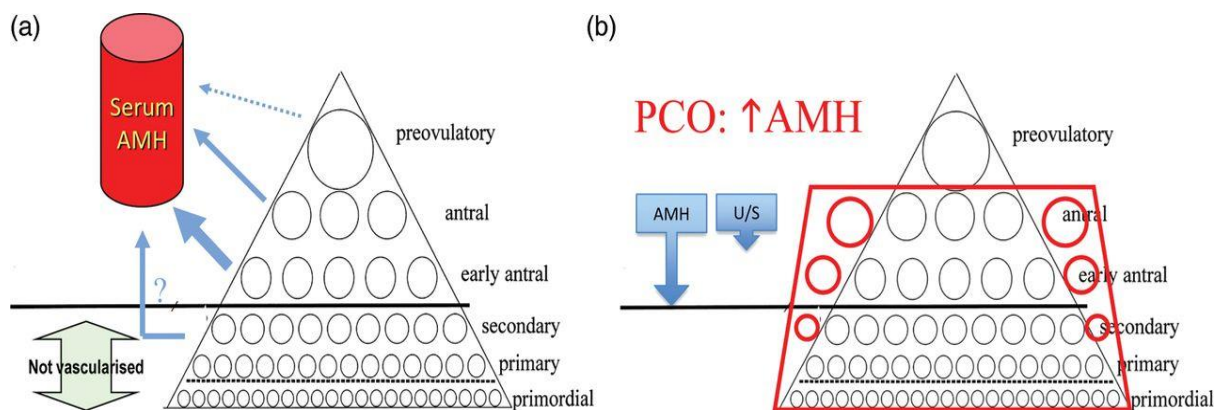


Figura 11. Secreción de HAM por los folículos. En el SOP, al haber más cantidad de folículos en crecimiento y no llegar ninguno a la dominancia, la cantidad de HAM secretada es mayor (tomado de Dewailly et al., 2014)

1.2.1.3 Marcadores ecográficos

Volumen ovárico

Consiste en calcular el volumen del ovario mediante ecografía 3D, de tal forma que un volumen ovárico pequeño se ha asociado a una menor reserva ovárica. Se relaciona inversamente con la edad, de hecho, se ha visto una disminución estadísticamente significativa del volumen en mujeres mayores de 30 años (Broekmans et al., 2010). Este marcador, sin embargo, no se utiliza actualmente para estimarla, ya que se ha visto que el recuento de folículos antrales da mejores resultados y una fiabilidad mayor (de Carvalho et al., 2008).

Recuento de folículos antrales (RFA)

Se trata, junto con la HAM, del mejor marcador de reserva ovárica que tenemos en la actualidad. No existe consenso en la comunidad científica con respecto a cuál es el mejor marcador de los dos, si la HAM o el RFA: algunos defienden que éste es mejor que la HAM, otros defienden lo contrario y otros que es mejor utilizarlos de manera combinada (de Carvalho et al., 2008; Fleming et al., 2015; Iliodromiti et al., 2015). El RFA disminuye progresivamente con el tiempo (pérdidas de 0.35-0.95 folículos/año) y por eso resulta más efectivo que el volumen ovárico (Broekmans et al., 2010).

El RFA consiste en contar el número de folículos entre el día 2 y 5 del ciclo, es decir, cuando los ovarios están en reposo. Usando ecografía 3D y un ecógrafo con buena resolución veremos más que con un ecógrafo de menor calidad (Fig. 12), por eso tenemos que ser cautelosos a la hora de informar a las pacientes sobre su reserva ovárica cuando les hagamos la ecografía con un aparato de baja resolución, pues estaremos

infraestimándola sin duda. En general, se considera indicador de baja reserva cuando entre los dos ovarios el recuento es inferior a 5 folículos (Iliodromiti et al., 2015).

La ecografía 3D y el modo sonoAVC (automatic volume calculation) tienen importantes ventajas frente al modo en 2D, ya que disminuye la variabilidad inter e intraobservador, disminuye también el tiempo de exploración y permite estudiar posteriormente las imágenes sin estar la paciente presente (Deb et al., 2009; Raine-Fenning et al., 2009; Broekmans et al., 2010; Kollmann et al., 2014) (Fig. 12).

30

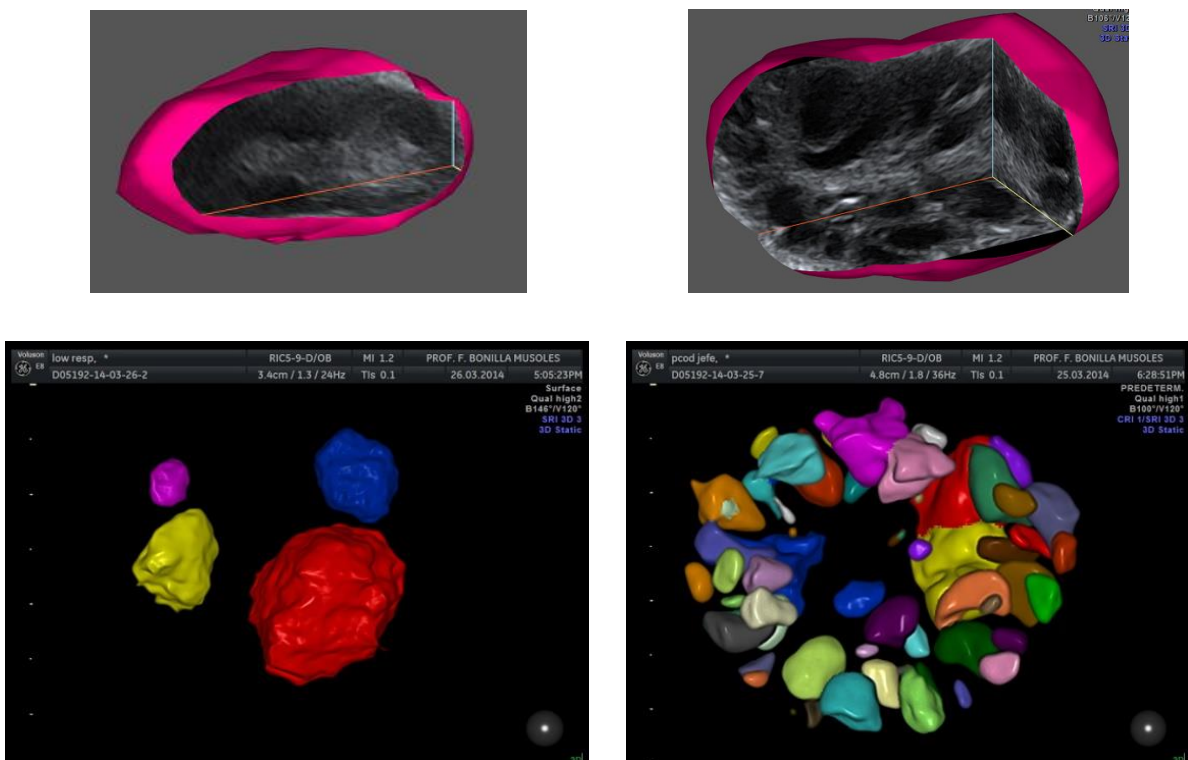


Figura 12. Comparación entre reservas baja y alta con el volumen ovárico y el RFA en 3D (fotos tomadas con el ecógrafo de la consulta del Prof. Bonilla-Musoles)

La técnica a seguir para hacer un recuento de folículos lo más correcto posible es muy sencilla: se identifican en primer lugar los dos ovarios, se barre con la sonda cada uno de ellos y se cuentan los folículos entre 2 y 10 mm de diámetro. Si el folículo es redondo se mide el diámetro interno del área econegativa, si es ovoide, se realiza una medida a lo largo y otra a lo ancho (Raine-Fenning et al., 2009; Broekmans et al., 2010).

Numerosos estudios han demostrado la correlación existente entre la HAM y el RFA: una reserva folicular alta se asocia a un recuento alto y a una HAM elevada y, a la inversa (Bentzen et al., 2013; Hagen et al., 2015).

1.2.2 Método combinado de cálculo de reserva ovárica

31

El uso combinado del cálculo de HAM junto con el RFA es lo que más se utiliza para el estudio de reserva ovárica y es lo que presentamos en este estudio, aunque nuestra idea, viendo en este trabajo que los valores de la HAM se corresponden con el número de folículos antrales, es que en un futuro sea únicamente la HAM la que se utilice como prueba de screening (por ser más barato, rápido y cómodo para la paciente que hacerlo de manera combinada).

Sin embargo, recientemente ha sido publicado en “Journal of Ovarian Research” un estudio que combina factores clínicos, bioquímicos y ecográficos para el cálculo de la reserva denominado “OvAge”

(Venturella et al., 2015), con la idea de predecir el pronóstico reproductivo y el tiempo hasta la menopausia. Aunque sea interesante, que pueda ser utilizado como técnica de screening para la población general nos parece complicado, porque implica el cálculo de FSH, estradiol, HAM, realización de ecografía 3D para el conteo de folículos antrales, volumen ovárico e índice de flujo de vascularización. Con todos estos datos, los investigadores proponen realizar un modelo que obtenga una ecuación cuyo resultado informe de manera rápida y eficaz a la paciente sobre su reserva ovárica, asumiendo que en la población de gente joven, fértil y sana la edad ovárica es idéntica a la edad cronológica (aunque en ocasiones esto no es así, como vemos en esta tesis, lo que ya constituye un sesgo para el estudio).

1.3. ¿Por qué es importante conocer la reserva ovárica?

Conocer la reserva ovárica es fundamental desde tres puntos de vista. En un principio empezó a estudiarse para prevenir las posibles consecuencias que los tratamientos oncológicos tenían sobre los ovarios (van Beek et al., 2007; Lie Fong et al., 2009; Broughman et al., 2012). Hoy en día, otras necesidades han surgido que justifican el estudio de esta reserva (Gleicher et al., 2015).

Por una parte, en reproducción asistida, su estudio pretende identificar el punto de partida de cada mujer así como identificar si el tratamiento está indicado en la paciente (Dólleman et al., 2013). De hecho, se ha visto que las pacientes con una HAM disminuida (inferior a

1.1 ng/ml) son bajas respondedoras y tienen una mala calidad ovocitaria, por lo que en muchas clínicas de reproducción asistida se les plantea la posibilidad de donación de ovocitos antes incluso de intentar un ciclo de estimulación propio (Committee on Gynecologic Practice, 2015; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015).

Por otra parte, el conocimiento de la reserva ovárica permite calcular aproximadamente el tiempo restante hasta la menopausia (Dólleman et al., 2013; La Marca et al., 2013). Esto es útil para limitar o incluso prescindir de tratamientos agresivos en mujeres con determinadas patologías que se solucionan de manera natural con la menopausia, si se conoce que dicha paciente se encuentra próxima al fin de sus menstruaciones (Broekmans et al., 2009; Tehrani et al., 2013).

Finalmente, el conocimiento de la reserva ovárica es crucial desde el punto de vista social e individual de la mujer, como algunos estudios ya están planteando (Tremellen and Savulescu, 2014; Tremellen and Savulescu, 2015) y como defendemos nosotros en este trabajo de investigación. Conocer el estado y la calidad de sus ovocitos, puede ayudar a la mujer a planificar mejor su maternidad al poder plantearse a tiempo opciones que, de otra forma, no podría plantearse por no disponer en ese momento de sus propios ovocitos. De ahí la importancia de la tesis que detallaremos a continuación.

1.4. Importancia de la tesis

Según los estudios, aproximadamente el 10% de las mujeres son menopáusicas con 45 años y una de cada 10 mujeres es estéril debido a una reserva ovárica crítica cuando alcanza los 35 años (Tremellen and Savulescu, 2014; Depmann et al., 2016). Esto antiguamente no suponía ningún problema, ya que las mujeres solían tener sus hijos antes de los 35 y, por tanto, como mucho podían encontrarse con dificultad a la hora de ampliar la familia más que con serios problemas de esterilidad (Joffe et al., 2009).

Hoy en día esto no es así. Debido a la incorporación de la mujer al mundo laboral, la aparición de la anticoncepción hormonal a mediados del siglo XX y la mayor esperanza de vida, muchas mujeres retrasan la edad a la que tienen el primer hijo a los 32 años de media (Fig. 13 y 14).

Mean age of women at childbirth

Years

The mean age of women when their children are born. [more](#)

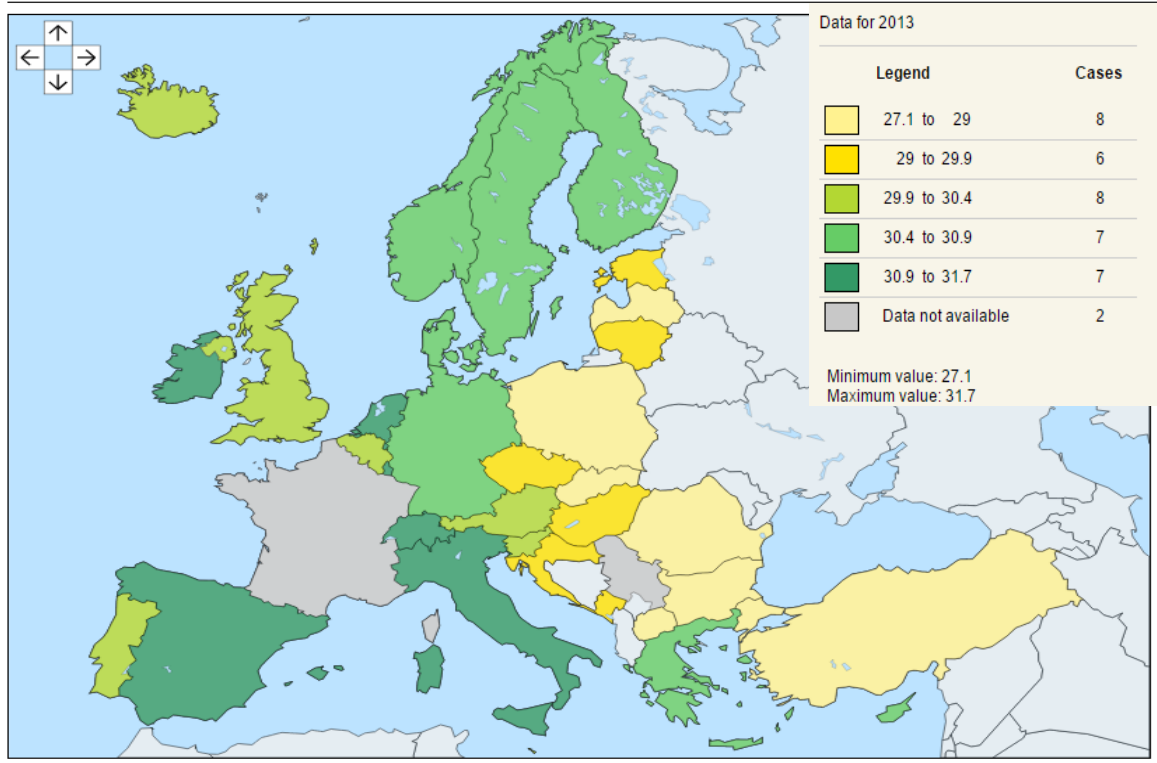


Figura 13. Informe demográfico Eurostat, 2013. Edad de la madre al nacer el primer hijo (comparación entre países europeos)

De hecho, vemos en este gráfico cómo en la mayor parte de países europeos predominan los tonos verdes, lo cual quiere decir que la mayor parte de las mujeres tienen más de 30 años al tener su primer hijo.

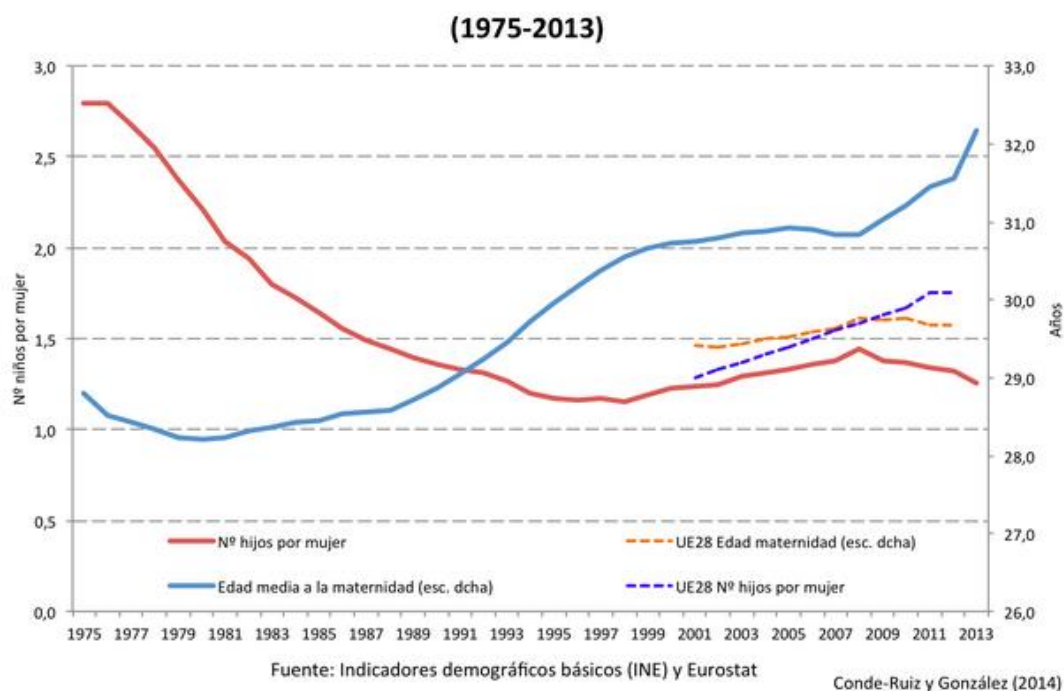


Figura 14. Informe demográfico Eurostat e INE, 2014

36

En esta figura vemos por ejemplo cómo se sitúa ya en los 32 años de media la edad a la que la mujer tiene su primer hijo.

Tanto la ESHRE como la ASRM han llevado a cabo numerosas campañas a favor de una maternidad más precoz de lo que sucede ahora, advirtiendo de los riesgos de retrasarla, pero todas estas acciones han sido en vano (Tremellen and Savulescu, 2014). El por qué estas campañas no han dado su fruto puede ser por 3 motivos: primero, porque la gente no está concienciada. Piensan que van a poder tener hijos sin dificultad y, por tanto, el consabido “no me va a tocar a mí” es bastante frecuente; en segundo lugar, porque cada vez más mujeres y hombres confían en los avances que se están produciendo en reproducción asistida, siendo

frecuente también caer en el error de pensar que siempre se podrá recurrir con una tasa de éxito del 100% a las técnicas de fecundación in vitro (y variantes) si no se consigue con éxito por la vía natural; y tercero, porque muchas mujeres piensan que con llevar una vida sana y tener ciclos menstruales más o menos regulares no van a tener ningún problema a la hora de poder tener hijos. En este contexto, los términos reserva ovárica y fallo ovárico precoz son los grandes desconocidos (Tremellen and Savulescu, 2014).

De todo esto, por tanto, surge el concepto y la necesidad del “screening de reserva ovárica”. De hecho, varios estudios en los que se pregunta a las mujeres en edad reproductiva si les gustaría conocer su reserva ovárica (Bavan et al., 2011; Aguinaldo, 2014) refieren que más del 80% de las participantes estarían interesadas en saberla a la hora de organizarse y establecer sus planes de futuro en cuanto a su maternidad (Tremellen and Savulescu, 2014).

Sin embargo, otros estudios refieren que establecer dicho screening sería imprudente por varios motivos (Loh and Maheshwari, 2011; Findlay et al., 2015); primero, porque faltan estudios que relacionen con una fiabilidad del 100% los marcadores de reserva ovárica con el potencial fértil de la mujer; segundo, porque un resultado adverso del screening podría producir una ansiedad injustificada en mujeres que no se habían planteado la maternidad hasta ese momento ni tienen posibilidades de hacerlo por sus circunstancias personales; y tercero, porque los hay también que defienden que los recursos económicos deben ponerse al servicio de otras iniciativas más provechosas que realmente valgan la

pena, no considerando la incapacidad de la mujer para tener hijos como un problema de salud pública (Tremellen and Savulescu, 2014).

En contra de estas opiniones, numerosos artículos están surgiendo en los últimos años que se plantean la necesidad real de afrontar este problema de salud. Y es ahí donde nuestro trabajo de investigación cobra un especial protagonismo. Porque lo que hemos hecho ha sido estudiar, mediante la determinación analítica de la HAM y el contaje de folículos antrales por ecografía 3D, la reserva ovárica de más de 1.000 mujeres jóvenes y sanas.

El artículo de Tremellen y Savulescu de 2014 va desmenuzando uno a uno los criterios que la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) considera necesarios para que un programa de cribado pueda ser instaurado como tal y de todos ellos, sólo el punto 7, el que habla de que “debería haber un consenso general para saber a qué pacientes habría que tratar” no es cumplido por el cribado de reserva ovárica. Y precisamente es en ese punto donde nuestro estudio cobra también especial importancia. Como hemos comentado antes, no existen en la literatura publicada hasta la fecha estudios observacionales prospectivos en chicas jóvenes y sanas sin deseos genésicos por el momento (es decir, estudios como el nuestro) que puedan ser utilizados como guía para establecer los puntos de corte de la HAM y el recuento de folículos antrales a partir de los cuales considerar que una reserva ovárica está realmente comprometida. Sí que es verdad que en los últimos años se han publicado estudios sobre la materia (Gleicher et al., 2015; Venturella et al., 2015; Younis et al., 2015) y que grupos como la Sociedad Americana

de Medicina Reproductiva han llevado a cabo trabajos y conferencias sobre el tema (un ejemplo es la conferencia con título “Ovarian reserve: Regulations and Implications for Women's Health” en San Diego, EEUU en 2012) pero ninguno de los estudios que nos hemos encontrado han seguido nuestro diseño.

Por tanto, lo que pretendemos poner de manifiesto con nuestro estudio, es que una proporción (aproximadamente el 5%) de mujeres jóvenes y sanas, asintomáticas, presentan una reserva ovárica disminuida a una edad temprana; lo que se asociará a su vez en un futuro a una potencial dificultad para concebir. Por ello, conocer este dato les puede ayudar a adoptar medidas que les permitan soslayar este problema: anticipar la edad de la maternidad o preservar la fertilidad mediante la criopreservación de ovocitos.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es realizar un estudio prospectivo de la reserva ovárica en chicas jóvenes y sanas, entre 20 y 30 años, sin patología ginecológica aparente mediante la determinación analítica de la HAM y el recuento de folículos antrales mediante ecografía 3D vaginal entre los días 2 y 5 del ciclo menstrual.

Además de este objetivo principal, tenemos una serie de **objetivos secundarios**:

- Analizar, mediante un estudio prospectivo observacional, la reserva ovárica mediante la determinación analítica de la HAM en sangre de cordón de niñas recién nacidas.
- Valorar la eficacia del análisis de la HAM para detectar una baja reserva en una población de mujeres jóvenes y sanas.
- Valorar la capacidad diagnóstica del recuento de folículos antrales mediante ecografía 3D en la detección de una reserva ovárica disminuida.
- Plantear a las mujeres con una reserva ovárica baja la posibilidad de adelantar la maternidad o preservar su fertilidad mediante la criopreservación de sus ovocitos. Dar por tanto a la mujer la opción de que elija qué hacer ante una reserva disminuida y

afrontar una situación que de no haber participado en el estudio podría constituir un problema en un futuro.

- Defender el cribado de reserva ovárica como una técnica de cribado o screening universal, poniéndolo al servicio de todas las mujeres jóvenes que así lo deseen.

En cuanto a nuestra **hipótesis de trabajo**, ésta se basa en que la reserva ovárica viene determinada por el número de folículos presentes en la gónada femenina al nacimiento, como ya hemos comentado anteriormente.

En la actualidad, existe una amplia evidencia científica de que esta reserva presenta una gran variabilidad entre individuos de la misma edad (Findlay et al., 2015b). Por ello, existen grandes diferencias entre mujeres, no sólo en cuanto al inicio del declive de la fertilidad secundario al agotamiento de esta reserva ovárica, sino también en cuanto al establecimiento de la menopausia como consecuencia del agotamiento de esta reserva (Crawford and Steiner., 2015).

El avance en los últimos años de técnicas para la valoración de la reserva folicular, ha permitido estimar de forma bastante precisa la reserva ovárica en las pacientes mediante la determinación analítica de la HAM en sangre periférica y el recuento de folículos antrales entre los días 2 y 5 del ciclo.

Nuestra **hipótesis de trabajo** es, por tanto, que a través del estudio de la reserva ovárica en mujeres jóvenes, seremos capaces de identificar aquellas que presentan una reserva folicular disminuida a una edad temprana, permitiéndoles planificar su futuro reproductivo (Donnez and Dolmans., 2013).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos obtenidos en este trabajo provienen de un estudio prospectivo realizado en el Hospital Clínico Universitario de Valencia entre mayo de 2011 y diciembre de 2015.

3.1. Población y criterios de inclusión

3.1.1 Grupo de mujeres adultas

Un total de 1052 mujeres jóvenes y sanas decidieron participar en este estudio. Las mujeres participantes fueron reclutadas inicialmente entre estudiantes de la Universidad de Valencia y posteriormente se incorporaron familiares y conocidas de éstas.

45

Así mismo, se incluyó un grupo de 25 mujeres con alto riesgo de fallo ovárico primario por presentar una patología médica o genética (grupo control positivo) y otro grupo de 25 mujeres sometidas a salpingo-ooforectomía bilateral, intervención que se les realizó por ser portadoras de la mutación BRCA (grupo control negativo).

3.1.1.1 Grupo control positivo

Formado por un total de 25 mujeres jóvenes, entre 20 y 30 años que presentaban un alto riesgo de fallo ovárico precoz al asociar una patología médica que sabemos se acompaña de esta evolución en la reserva folicular del ovario (Knauff et al., 2009; Spencer et al., 2013; Elizur

et al., 2014; Greene et al., 2014; Oktay and Bedoschi, 2014; Shrebnik et al., 2014).

Hemos querido incluir este grupo para evidenciar que patologías médicas o genéticas que se acompañan de fallo ovárico primario presentan unos niveles de HAM y un recuento de folículos antrales muy bajos en edades tempranas de la vida (20-30 años). Por tanto, si en nuestro grupo de estudio nos encontramos mujeres con valores de HAM y de RFA similares a este grupo control, es lógico pensar que estas pacientes tendrán a la larga problemas de esterilidad como los que muestran estas pacientes con patología asociada a un fallo ovárico precoz.

46

Así, se incluyeron 10 mujeres portadoras del síndrome del cromosoma X frágil, 5 pacientes con galactosemia, 4 pacientes con miastenia gravis, 3 pacientes con síndrome de Turner en mosaico y 3 pacientes con distrofia miotónica.

3.1.1.2 *Grupo control negativo*

Formado por un total de 25 mujeres premenopáusicas (29-42 años), portadoras de la mutación BRCA-1 o BRCA-2 y, por tanto, con un alto riesgo de padecer cáncer de mama y de ovario, que solicitaron una anexectomía bilateral profiláctica (Kauff et al., 2002; Rebbeck et al., 2009; Marchetti et al., 2014).

La razón de incluir este grupo es sencilla. Se midió los niveles de HAM antes y tras la anexectomía bilateral para demostrar que la HAM se produce únicamente en los ovarios y que no existe una fuente externa de producción que pueda alterar los resultados analíticos. Así mismo, el RFA sólo es factible si existen gónadas femeninas.

3.1.1.3 Grupo estudio

1052 mujeres fueron incluidas en este grupo. Las participantes fueron reclutadas de manera aleatoria y en su mayoría de la Universidad de Valencia (55 %) siendo el 45% restante familiares y conocidas de dichas estudiantes. Recurrimos fundamentalmente a esta población por varias razones: la facilidad con la que probablemente cumplirían los criterios de inclusión (edad y salud), la motivación especial en participar por tratarse de estudiantes universitarias, muchas de ellas de la Facultad de Medicina y, la facilidad para reunir a un grupo numeroso de pacientes mujeres, jóvenes y sanas.

47

Los criterios de inclusión fueron: mujeres jóvenes y sanas, entre 20 y 30 años, sin patología médica y/o genética, ni antecedentes de cirugía ovárica, endometriosis o enfermedad pélvica inflamatoria. Sin deseos genésicos por el momento ni antecedentes de técnicas de reproducción asistida.

A todas ellas se les solicitaron además los siguientes datos: peso, talla, índice de masa corporal (IMC), hábitos tóxicos, patología médica y/o genética que requiriese medicación continuada, uso de

anticonceptivos hormonales y edad de menopausia de la madre (en caso de que ya la hubiese tenido).

A todas ellas se les realizó entre el segundo y quinto día del ciclo menstrual un recuento de folículos antrales mediante ecografía 3D (Voluson E8, GE) así como una determinación analítica de FSH, LH, progesterona, estradiol, TSH, prolactina, testosterona, androstendiona y HAM.

A las usuarias de anticonceptivos hormonales que presentaron un resultado analítico de HAM alterado y/o un RFA bajo se les solicitó que durante al menos 2 meses dejaran de utilizar este tipo de anticonceptivos para posteriormente volver a realizar la analítica y la ecografía. La HAM, según la mayor parte de estudios, al ser secretada por los folículos preantrales y antrales pequeños independientes de gonadotropinas, no se ve modificada sustancialmente a lo largo del ciclo menstrual, así como tampoco se altera durante el embarazo ni por el uso de anticonceptivos hormonales, como ya hemos comentado (Cook et al., 2000; La Marca et al., 2004; Hehenkamp et al., 2006; Ledger 2010). Sin embargo, dado que otros estudios defienden que sí existen diferencias a la hora de medir la HAM antes y después del tratamiento hormonal (Wunder et al., 2008; Sowers et al., 2010; Kallio et al., 2013), se solicitó a las pacientes con una HAM y/o RFA bajos, usuarias de este tipo de anticonceptivos, que los dejaran durante un par de meses antes de la nueva determinación.

3.1.2 Grupo de recién nacidos

174 niños y niñas fueron escogidos de manera aleatoria para formar parte de este trabajo de investigación, en concreto 87 niños y 87 niñas. Los criterios de inclusión fueron: niños y niñas nacidos a término (semanas de gestación 37-42), de más de 2500 g y sin patología materna o fetal a lo largo de la gestación.

Se eligió también niños y no sólo niñas para “utilizarlos” como grupo control. Se sabe por diferentes trabajos de investigación (Aksklaede et al., 2010; Grinspon and Rey, 2010) que los niños recién nacidos tienen unos niveles de HAM altos, lo que concuerda con el papel inhibitor que tiene la HAM en los conductos de Müller durante el desarrollo embrionario de fetos masculinos; mientras que las niñas, precisamente por esta misma función, tienen lógicamente valores más bajos, llegando a ser en la mayoría de casos, indetectables. Así pues, la finalidad de incluir varones en el estudio es doble: por una parte, para comprobar que esta discrepancia en los valores de HAM en ambos sexos se cumple, por otra, para asegurarnos de que la medición de la HAM es correcta.

De estos 174 individuos, 17 fueron excluidos: 7 por pesar menos de lo establecido, 6 por ser prematuros y 4 por no disponer de los datos de HAM a pesar de haber sido solicitada al laboratorio; quedando por tanto un total de 157 (75 niñas y 82 niños).

El motivo de por qué no incluimos niños prematuros ni con bajo peso, fue porque se ha visto en distintos trabajos (Kerkhof et al.,

2010; Sir-Petermann et al., 2010) que tanto el bajo peso como la prematuridad se relacionan con un mayor riesgo de presentar en el futuro un síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) y, por tanto, posibles valores alterados de HAM ya desde el nacimiento (las pacientes con SOP presentan con más frecuencia valores altos de HAM).

Se midió la HAM en sangre de cordón (arteria umbilical, por ser ésta la sangre que viene del feto) con el consentimiento de los padres (firmaron un consentimiento informado) en el momento del parto o la cesárea y se recogieron además los siguientes datos: edad y razas maternas, pH al nacer, Apgar, peso y vía de parto.

3.2. Estudio hormonal

50

A los recién nacidos se les realizó exclusivamente el estudio de la HAM de sangre arterial del cordón umbilical en el momento del parto o la cesárea.

Al resto de pacientes, se les midió FSH, LH, progesterona, estradiol, prolactina, testosterona, androstendiona, TSH y HAM en los días segundo a quinto del ciclo menstrual. A las pacientes que presentaban ciclos más largos o irregulares, se les indujo la menstruación con progesterona y se les hizo de la misma manera la determinación analítica.

Tradicionalmente, el estudio hormonal de una paciente infértil incluye todas las hormonas que hemos comentado anteriormente y, por eso, hemos querido añadirlas en nuestro trabajo de investigación, pero lo

que se pretende en poco tiempo es que simplemente el RFA y la HAM sea lo único que necesitemos para estudiar a la mujer.

FSH, LH, progesterona y estradiol tienen una evolución característica por todos conocida a lo largo del ciclo menstrual (Fig. 15). En la primera fase del ciclo, la FSH aumenta para inducir el crecimiento y reclutamiento ovocitario hasta la dominancia de uno de ellos; en la segunda fase, la FSH deja de tener un papel protagonista y da paso a la LH, que induce la ovulación del folículo dominante entre los días 14 y 17. En la primera parte del ciclo, por tanto, los niveles de estradiol ascienden acompañando al crecimiento folicular, mientras que a partir de la segunda fase, la protagonista es la progesterona secretada por el cuerpo lúteo.

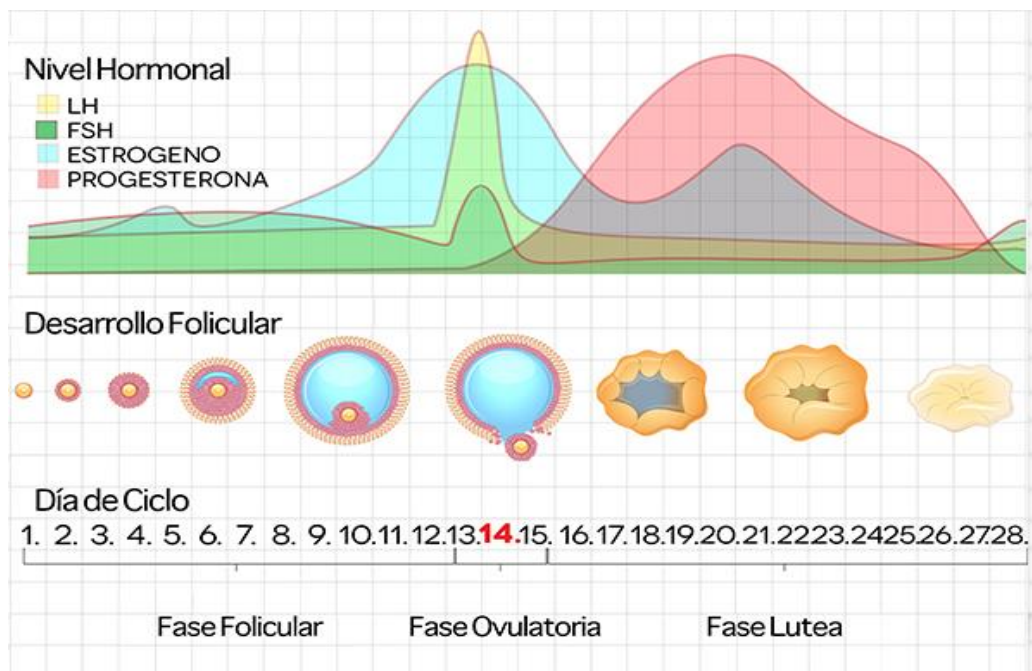


Figura 15. Evolución hormonal a lo largo del ciclo menstrual

Por eso, niveles altos de FSH y LH en una fase folicular precoz, se han relacionado con un fallo ovárico prematuro. En cuanto a los niveles de estradiol, mientras este fallo ovárico se instaura, son altos en una fase folicular precoz, porque se produce un reclutamiento precoz folicular que eleva los niveles de estrógenos. Sin embargo, cuando el fallo ovárico ya está instaurado, los niveles disminuyen por la ausencia del desarrollo folicular (Goswami and Conway, 2005; Nelson et al., 2005) (Fig. 15).

Por otra parte, también hemos medido prolactina y TSH porque se ha visto que influyen en el ciclo hormonal. Niveles altos de prolactina producen una amenorrea por inhibición de la secreción de la GnRH por el hipotálamo, disminuyendo los niveles de FSH, LH y estradiol, con todas las manifestaciones clínicas que esto conlleva. Por su parte, niveles altos de TRH y TSH producidos por un hipotiroidismo producen elevación también de la prolactina, con las mismas consecuencias que hemos descrito anteriormente.

Determinación analítica de HAM

Las muestras fueron centrifugadas tras 2 horas de su recolección y almacenadas a -20°C hasta su procesado para evitar así fenómenos proteolíticos que pudieran afectar su resultado. La HAM se determinó con el sistema HAM Gen II ELISA kit (Beckman Coulter). El coeficiente de variación que presenta este sistema analítico es 4.7%, y el rango de detección es 0.16-22.5 ng/mL (Steiner et al., 2011). Los resultados fueron dados por tanto en ng/ml. Los resultados de pmol/l

vistos en los artículos científicos consultados fueron convertidos a ng/ml según la siguiente equivalencia: 1 pmol/l=7.143 ng/ml (Kelsey et al., 2011).

El test ELISA para HAM es un inmunoensayo enzimáticamente amplificado en 2 sitios. En el ensayo, los calibradores, controles y muestras se incuban en pequeños pozos que se han recubierto previamente de anticuerpo de HAM. Después de la incubación y lavado, el anticuerpo anti-HAM detector unido a la biotina se añade a cada pozo y después de una segunda incubación y lavado, se añade también la HRP (*streptavidin-horseradish peroxidase*). En un tercer paso de incubación y lavado, se suma la TMB (*tetramethylbenzidine*). Finalmente, se añade una solución ácida (Fig. 16).

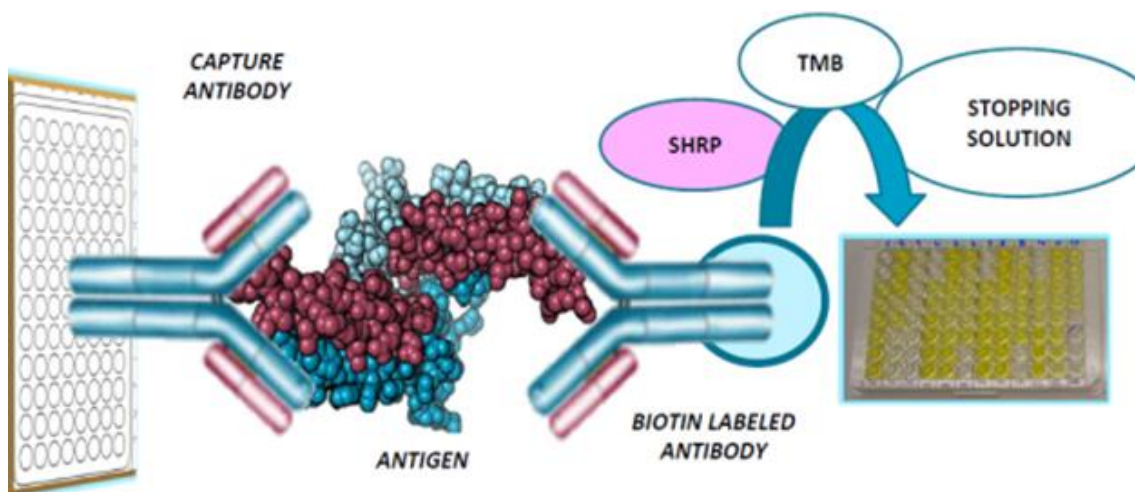


Figura 16. Test ELISA de la HAM (tomado de Internet, "Next Generation Genomics")

El grado de recambio enzimático del sustrato se determina mediante la absorción de la longitud de onda dual a los 450 nm y entre

600 y 630 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de HAM de las muestras. Un set de calibradores de HAM se usa para trazar una curva de calibración de absorbancia vs concentración de HAM.

De este test cabe señalar 2 puntos importantes:

1. Los anticuerpos que se usan en el ensayo se unen a la porción madura de la HAM, que es mucho más estable frente a la proteólisis que la región pro-hormonal.

2. El límite mínimo de HAM que puede detectarse en una muestra es 0,08 ng/ml con una probabilidad del 95%.

Se han considerado los siguientes valores de HAM de referencia para el grupo estudio de mujeres, según lo leído en varios artículos publicados recientemente: valores de HAM bajos cuando son iguales o inferiores a 1.1 ng/ml, dentro de lo normal entre 1.2 ng/ml y 4.9 ng/ml, altos por encima de 5 ng/ml (Younis et al., 2015).

3.3. Estudio ecográfico

Ver apartado de recuento de folículos antrales (punto 1.2.1.3)

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa *Statistical Program for the Social Sciences* (SPSS, version 22.0). Se consideró que existía una significancia estadística cuando la $P < 0.05$.

Las variables categóricas se presentan como porcentajes y se compararon mediante los test **chi-cuadrado** (también llamada prueba χ^2 de Pearson se considera una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica -bondad de ajuste-, indicando en qué medida las diferencias existentes entre ambas, de haberlas, se deben al azar en el contraste de hipótesis. Así, cuanto mayor es el valor de χ^2 , menos verosímil es que la prueba sea correcta. De la misma forma, cuanto más se aproxima a 0, más ajustadas están ambas distribuciones. También se utiliza para probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia) y el **test de Fisher** (el test exacto de Fisher permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test χ^2 sea adecuada).

Las variables continuas se compararon mediante una prueba **t de student pareada** (las pruebas t de muestras dependientes o apareadas, consisten típicamente en una muestra de pares de valores con similares unidades estadísticas, o un grupo de unidades que han sido evaluadas en dos ocasiones diferentes), **prueba t de Student despareada** (las pruebas t despareadas o de muestras independientes, se utilizan cuando se

obtienen dos grupos de muestras aleatorias, independientes e idénticamente distribuidas a partir de las dos poblaciones a ser comparadas), el **análisis de la varianza (ANOVA)** (el análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado) y la **prueba post hoc de Tukey** para la comparación por pares (la prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey utiliza el estadístico del rango estudentizado para realizar todas las comparaciones por pares entre los grupos y establece tanto la tasa de error por experimento como la tasa de error para el conjunto de todas las comparaciones por pares) si los datos se distribuyen normalmente según la evaluación de la **prueba de Kolmogorov-Smirnov** (la prueba de Kolmogórov-Smirnov -también prueba K-S- es una prueba no paramétrica que se utiliza para determinar la bondad de ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí).

Finalmente, se utilizó la **prueba de Mann-Whitney** (prueba U de Mann-Whitney, también llamada de Mann-Whitney-Wilcoxon, prueba de suma de rangos Wilcoxon, o prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney), que es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es, de hecho, la versión no paramétrica de la habitual prueba t de Student para comparar las variables continuas si los datos no se distribuyen normalmente según la evaluación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

3.5. Consideraciones éticas

El presente estudio fue aprobado por el comité ético en investigación clínica (CEIC) del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, que controla la investigación biomédica en el Hospital Clínico Universitario de Valencia y su departamento de salud.

Todas las pacientes que participaron en este proyecto fueron informadas tanto verbalmente como por escrito de las características del estudio y firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión. Por otra parte, los padres de los niños recién nacidos también fueron informados por escrito en el momento del parto de lo que íbamos a hacer y nos firmaron el consentimiento (todos ellos accedieron).

4. RESULTADOS

Un total de 1102 mujeres adultas participaron en el presente proyecto, distribuidas en tres grupos:

- 1052 mujeres jóvenes (20-30 años) y sanas decidieron participar en este estudio formando el **grupo de estudio**.
- 25 mujeres jóvenes (20-30 años) que presentaban un alto riesgo de fallo ovárico precoz al asociar una patología médica formaron el **grupo control positivo**.
- 25 mujeres premenopáusicas (29-42 años), portadoras de la mutación BRCA-1 o BRCA-2 y por tanto con un alto riesgo de padecer cáncer de mama y de ovario que solicitaron una anexectomía bilateral profiláctica constituyeron el **grupo control negativo**.

Así mismo, un total de 174 recién nacidos fueron incluidos para formar parte de este trabajo de investigación, en concreto 87 niños y 87 niñas (de los cuales posteriormente fueron excluidos 17 por no cumplir con todos los parámetros, quedando 75 niñas y 82 niños).

4.1. Grupo de recién nacidos

La media de HAM en el grupo de los niños es de 16.9 ng/ml, mientras que en el grupo de las niñas de tan solo 3.0 ng/ml, lo que guarda relación con el importante papel que juega la HAM en el desarrollo masculino del

embrión, mientras que en embriones femeninos es prácticamente inexistente.

A continuación, mostramos un gráfico con los valores de HAM obtenidos en niños y niñas (Fig. 17). Vemos claramente el predominio de la HAM en el grupo masculino frente al femenino, con el 80% de los valores por encima o igual a 10 ng/ml, mientras que, en las niñas, apenas se encuentra el 11% por encima de este valor.

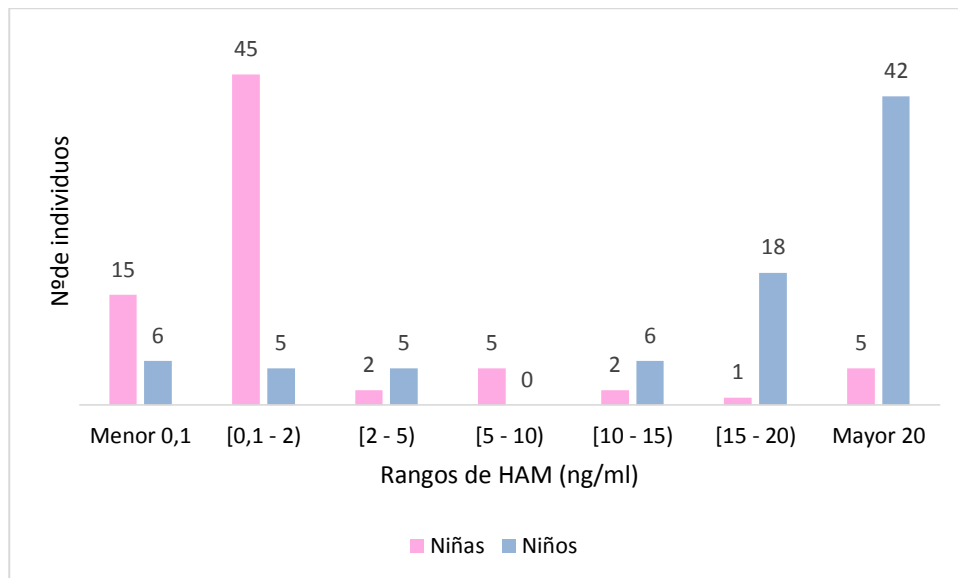


Figura 17. Distribución de los niños y niñas en función de sus valores de HAM agrupados en rangos

En la siguiente gráfica (Fig. 18), por otra parte, se observa cómo el 80% de las niñas aglutina los valores de HAM por debajo de 2 ng/ml, lo que hace imposible el uso de la HAM como marcador de reserva ovárica desde el nacimiento (sobre todo también por la imposibilidad de comparar los valores con un RFA correcto).

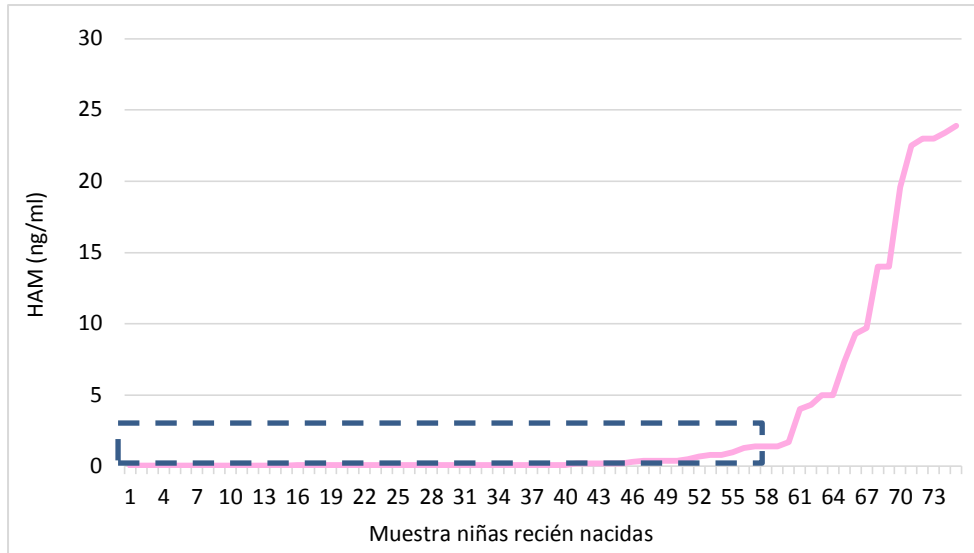


Figura 18. De las 75 niñas analizadas, el 80% de ellas tuvieron una HAM por debajo de 2 ng/ml

4.2. Grupo de mujeres adultas

Las características clínicas (tabla I), endocrinológicas (tabla II) y ecográficas (tabla III) de las mujeres adultas participantes en este estudio están reflejadas en las diferentes tablas.

Todas las pacientes incluidas en el proyecto son de raza caucásica dado que es la más prevalente en nuestra sociedad. Ninguna de las pacientes participantes declaró consumir alcohol o drogas de forma habitual.

	Grupo estudio	Grupo Control Positivo	Grupo Control Negativo	Valor de P
Número de mujeres	1052	25	25	
Edad (DE)	24 (4.2)	25 (3.8)	38 (2.9)	<0.001
Edad Menarquia (DE)	11.6 (1.3)	11.2 (0.9)	11.7 (1.1)	0.53
Edad Menopausia materna (DE)	51.2 (0.9)	43.1 (3.8)	50.9 (1.7)	<0.001
IMC (DE)	22.5 (2.5)	22.8 (2.1)	24.1 (2.4)	0.36
Fumadora, n (%).	54 (5.1)	1 (4.0)	2 (8.0)	0.18

Tabla I. Características clínicas de la población estudiada de acuerdo a los diferentes grupos incluidos

62

	Grupo estudio	Grupo Control Positivo	Grupo Control Negativo	Valor P
HAM, ng/mL (DE)	6.03 (2.4)	0.61 (0.32)	1.46 (1.6)	<0.001
FSH, mUI/mL (DE)	4.92 (1.7)	6.99 (1.2)	5.38 (2.1)	0.22
LH, mUI/mL (DE)	4.02 (1.5)	5.57 (1.9)	4.92 (1.4)	0.13
Estradiol, pg/mL (DE)	9.81 (2.3)	8.31 (2.1)	12.4 (2.3)	0.39
Progesterona, ng/mL (DE)	0.42 (0.2)	0.31 (1.6)	0.38 (1.5)	0.38
Prolactina, ng/mL (DE)	8.2 (2.7)	11.7 (0.8)	12.1 (1.7)	0.45
TSH, μ U/mL (DE)	1.61 (1.2)	1.88 (0.8)	2.72 (2.4)	0.37
Testosterona, ng/mL (DE)	0.26 (0.8)	0.32 (0.7)	0.29 (0.4)	0.56

Tabla II. Características endocrinológicas de los diferentes grupos

	Grupo estudio	Grupo Control Positivo	Grupo Control Negativo	Valor P
RFA, n (DS).	25.9 (3.4)	2.3 (0.4)	8.7 (1.8)	<0.001
Volumen ovárico, mL (DS)	5.6 (2.6)	2.7 (0.6)	3.6 (1.3)	<0.001

Tabla III. Características ecográficas de los diferentes grupos

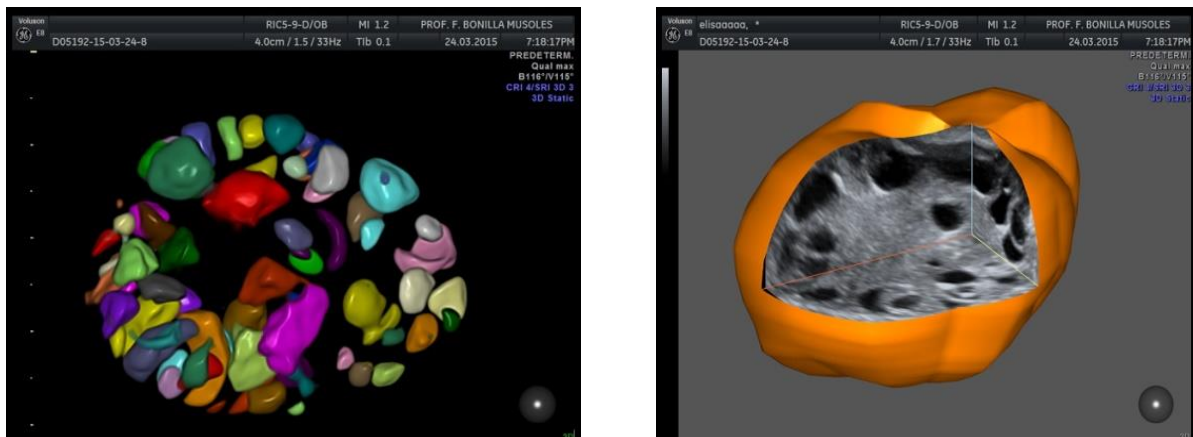


Figura 19. Tanto el RFA como el cálculo del volumen ovárico, se determinó como la media de los dos ovarios en cada paciente (fotos tomadas mediante el ecógrafo de la consulta del Prof. Bonilla-Musoles)

La relación entre los niveles de HAM y edad de las pacientes en el grupo de estudio queda reflejada en la figura 20, mediante un modelo de regresión lineal. Como puede observarse, se aprecia una disminución progresiva de los niveles de HAM con la edad, mostrando una disminución de media de 4.8% por año [intervalo de confianza del 95%, 3.4-6.9%, P<0.001]. Es destacable que la disminución de los niveles de HAM tiende a acelerarse con el incremento de la edad de las pacientes.

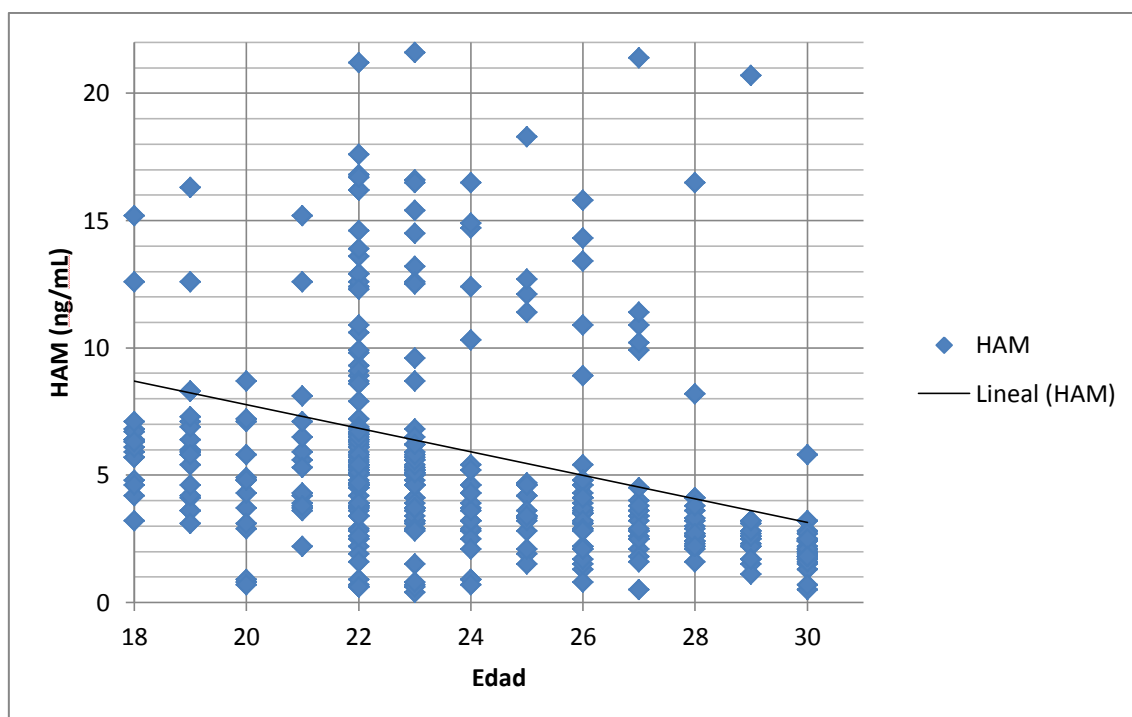


Figura 20. Relación cronológica entre la edad de la paciente y los niveles de HAM

64

Al estudiar la reserva ovárica de las mujeres en el grupo de estudio mediante el RFA determinado por ecografía tridimensional y el empleo del sistema AVC, observamos un gran paralelismo con los niveles de HAM. Es decir, se objetiva una disminución progresiva del RFA con el avance de la edad de las pacientes (Fig. 21).

La disminución progresiva del RFA con la edad, muestra una disminución de media de 3.6% por año [intervalo de confianza del 95%, 1.9-5.4%, $P < 0.001$]. Es destacable que la disminución del RFA tiende a acelerarse con el incremento de la edad de las pacientes al igual que los

valores de la HAM, aunque esta disminución es menos marcada que con los valores de HAM.

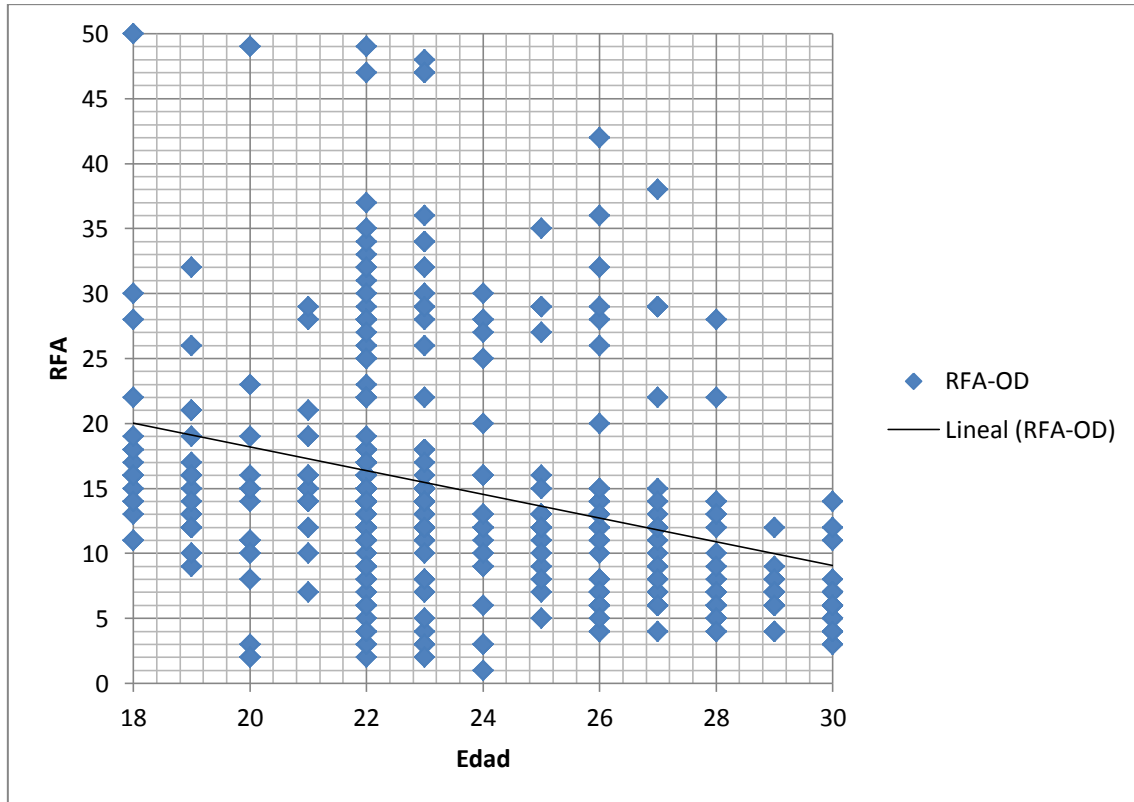


Figura 21. Relación cronológica entre la edad de la paciente y el RFA

Al estudiar la reserva ovárica de las mujeres en el grupo de estudio mediante el volumen ovárico determinado por ecografía tridimensional y el empleo del sistema VOCAL, observamos un gran paralelismo con los niveles de HAM y el RFA. Es decir, se objetiva una disminución progresiva del volumen ovárico con el avance de la edad de las pacientes (Fig. 22).

La disminución progresiva del volumen ovárico con la edad de las mujeres, muestra una disminución de media de 1.2% por año [intervalo de confianza del 95%, 0.3-1.9%, $P < 0.001$]. Es destacable que la disminución del volumen ovárico tiende a acelerarse con el incremento de la edad de las pacientes al igual que los valores del RFA y HAM, aunque esta disminución es mucho menos marcada que con los valores anteriores.

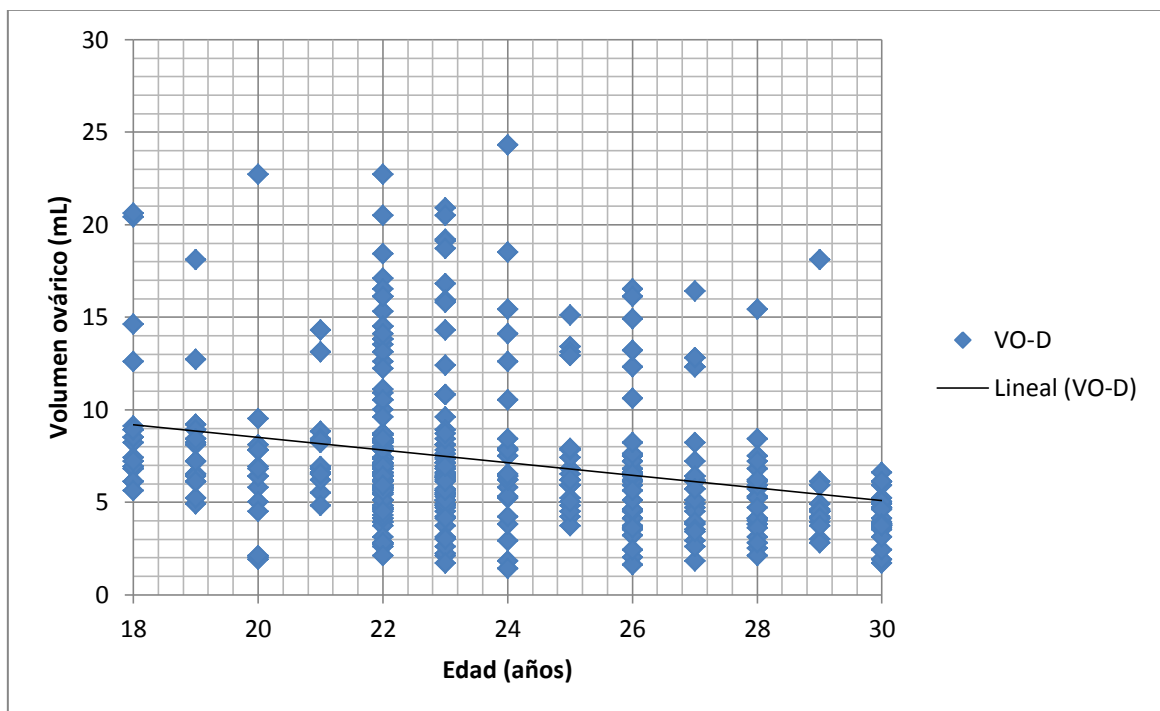


Figura 22. Relación cronológica entre la edad de la paciente y el volumen ovárico (mL)

Al realizar una comparativa mediante un modelo múltiple de regresión lineal entre los niveles de HAM y el RFA en el grupo de estudio, encontramos un incremento de los niveles de HAM con el incremento del RFA (Fig. 24).

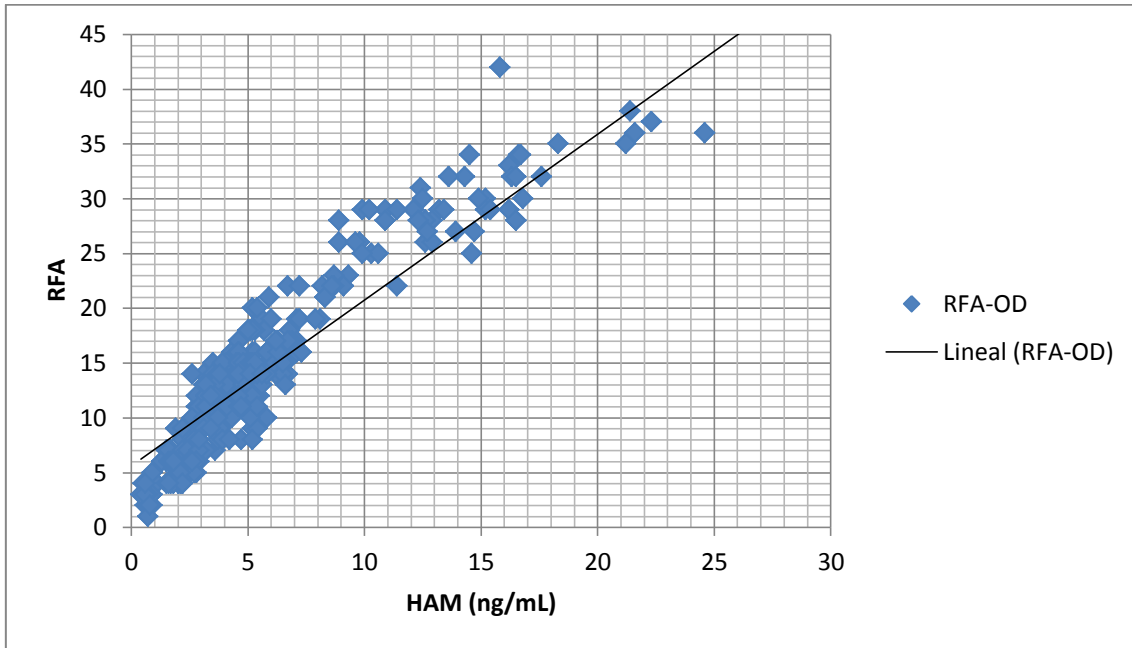


Figura 24. Relación entre el RFA y los niveles de HAM mediante un modelo de regresión lineal

Los niveles de FSH y de LH en el grupo de estudio no mostraron una variación significativa con la edad de las pacientes, siendo menos influenciados por el incremento de edad ovárica. Se trata por tanto de marcadores de reserva ovárica poco útiles en estas edades (Fig. 25).

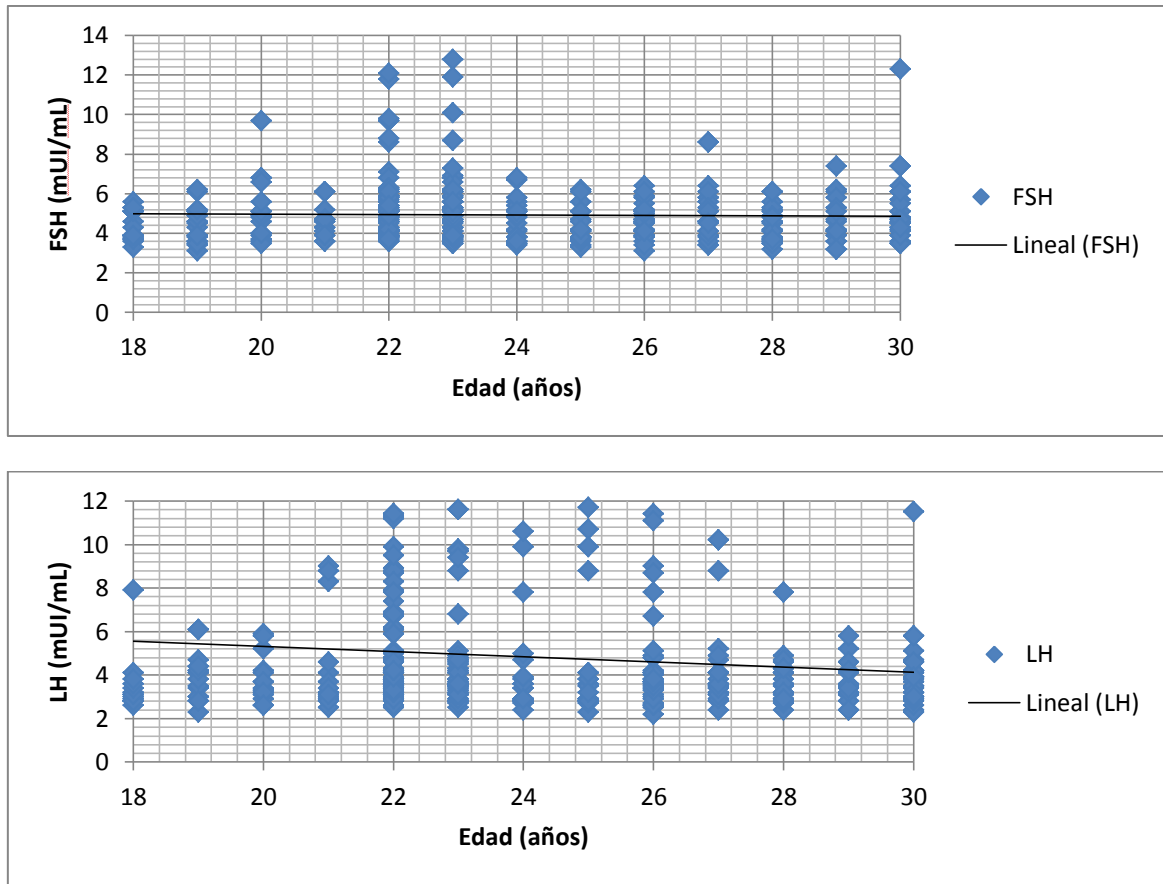


Figura 25. Relación cronológica entre la edad de la paciente y los niveles de FSH y LH

Al estudiar el porcentaje de mujeres dentro del grupo control con niveles de HAM bajos (< o iguales a 1.1 ng/mL) (Younis et al., 2015), medios/normales (1.2-4.9 ng/mL) y altos (>4.9 ng/mL; entendiéndose como tales los asociados a ovario poliquístico), (Iliodromiti et al., 2013; Lauritsen et al., 2014) encontramos que el 4.73% de las mujeres presentaban niveles bajos de HAM. El 17.4% de las mujeres presentaban niveles altos de HAM y por tanto el 77.82% de las mujeres presentaban niveles normales de HAM. Estos valores quedan ilustrados en la figura 26.

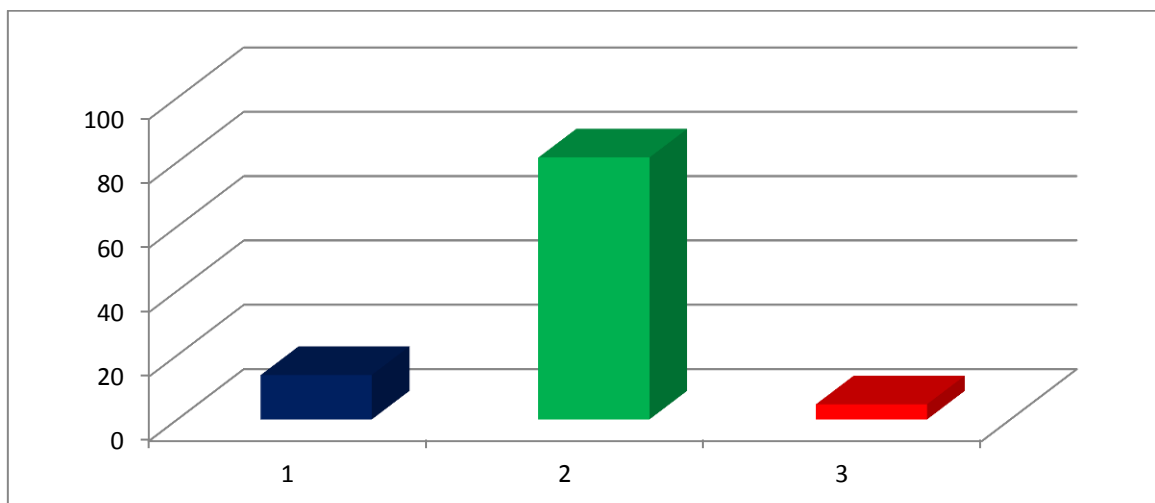


Figura 26. Proporción de pacientes en el grupo de estudio con niveles de **HAM bajos** (< o iguales a 1.1 ng/mL), **normales** (1.2-4.9 ng/mL) y **altos** (>4.9 ng/mL)

Al estudiar el porcentaje de mujeres dentro del grupo control con RFA bajos (<5) (Younis et al., 2015), medios/normales (5-19) o altos (>19; entendiéndose como tales los asociados a ovario poliquístico) (Lauritsen et al., 2014) encontramos que el 5.12% de las mujeres presentaban niveles bajos de RFA. El 13.8% de las mujeres presentaban niveles altos de HAM y por tanto el 81.08% de las mujeres presentaban niveles normales de HAM. Estos valores quedan ilustrados en la figura 27.

Por su parte, la figura 28 muestra cómo tanto el RFA como la determinación de HAM sirven de manera muy similar para estimar sin apenas diferencias entre ellos la reserva ovárica.

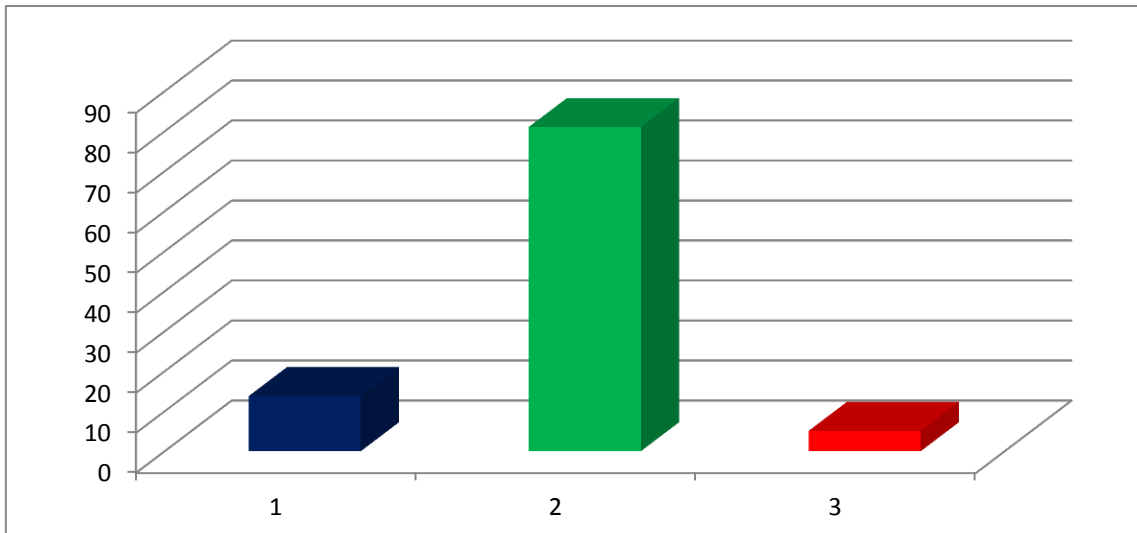


Figura 27. Proporción de pacientes en el grupo de estudio con niveles de RFA **bajos** (<5), **normales** (5-19) y **altos** (>19)

70

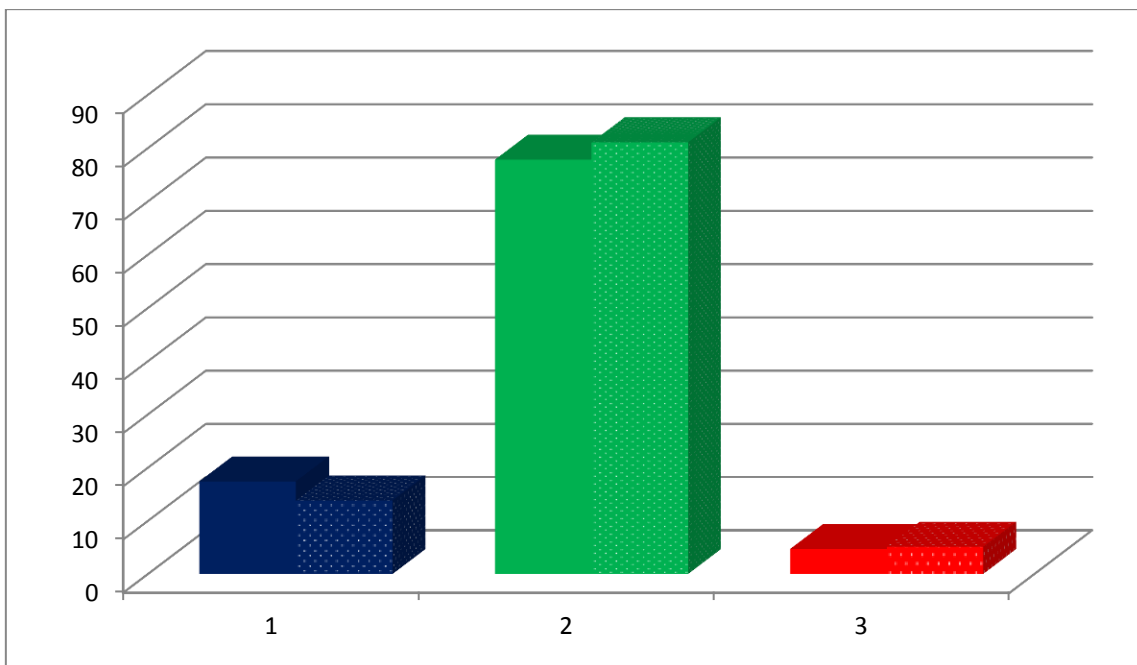


Figura 28. Comparación entre los valores de HAM y el RFA en los tres grupos de mujeres según su reserva ovárica **bajos**, **normales** y **altos**

Así pues, de los datos analizados previamente, podemos concluir que existe una correlación estadísticamente significativa entre:

- los valores de HAM y el RFA
- la HAM y la edad de la mujer

Y aunque esto ya lo sabíamos porque ha sido publicado en varios trabajos, lo que nos ha llamado la atención es que en un 4.74% de pacientes jóvenes y sanas con ciclos regulares, la HAM era igual o inferior a 1.1 ng/ml, valor típico de las mujeres con fallo ovárico oculto.

Otro punto a destacar es que las mujeres jóvenes asintomáticas diagnosticadas de baja reserva en nuestro estudio y que han decidido preservar su fertilidad mediante la criopreservación de ovocitos, han presentado siempre una baja respuesta a la inducción de la ovulación y han precisado de varios ciclos para poder tener un número de ovocitos suficientes criopreservados. Esto da aun mayor validez a nuestros datos, dado que confirma que las mujeres etiquetadas de baja reserva la tienen realmente.

71

Por otro lado, aquellas que decidieron adelantar su maternidad, concibieron de forma espontánea en los 12 meses siguientes, demostrando que estas mujeres tienen una reserva baja pero no una mala calidad ovocitaria (Hagen et al., 2012b). Todo lo contrario que acontece en las mujeres de >42 años que tienen “poco y malo”. Además, un dato curioso es que dos de estas mujeres concibieron una gestación gemelar (bivitelina o bicigótica), fenómeno que se relaciona con edades avanzadas en las mujeres.

5. DISCUSIÓN

Numerosos trabajos de investigación se han publicado sobre la hormona antimülleriana y la importancia que ésta tiene en la embriología y en las técnicas de reproducción asistida, pero no hemos encontrado ningún trabajo con el mismo diseño y los mismos resultados que este, que la determinación de HAM se puede utilizar como técnica de screening para el cálculo de la reserva ovárica en chicas jóvenes que por el momento no desean quedar gestantes.

Algunos estudios se han aproximado a la idea de que la HAM podría predecir la edad de la menopausia (Dólleman et al., 2014; Depmann et al., 2016); otros (Dewailly et al., 2014) que la HAM es, junto con el recuento de folículos antrales, el mejor marcador que tenemos de reserva ovárica. Algunos trabajos (Bentzen et al., 2013; Bentzen et al., 2013b; Cui et al., 2016; Du et al., 2016) han estudiado la evolución de la HAM a lo largo del ciclo vital de la mujer, desde el nacimiento hasta la menopausia, mientras que otros autores (Tremellen and Savulescu, 2014; Findlay et al., 2015; Tremellen and Savulescu, 2015; Younis et al., 2015) se han atrevido con la idea de que realmente la HAM podría ser utilizada como marcador de screening en un futuro para el cálculo de la reserva ovárica (siempre diciendo que faltaban estudios que pudiesen corroborar esto); pero ninguno se ha diseñado como nuestro estudio, porque en ninguno se ha estudiado de manera conjunta la HAM y el recuento de folículos en chicas menores de 30 años, con ciclos regulares y sin deseos genésicos por el momento, con el fin de poder ayudarles en la programación de su maternidad de cara a un futuro.

De ahí la novedad de este trabajo de investigación y la importancia del mismo, porque supone un avance en el campo de la medicina reproductiva, detectando problemas antes de que aparezcan y ofreciéndoles a las pacientes soluciones antes de que sea demasiado tarde. Porque de esta forma, pacientes que no se planteaban ser madres hasta muy pasados los 30, deciden ser madres antes (evitando un problema que muy probablemente tendrían en el futuro) o preservan su fertilidad a través de la criopreservación de sus ovocitos.

Lógicamente, no todo el potencial genésico se encuentra en los ovocitos, hay múltiples factores que afectan a la fertilidad y, por tanto, no todos los resultados por encima de 1.1 ng/dl de HAM supondrán un 100% de éxito de embarazo, pero sí que es cierto que más del 40% de los problemas de esterilidad de una pareja se producen por una reserva ovárica muy baja o una calidad ovocitaria pésima, por lo que si somos capaces de prevenir esta situación, muchas de las consultas de esterilidad se resolverán de manera rápida y efectiva.

Un artículo publicado en octubre de 2014 y, por tanto, cuando nuestro estudio ya llevaba un rodaje de varios años, en “Human Reproduction” y titulado: “Ovarian reserve screening, a scientific and ethical analysis” (Tremellen and Savulescu, 2014), nos da la razón. En él, Kelton Tremellen y Julian Savulescu se plantean no sólo la necesidad o no de realizar un screening de reserva ovárica, sino también si este es ético o no. Y la respuesta para ambas cuestiones es que sí, según los autores.

Muchas de las pacientes que nos encontramos en las consultas de reproducción asistida, nos dicen que les hubiera gustado saber de antemano que pasada cierta edad les iba a resultar muy difícil tener hijos, porque muy probablemente no hubieran retrasado la maternidad hasta ese momento en el que ya la probabilidad de conseguir una gestación con óvulos propios es casi imposible. Por eso, hacen falta estudios como este. Estudios que demuestren que una sencilla determinación de HAM junto con un recuento de folículos antrales a una edad precoz en la que la posibilidad de ser madre se plantea todavía como posibilidad y no ya como necesidad y motivo de angustia, pueda ser suficiente para evitar problemas en un futuro no tan lejano.

Las encuestas, según el trabajo de Tremellen y Savulescu, dicen que el 80% de las mujeres en edad reproductiva están interesadas en conocer su reserva ovárica y que gran parte de ellas cambiaría sus planes de ser madres si el resultado fuera adverso (Bavan et al., 2011; Aguinaldo, 2014). Pero quieren conocer su reserva de verdad, no la teórica que se sabe por edad y que ya ha sido publicada en numerosas ocasiones (Tremellen and Savulescu, 2014). Nuestro trabajo es fiel reflejo de esta realidad: “las mujeres quieren saber su reserva ovárica”. De hecho, a lo largo del estudio, nos hemos visto desbordados en más de una ocasión por la gran afluencia de mujeres jóvenes que deseaban saber el estado real de sus ovarios.

Hasta ahora, como hemos comentado anteriormente, estudios como este que presentamos no se han realizado por diversos motivos. El artículo de Tremellen y Savulescu plantea diversas razones:

1. Que en la actualidad faltan trabajos que demuestren que realmente el screening de la reserva ovárica refleja de forma fiable el potencial natural fértil de la mujer en el momento en que se realiza.
2. Que se genera una ansiedad innecesaria en las mujeres.
3. Que el dinero debería emplearse en otras campañas de salud que realmente valiesen la pena y no en calcular reservas ováricas de incierto significado.

Todas estas razones no tienen suficiente evidencia científica y éticamente, tampoco se sostienen, tal y como vamos a ver con la ayuda de la publicación de Tremellen y Savulescu.

5.1 ¿Por qué hacer un screening de reserva ovárica?

A medida que una mujer va cumpliendo años, su potencial de ser madre va reduciéndose por una disminución progresiva de su reserva ovárica, tanto en cantidad como en calidad, siendo los 35 años, el punto de inflexión a partir del cual la reducción se convierte en exponencial.

Aunque es algo lógico y casi de cultura popular, muchas mujeres no son conscientes de esto y piensan que simplemente por tener ciclos regulares y ningún problema ginecológico se quedarán embarazadas sin

problemas en el momento preciso en que ellas lo elijan. Pero esto desgraciadamente no es así.

Antes que la FSH y la LH, que aumentan cuando ya no hay vuelta atrás y la perimenopausia es avanzada, la HAM disminuye con años de antelación, marcando lo que va a ser el potencial reproductivo de esa mujer. De hecho, en este estudio, el 4.74% de las mujeres jóvenes, con ciclos menstruales regulares, tienen una HAM inferior o igual a 1.1 ng/mL, claramente reducida.

En base a esto, el trabajo de Tremellen y Savulescu, pone un ejemplo muy claro de lo que nosotros defendemos: una mujer de 28 años, con una HAM de 0.5 ng/ml, probablemente tendrá la menopausia con 40 años (Teherani et al., 2013). Si desea ser madre y lo intenta con 28-30 años, la tasa de éxito será elevada (si no hay otros factores que lo impidan) (Hagen et al., 2012b); pero como la caída de la fertilidad predice la menopausia en unos 10 años más o menos, probablemente esta mujer tenga un problema de esterilidad secundaria (o primaria, si no ha tenido antes hijos) pasados los 35 (te Velde and Pearson, 2002), lo que es de crucial interés para ella si desea tener descendencia en un futuro.

En nuestro estudio, hemos visto que el 100 % de las mujeres que tienen una reserva ovárica baja quieren ser madres en algún momento de su vida, pero si se esperan a ser madres con 35 años, probablemente no puedan con sus propios óvulos. De ahí la necesidad de estudios como este que aboguen por el cribado de la reserva ovárica.

5.2 ¿Cumple el screening de reserva ovárica los puntos que la OMS considera que debe cumplir toda prueba de screening?

Para que una prueba de screening sea considerada como tal, los puntos que debe cumplir según la Organización Mundial de la Salud (OMS) son (Wilson and Junger, 1968; Tremellen and Savulescu, 2014):

1. La condición a estudio ha de ser un importante problema de salud tanto para la comunidad como para el individuo
2. Debe haber tratamiento para la condición en cuestión
3. La historia natural de la “patología” ha de ser conocida suficientemente
4. Tiene que haber una fase de latencia precoz en la que poder tratar de forma efectiva el problema
5. El test debe ser bien aceptado por el paciente y el médico
6. Tiene que haber facilidades en el diagnóstico y tratamiento de la “patología”
7. Tiene que haber una política concreta y aceptada sobre qué pacientes tratar
8. El tratamiento precoz debe ser más eficaz y beneficioso que el tardío
9. El coste de realizar la prueba tiene que ser menor que el derivado del tratamiento médico que requerirá la “patología”
10. La detección de los casos ha de ser un proceso continuo y no algo puntual para un único proceso

El screening de la reserva ovárica que nosotros proponemos, cumple todos los puntos (Tremellen and Savulescu, 2014):

1. Efectivamente, la disminución precoz de la reserva ovárica es de crucial importancia tanto para la mujer como para su pareja y el resto de sociedad. Para la mujer, porque si ser madre era un objetivo a cumplir, el no poder serlo con sus propios medios supone un cambio radical en su planteamiento de vida; para la sociedad, por lo que una tasa de natalidad baja supone y un posible síndrome ansioso-depresivo derivado de la frustración de no cumplir lo deseado.

2. Una reserva ovárica baja en menores de 35 años no supone un problema de esterilidad de entrada, ya que la evidencia demuestra que las posibilidades de tener hijos por debajo de los 35, son altas a pesar de una HAM baja (Gnoth et al., 2003). Si en ese momento no desean ser madres por sus circunstancias personales, la opción de criopreservar ovocitos también es posible y, de esa forma, quedarse embarazadas más adelante con sus propios óvulos. Por tanto, sí que existe un tratamiento efectivo en pacientes con una baja reserva, ya que aunque ni la cantidad ni la calidad de los óvulos puede mejorarse, el problema sí que tiene solución.

3. Que la reserva ovárica disminuye con los años es sobradamente conocido, por tanto, el screening de reserva ovárica es totalmente válido porque se basa en un principio de sobra sabido: que la reserva ovárica viene determinada desde el nacimiento y que con los años va disminuyendo hasta llegar a niveles por debajo de los mil ovocitos en la menopausia.

4. Este criterio se cumple de sobra. El detectar una baja reserva antes de que la baja reserva constituya un problema es de lo que trata esta tesis y lo que conseguimos con esta prueba. Por tanto, la fase de latencia en este caso la constituye una baja reserva determinada por un RFA bajo y una HAM bajas en chicas jóvenes que, por su edad, todavía tienen posibilidades de quedarse embarazadas de manera natural en ese momento o en un futuro con la criopreservación de ovocitos.

5. Tanto la determinación de la HAM como el RFA, constituyen los mejores marcadores de reserva ovárica y son bien aceptados tanto por la paciente como por el médico. Ambas son 2 pruebas sencillas, baratas, rápidas y muy poco molestas para la paciente, con unos beneficios potenciales mucho mayores que lo que la incomodidad de una analítica o una ecografía vaginal puedan suponer. En esta tesis nosotros hemos medido tanto la HAM como el RFA, pero la idea en un futuro es que con una simple analítica se pueda saber la reserva ovárica sin necesidad de realizar la ecografía.

80

6. La reproducción asistida siempre es una opción de tratamiento a futuro. La mujer debe saberlo y, por tanto, tener la opción de criopreservar ovocitos en el momento en que se diagnostica la baja reserva.

7. Este es el único punto que falla para poder considerar la HAM como prueba de screening debido a la falta de estudios al respecto, ya que no sabemos con certeza qué valores considerar de corte en mujeres jóvenes con ciclos menstruales. El trabajo de Tremellen y Savulescu,

considera que una HAM por debajo del percentil 10 para la edad de la paciente, es un punto razonable para considerar que el potencial fértil estará comprometido en un futuro no muy lejano (te Velde and Pearson, 2012; Tremellen and Savulescu, 2014). Nosotros hemos utilizado el valor de 1.1 ng/ml como punto de corte, de tal forma que valores de HAM similares o inferiores a 1.1 ng/ml los consideramos disminuidos para una chica joven y sana sin patología (Younis et al., 2015).

8. Evidentemente y, es lo que nosotros defendemos, el conocer que una paciente tiene una reserva ovárica baja nos ayuda a prevenir un problema de esterilidad en el futuro, porque tanto la opción de intentar una gestación como la de criopreservar ovocitos para en unos años intentarlo, son opciones válidas y mucho más eficaces que el intentarlo ya pasados los 35.

81

9. En otros países donde las técnicas de reproducción asistida no están financiadas por la seguridad social, este punto no es tan importante. Pero en España, donde sí que lo están, esto es de vital importancia. Porque no es lo mismo para la sociedad el coste económico de criopreservar ovocitos en una chica sana de 30 años o que una mujer intente por sus medios quedarse embarazada, que todo el coste que supone el tratamiento médico y las posibles complicaciones derivadas de un ciclo de reproducción asistida.

10. El screening de reserva ovárica habría de ofertarse a todas las mujeres de entre 20 y 30 años. Antes de los 25, el artículo de Tremellen y Savulescu, defiende que la prevalencia de reserva escasa es

muy baja y que son mujeres que por su corta edad no suelen estar en situación ni de formar una familia ni de plantearse un futuro con niños. Nosotros sin embargo hemos querido abarcar de los 20 a los 30 años porque pensamos que cuanto antes se detecte el problema, antes se podrán dar soluciones.

El trabajo de Tremellen y Savulescu defiende un modelo de screening que nosotros proponemos en esta tesis doctoral. Algunos puntos varían, como la edad a la que ellos consideran que debería hacerse, que son los 30 años, pero la base es la misma. Así, en nuestra opinión:

-el screening debería ofertarse a toda mujer mayor de 18 años, de forma gratuita, sin imponer y sin prejuzgar

-si la mujer quiere someterse a esta prueba de screening debe realizarlo de manera totalmente voluntaria, sin ser coaccionada

-debería realizarse únicamente con la HAM en cualquier momento del ciclo, y sólo si ésta es anormalmente baja para la edad de la paciente, debería realizarse un recuento de folículos antrales los días 2 al 5 del ciclo junto con una determinación hormonal más completa con FSH, LH y de nuevo HAM en esos primeros días de ciclo.

El estudio de Tremellen y Savulescu, defiende también que el resultado de la prueba debe ser valorado por un médico especialista en reproducción asistida, que si los resultados de HAM son bajos hay que darle la oportunidad a la mujer de intentar una gestación natural en los 6 meses siguientes y que si no se consigue, plantea ya la necesidad de tratar

de forma activa; finalmente, defiende también que a las pacientes con un resultado de HAM en el límite bajo de la normalidad, se les debe ofrecer una nueva determinación a los 12 meses para valorar la evolución de la caída de la HAM con el tiempo (Tremellen and Savulescu, 2014).

A pesar de todo esto, todavía hay partidarios de no realizar el screening por varios motivos, pero para todos ellos tenemos una respuesta en contra y no encontramos evidencia suficiente para no hacerlo (Tremellen and Savulescu, 2014):

1. Algunos, afirman que no hay evidencia suficiente para defender que una baja reserva ovárica traiga consigo implicaciones para el potencial fértil de una mujer en los próximos 6 meses.

Lo que nosotros buscamos son implicaciones a largo plazo, no en un futuro inmediato. Por tanto, que una mujer joven por debajo de los 30 años tenga una baja reserva ovárica nos preocupa no porque ahora la tenga baja, sino porque en un futuro tendrá importantes repercusiones en su vida personal.

2. Los hay también quienes afirman que calcular la reserva ovárica puede producirle a la mujer un estado innecesario de ansiedad. Sobre todo sabiendo que el test no es 100% fiable.

Nosotros defendemos que el screening se trata de algo totalmente voluntario y, por tanto, si una paciente piensa que el conocer su reserva ovárica va a suponerle un estado de ansiedad importante, que no se lo haga. Por otra parte, no obligamos a nadie, simplemente damos la

opción a aquella mujer que lo desee, de conocer su reserva y así, poder organizarse desde un principio antes de que sea demasiado tarde. Además, un test de screening no da diagnósticos, solo probabilidades, por tanto, que no sea 100% seguro no debe ser un impedimento para no hacerlo.

3. Otros también defienden que el dinero debería emplearse en otras campañas de salud y que una educación a favor de una maternidad precoz explicando todos los riesgos que una maternidad tardía supone, es suficiente y mucho más económico.

Que la esterilidad es un problema de salud pública es evidente. Por una parte, porque realmente es un problema de salud, ya que no entra dentro de la definición de salud el no poder tener descendencia. Por otra, porque supone un compromiso en la pirámide poblacional que el 17% de parejas al año no puedan tener hijos en España. Por tanto, como tema de salud pública, es perfectamente entendible que se invierta dinero en él, siendo además uno de los programas que menos inversión requiere (una determinación de HAM son apenas 10 euros).

Además, en cuanto a las campañas, ya se han llevado numerosas para concienciar a la gente de los peligros de retrasar la maternidad, pero como hemos comentado anteriormente, todas han sido infructuosas.

4. Algunos opositores del screening de reserva ovárica, defienden que éste puede suponer un intervencionismo innecesario sobre

la paciente, aumentando de manera totalmente innecesaria el número de ovocitos criopreservados y de tratamientos de reproducción asistida.

Este es el único punto en el que coincidimos. Si informamos a las pacientes de que tienen una reserva ovárica baja, puede que decidan criopreservarse ovocitos si en ese momento no tienen deseos de ser madre o sus circunstancias personales se lo impiden, aumentando así el número de este tipo de intervenciones que no se hubieran realizado de otra manera. Sin embargo, también es cierto que se trata de pacientes que muy probablemente tengan complicado ser madres pasados los 35, por tanto, que tengan un riesgo alto igualmente de recurrir a una técnica de reproducción asistida, más cara que la simple criopreservación.

5. Otros que se oponen también refieren que el decirle a una mujer con 30 años que tiene una buena reserva ovárica, puede suponer que se relaje en su deseo de concebir y lo deje para muy pasados los 35, sin pensar en que existen otros factores asociados a la edad independientemente de la reserva ovárica.

Nosotros creemos que para evitar esto, simplemente hay que hablar con la mujer y explicarle que un resultado positivo del test no implica un retraso de la maternidad, sino que su reserva ovárica es buena y que a diferencia de otras pacientes, podrá ser madre con más facilidad con 35 que otras, pero eso no implica que no haya otros factores que lo puedan dificultar. Basta con explicárselo a la paciente, pero no creemos que sea un argumento suficiente para evitar el screening.

5.3 ¿Es ético el cálculo de la reserva ovárica?

Tal como nos recuerda el artículo de Tremellen y Savulescu, la ética en medicina debe cumplir 4 principios: autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Pues bien, los 4 principios los cumple este test de screening.

Autonomía

La mujer debe poder decidir si desea conocer su reserva ovárica y cómo actuar en consecuencia. Valorar los pros y contras y tomar una decisión al respecto. Ser capaz de elegir, pero conociendo previamente de qué base se parte, en este caso, su reserva. Ofrecerle a la mujer la capacidad de conocerla y si así lo desea, poder elegir qué es lo que quiere hacer. Ser autónoma con respecto a sus decisiones y poder tomarlas con toda la información disponible. Por eso pensamos que el screening de reserva ovárica cumple de sobra este requisito.

Beneficencia y no maleficencia

Desde el punto de vista técnico, este test no supone ningún peligro para la mujer, se basa en una simple analítica de sangre. Y es tanto el beneficio que la paciente puede obtener de él que con creces cumple el criterio de beneficencia. Porque advierte a una paciente joven de que si retrasa la maternidad puede encontrarse con un problema de esterilidad, así, lo único que hacemos es facilitarle información para que, sin prisa, pueda organizarse de la mejor forma que ella considere.

Justicia

La medida de la justicia es dar a cada uno lo que le corresponde. Si tal como defiende esta tesis disponemos de un test de screening eficaz para valorar la reserva ovárica en pacientes jóvenes y sanas ¿es justo no ponerlo en práctica y negarlo a la población?, ¿es justo no dar a la mujer la opción de elegir?, ¿es justo no darle soluciones a la mujer si la reserva ovárica está disminuida en base a que económicamente no sale rentable? Nosotros creemos que no. Y que, por tanto, conocer la reserva ovárica es algo justo, porque desde la libertad le permite a toda mujer tomar decisiones cruciales para ella y su familia en el presente pensando en el futuro.

Por todo lo expuesto, creemos que el screening de reserva ovárica en chicas jóvenes y sanas mediante la determinación de HAM cumple todos los criterios para considerarse como tal y, no sólo eso, sino que es completamente ético. Nuestra muestra es bastante extensa, consta de más de 1000 pacientes, pero es cierto que hacen falta más estudios que permitan establecer unos valores de corte para este tipo de población por debajo de los 30 años. Como también hacen falta estudios que confirmen lo que nosotros defendemos, que el cálculo de reserva ovárica entre los 20 y 30 años supone un método eficaz de evitar problemas de esterilidad en un futuro.

6. CONCLUSIONES

A lo largo de los últimos 4 años, hemos leído gran parte de la literatura publicada en relación con la HAM, estudiando sus distintas funciones, entre ellas la que nos ayuda a calcular la reserva ovárica con el fin de aprovechar este potencial que sabemos que tiene. Las conclusiones que hemos extraído de esta investigación son las siguientes:

1. No se puede calcular, con los medios actuales, la reserva ovárica en niñas recién nacidas por los bajos valores de HAM. Como además tampoco podemos estudiarles los ovarios para corroborar los valores obtenidos, el cálculo de la reserva mediante la HAM es inútil en las primeras etapas de la vida.

2. Los mejores métodos para el cálculo de la reserva ovárica son la HAM y el RFA, de acuerdo con nuestras conclusiones y con las de numerosos trabajos de investigación en medicina reproductiva.

3. Los valores de HAM varían muy ligeramente a lo largo del ciclo menstrual y por el uso de anticonceptivos, pero en general, se considera un buen marcador a pesar de ello. El RFA en los primeros 5 días de ciclo también constituye un buen método de cálculo.

4. Intentar establecer los valores de referencia de la HAM a lo largo de la vida de la mujer ha sido objeto de estudio de muchas publicaciones sobre el tema, pero intentar establecer unos valores de referencia para una población joven y sana entre 20 y 30 años es complicado. Nosotros

hemos tomado como referencia los valores publicados en varios estudios recientes (Younis et al., 2015).

5. La determinación de la HAM en etapas tempranas, corroborado por el RFA, es útil para predecir el declive de la reserva ovárica con el tiempo. Valores bajos en el presente junto con un RFA disminuido nos indican que en un futuro esa reserva estará seriamente comprometida, pero no nos dice en cuanto tiempo ni cuáles serán los valores de entonces.

6. La determinación de HAM y el RFA (en un futuro la idea es que sólo la HAM sea suficiente) son útiles como marcadores de screening, aunque hacen falta más estudios que corroboren esta hipótesis y, sobretodo, estudios a largo plazo que permitan ver la evolución de esas pacientes con baja reserva.

7. Es necesario concienciar a la comunidad médica de la importancia de instaurar esta técnica de screening para evitar problemas de esterilidad en un futuro relacionados con la baja calidad o cantidad ovocitarios. Para ello, hacen falta también más estudios que permitan concluir lo que nosotros defendemos.

Por todo lo expuesto, podemos afirmar que esta tesis doctoral constituye un paso importante en el campo de la medicina reproductiva y preventiva, ya que aporta una nueva visión de la esterilidad y maternidad, evitando muchos de los problemas que nos encontramos en la consulta a

diario y dando a las pacientes la posibilidad de elegir libremente con toda la información disponible, sobre su futuro y su vida como madres.

7. BIBLIOGRAFIA

Aguinaldo ET, Morgan DC, Julliard K. What would you do if you knew?
Obstet Gynecol 2014; 123 (Suppl. I):187S.

Aks glaede L, Sørensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, Petersen JH, Linneberg A, Andersson AM, Main KM, Skakke bæk NE, Juul A. Changes in anti-Müllerian hormone (HAM) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. **J Clin Endocrinol Metab** 2010; 95(12):5357-64.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM). The story behind the American Society for Reproductive Medicine's prevention of infertility campaign. **Fertil Steril** 2003; 80:295-299.

93

Arce JC, La MA, Mimer KB, Nyboe AA, Fleming R. Antimullerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. **Fertil Steril** 2013; 99:1644-1653.

Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. **Fertil Steril** 2003 Jul; 80(1):116-22.

Bavan B, Porzig E, Baker VL. An assessment of female university students' attitudes toward screening technologies for ovarian reserve. **Fertil Steril** 2011; 96(5):1195-9.

Bentzen JG, Forman JL, Johannsen TH, Pinborg A, Larsen EC, Andersen AN. Ovarian antral follicle subclasses and anti-mullerian hormone during normal reproductive aging. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:1602-11.

Bentzen JG, Forman JL, Larsen EC, Pinborg A, Johannsen TH, Schmidt L, Friis-Hansen L, Nyboe Andersen A. Maternal menopause as a predictor of anti-Mullerian hormone level and antral follicle count in daughters during reproductive age. **Hum Reprod** 2013b; 28:247-55

Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P, Andreone L, Ropelato MG, Gottlieb S, Bergadá C, Campo S, Rey RA. Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. **J Clin Endocrinol Metab** 2006 Oct; 91(10):4092-8.

Bongaarts J. Global fertility and population trends. **Semin Reprod Med** 2015; 33:5-10.

Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, Olovsson M, Holte J. Antimullerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:1107-1114.

Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. **Fertil Steril** 2010; 94(3):1044-50.

Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. **Endocrine Rev** 2009; 30:465-493.

Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. **Trends Endocrinol Metab** 2008; 19:340-347.

Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van RI, de VA, Themmen AP, Laven JS, de Jong FH, te Velde ER, Fauser BC et al. Anti-Müllerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:2532-2539.

Broer SL, Dolleman M, van DJ, Broeze KA, Opmeer BC, Bossuyt PM, Eijkemans MJ, Mol BW, Broekmans FJ. Prediction of an excessive response in in vitro fertilization from patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: an individual patient data meta-analysis. **Fertil Steril** 2013a; 100:420-429.

Broer SL, Dolleman M, van DJ, Broeze KA, Opmeer BC, Bossuyt PM, Eijkemans MJ, Mol BW, Broekmans FJ. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. **Hum Reprod Update** 2013b; 19:26-36.

Broughman MF, Crofton PM, Johnson EJ, Evans N, Anderson RA, Wallace WH. Anti-Müllerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and

postpubertal girls treated for cancer: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:2059-2067.

Chan C, Kimberly L. Clinical pregnancy in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and low AMH: utility of ovarian reserve markers in IHH. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31:1317-1321.

Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000, 73(4):859-61.

Committee on Gynecologic Practice. Committee opinion no. 618: Ovarian reserve testing. *Obstet Gynecol* 2015; 125:268-73.

96

Crawford NM, Steiner AZ. Age-related infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2015; 42:15-25.

Cui L, Qin Y, Gao X, Lu J, Geng L, Ding L, Qu Z, Zhang X, Chen ZJ. Antimüllerian hormone: correlation with age and androgenic and metabolic factors in women from birth to postmenopause. *Fertil Steril* 2016; 105(2):481-485.

de Carvalho B.R., Rosa e Silva A.C., Rosa e Silva J.C., dos Reis R.M., Ferriani R.A., Silva de Sá M.F. Ovarian reserve evaluation: State of the art. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25(7):311-22.

Deb S, Jayaprakasan K, Campbell BK, Clewes JS, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Intraobserver and interobserver reliability of automated antral follicle

counts made using three-dimensional ultrasound and SonoAVC. ***Ultrasound Obstet Gynecol*** 2009; 33:477-83.

Depmann M, Broer SL, van der Schouw YT, Tehrani FR, Eijkemans MJ, Mol BW, Broekmans FJ. Can we predict age at natural menopause using ovarian reserve tests or mother's age at menopause? A systematic literature review. ***Menopause*** 2016; 23:224-32.

Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C, Mason H, Nelson SM, Visser JA, Wallace WH, Anderson RA. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. ***Hum Reprod Update*** 2014; 20:370-85.

Dólleman M, Depmann M, Eijkemans MJ, Heimensem J, Broer SL, van der Stroom EM, Laven JS, Van Rooij IA, Scheffer GJ, Peeters PH, van der Schouw YT, Lambalk CB, Broekmans FJ. Anti-Mullerian hormone is a more accurate predictor of individual time to menopause than mother's age at menopause. ***Hum Reprod*** 2014; 29:584-91.

Dólleman M, Faddy MJ, van DJ, van der Schouw YT, Messow CM, Leader B, Peeters PH, McConnachie A, Nelson SM, Broekmans FJ. The relationship between anti-Müllerian hormone in women receiving fertility assessments and age at menopause in subfertile women: evidence from large population studies. ***J Clin Endocrinol Metab*** 2013; 98:1946-1953.

Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. **Nat Rev Endocrinol** 2013; 9:735-49.

Du X, Ding T, Zhang H, Zhang C, Ma W, Zhong Y, Qu W, Zheng J, Liu Y, Li Z, Huang K, Deng S, Ma L, Yang J, Jiang J, Yang S, Huang J, Wu M, Fang L, Lu Y, Luo A, Wang S. Age-Specific Normal Reference Range for Serum Anti-Müllerian Hormone in Healthy Chinese Han Women: A nationwide Population-Based Study. **Reprod Sci** 2016 [Epub ahead of print].

Durlinger AL., Kramer P., Karels B., de Jong FH., Uilenbroek JT., Grootegoed JA., Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology** 1999; 140(12):5789-96.

98

Elizur SE, Lebovitz O, Derech-Haim S, Dratviman-Storobinsky O, Feldman B, Dor J, Orvieto R, Cohen Y. Elevated levels of FMR1 mRNA in granulosa cells are associated with low ovarian reserve in FMR1 premutation carriers. **PLoS One** 2014; 9(8):e105121.

Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA. Ovarian reserve screening: a scientific and ethical analysis. **Hum Reprod** 2015; 30:1000-2.

Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA. How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established? **Biol Reprod** 2015b; 93(5):111.

Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. **Reprod Biomed Online** 2015; 31:486-96.

Forabosco A., Sforza C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. **Fertil Steril** 2007; 88(3): 675-83.

Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Prospectively assessing risk for premature ovarian senescence in young females: a new paradigm. **Reprod Biol Endocrinol** 2015; 13:29.

Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. **Hum Reprod** 2003; 18(9):1959-66.

Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. **Hum Reprod Update**, 2005; 11(4):391-410.

Greene AD, Patounakis G, Segars JH. Genetic associations with diminished ovarian reserve: a systematic review of the literature. **J Assist Reprod Genet** 2014; 31:935-46.

Grinspon RP, Rey RA. Anti-müllerian hormone and sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. **Horm Res Paediatr** 2010; 73(2):81-92.

Hagen CP, Aksglaede L, Sørensen K, Mouritsen A, Andersson AM, Petersen JH, Main KM, Juul A. Individual serum levels of anti-Müllerian hormone in healthy girls persist through childhood and adolescence: a longitudinal cohort study. **Hum Reprod** 2012; 27(3):861-6.

Hagen CP, Mouritsen A, Mieritz MG, Tinggaard J, Wohlfart-Veje C, Fallentin E, Brocks V, Sundberg K, Jensen LN, Anderson RA, Juul A, Main KM. Circulating HAM reflects ovarian morphology by magnetic resonance imaging and 3D ultrasound in 121 healthy girls. **J Clin Endocrinol Metab** 2015; 100:880-90.

100

Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebaek NE, Andersson AM, Main KM, Hjollund NH, Ernst E., Bonde JP, Anderson RA, Jensen TK. Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in Young healthy women: a prospective cohort study. **Fertil and Steril** 2012b; 98(6):1602-09.

Himpl R., Snajderova M, Mardesic T. Antimüllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. **Physiol Res** 2011; 60:217-223.

Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91(10):4057-63.

Iliodromiti S, Anderson RA, Nelson SM. Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response. ***Hum Reprod Update*** 2015; 21(6):698-710.

Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, Nelson SM. Can anti-Mullerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. ***J Clin Endocrinol Metab*** 2013; 98:3332-40.

Joffe M, Key J, Best N, Jensen TK, Keiding N. The role of biological fertility in predicting family size. ***Hum Reprod*** 2009; 24:1999-2006.

Kallio S, Puurunen J, Ruokonen A, Vaskivuo T, Piltonene T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. ***Reprod Endocrinol*** 2013; 99(5):1305-10.

Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, Ellis NA, Boyd J, Borgen PI, Barakat RR, Norton L, Castiel M, Nafa K, Offit K. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. ***N Engl J Med*** 2002; 346:1609-15.

Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WH. A validated model of serum anti-müllerian hormone from conception to menopause. ***PLoS One*** 2011; 6(7):e22024.

Kerkhof GF, Leunissen RW, Willemsen RH, de Jong FH, Visser JA, Laven JS, Hokken-Koelega AC. Influence of preterm birth and small birth size on serum anti-Müllerian hormone levels in young adult women. *Eur J Endocrinol* 2010; 163(6):937-44.

Knauff EA, Eijkemans MJ, Lambalk CB, Ten Kate-Booij MJ, Hoek A, Beerendonk CC, Laven JS, Goverde AJ, Broekmans FJ, Themmen AP et al. Anti-Müllerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:786-792.

Kollmann M, Martins WP, Raine-Fenning N. Terms and thresholds for the ultrasound evaluation of the ovaries in women with hyperandrogenic anovulation. *Hum Reprod Update* 2014; 20:463-4.

102

La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004; 19(12):2738-41.

La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento A, Baraldi E, Carducci Artensio A, Stabile G, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010, 16(2):113-130.

La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006, 21(12):3103-07.

La Marca A, Sighinolfi G, Papaleo E, Cagnacci A, Volpe A, Faddy MJ. Prediction of age at menopause from assessment ovarian reserve may be improved by using body mass index and smoking status. *PLoS One* 2013; 8:e57005.

Lange UC., Saitou M., Western PS., Barton SC., Surani MA. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol* 2003; 3:1.

Lass A. Assesment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? *Hum Reprod* 2004; 19(3):467-9.

103

Lauritsen MP, Bentzen JG, Pinborg A, Loft A, Forman JL, Thuesen LL, Cohen A, Hougaard DM, Nyboe Andersen A. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod* 2014; 29:791-801.

Ledger WL. Clinical utility of measurement of anti-mullerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(12):5144-54.

Lee R, Mason A; members of the NTA Network. Is low fertility really a problem? Population aging, dependency, and consumption. **Science** 2014; 346:229-34.

Lie Fong A., Laven JSE, Hakvoort-Camel FGAI, Schipper I, Visser JA, Themmen APN, de Jong FH, van den Heuvel-Eibrink. Assesment of ovarian reserve in adult childhood cancer survivors using anti-Müllerian hormone. **Hum Reprod** 2009; 24(4):982-90.

Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Roes EM, Peters WH, Hokken-Koelega AC, Fauser BC, Themmen AP, de Jong FH, Schipper I, Laven JS. Serum Anti-Müllerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood. **J Clin Endocrinol Metab** 2012; 97(12):4650-5.

Loh JS, Maheshwari A. Anti-Mullerian hormone--is it a crystal ball for predicting ovarian ageing? **Hum Reprod** 2011; 26(11):2925-32.

Marchetti C, De Felice F, Palaia I, Perniola G, Musella A, Musio D, Muzii L, Tombolini V, Panici PB. Risk-reducing salpingo-oophorectomy: a meta-analysis on impact on ovarian cancer risk and all cause mortality in BRCA 1 and BRCA 2 mutation carriers. **BMC Women's Health** 2014; 14:150-165.

Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJ, Curtin SC, Matthews TJ. Births: Final Data for 2012. **National vital Statistics Reports (CDC)** 2013; 62.

Mc Gee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocr Rev** 2000; 21:200-214.

Merchant-Larios H., Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. **Prog Clin Biol Res** 1981; 59B:383-392.

Monniaux D1, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? **Biol Reprod** 2014 25; 90(4):85.

Nelson LM, Covington SN, Rebar RW. An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. **Fertil Steril** 2005; 83(5):1327-32.

105

Oktaý K., Newton H., Mullan J., Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Hum Reprod** 1998; 5:1133-1138.

Oktaý K, Bedoschi G. Oocyte criopreservation for fertility preservation in postpuberal female children at risk for premature ovarian failure due to accelerated follicle loss in Turner syndrome or cáncer treatments. **J Pediatr Adolesc Gynecol** 2014; 27(6):342-6.

Oktem O., Oktaý K. The ovary: anatomy and function throughout human life. **Ann NY Acad Sci** 2008; 1127: 1-9.

Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 2010; 25(12):2944-54.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 103:e44-50.

Raine-Fenning N, Jayaprakasan K, Chamberlain S, Devlin L, Priddle H, Johnson I. Automated measurements of follicle diameter: a chance to standardize? *Fertil Steril* 2009; 91(4 Suppl):1469-72.

Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:80-87.

Sander M, Oxlund B, Jespersen A, Krasnik A, Mortensen EL, Westendorp RG, Rasmussen LJ. The challenges of human population ageing. *Age Ageing* 2015; 44:185-7.

Saitou M., Barton SC., Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002; 6895:293-300.

Scheffer JB, Lozano DM, Frydman R., Fanchin R. Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibine B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular statuts. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2007; 29:186-91.

Schmidt L., Sobotka T., Bentzen JG., Nyboe Andersen A., ESHRE Reproduction and Society Task Force. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. ***Hum Reprod Update*** 2012; 18:29-43.

Shrebnik N, Margalioth EJ, Rabinowitz R, Varshaver I, Altarescu G, Renbaum P, Levi-Lahad E, Weintraub A, Eldar-Geva T. Ovarian reserve and PGD treatment outcome in women with myotonic dystrophy. ***Reprod Biomed online*** 2014; 29(1):94-101.

Sir-Petermann T, Márquez L, Cárcamo M, Hitschfeld C, Codner E, Maliqueo M, Echiburú B, Aranda P, Crisosto N, Cassorla F. Effects of birth weight on anti-mullerian hormone serum concentrations in infant girls. ***J Clin Endocrinol Metab*** 2010 Feb;95(2):903-10.

107

Smeeding TM. Economics. Adjusting to the fertility bust. ***Science*** 2014; 346:163-4.

Sönmezer M, Özmen B, Atabekoglu CS, Papuccu EG, Ozkavukcu S, Berker B, Pabuccu R. Serum Anti-müllerian hormone levels correlate with ovarian response in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. ***J Assist Reprod Genet*** 2012; 29:597-602.

Sowers M, McConnell D, Gast K, Zheng H, Nan B, McCarthy JD, Randolph JF. Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles. ***Fertil Steril*** 2010; 94(4):1482-6.

Spencer JB, Badik JR, Ryan EL, Gleason TJ, Broadway KA, Epstein MP, Fridovich-Keil JL. Modifiers of ovarian function in girls and women with classic galactosemia. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98(7):E1257-65.

Steiner AZ, Herring AH, Kesner JS, Meadows JW, Stanczyk FZ, Hoberman S, Baird DD. Antimüllerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30-42 years. **Obstet Gynecol** 2011; 117:798-804.

Stoop D, Maes E, Polyzos NP, Verheyen G, Tournaye H, Nekkebroeck J. Does oocyte banking for anticipated gamete exhaustion influence future relational and reproductive choices? A follow-up of bankers and non-bankers. **Hum Reprod** 2015; 30:338-44.

108

Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Tohidi M, Gohari MR, Azizi F. Modeling age at menopause using serum concentrations of anti-müllerian hormone. **J Clin Endocrinol Metab** 2013; 98:729-735.

te Velde E., Habbema D., Leridon H., Eijkemans M. The effect of postponement of first motherhood on permanent involuntary childlessness and total fertility rate in six European countries since the 1970s. **Hum Reprod** 2012; 27:1179-1183.

te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. **Hum Reprod Update** 2002; 8(2):141-54.

Tran ND., Cedars MI., Rosen MP. The role of anti-Müllerian hormone in assessing ovarian reserve. **J Clin Endocrin Metab** 2011; 96 (12):3609-14.

Tremellen KP, Savulescu J. Ovarian reserve screening: a scientific and ethical analysis. ***Hum Reprod*** 2014; 29:2606-2614.

Tremellen KP, Savulescu J. Reply: ovarian reserve screening: a scientific and ethical analysis. ***Hum Reprod*** 2015; 30:1001-2.

van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Kammel FG, van den BC, van den BH, Pieters R, de Muinck Keizer-Schrama SM. Anti-Müllerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodkin's lymphoma during childhood. ***J Clin Endocrinol Metab*** 2007; 92:3869-3874.

Venturella R, Lico D, Sarica A, Falbo MP, Gulletta E, Morelli M, Zupi E, Cevenini G, Cannataro M, Zullo F. OvAge: a new methodology to quantify ovarian reserve combining clinical, biochemical and 3D-ultrasonographic parameters. ***J Ovarian Res*** 2015; 8:21.

Visser JA., Durlinger AL., Peters IJ., van der Heuvel ER., Rose UM., Kramer P., et al. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. ***Endocrinology*** 2007; 148:2301-8.

Wilson JMG, Junger G. Principles and practice of screening for disease. ***Geneva: WHO***, 1968.

White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nat Med** 2012; 18(3):413-21.

Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiological menstrual cycle in reproductive age women. **Fertil Steril** 2008; 89(4):927-33.

Xi W, Yang Y, Mao H, Zhao X, Liu M, Fu S. Circulating anti-müllerian hormone as predictor of ovarian response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. **J Ovarian Res** 2016; 9(1):3.

110

Ying Y., Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. **Dev Biol** 2001; 2:484-492.

Ying Y., Qi X., Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 14:7858-7862.

Younis JS, Ben-Ami M, Ben-Shlomo I. The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal. **J Ovarian Res** 2015; 8:76.

Zou K., Yuan Z., Yang Z., Luo H., Sun K., Zhou L., Xiang J., Shi L., Yu Q., Zhang Y. et al. Production of offspring from a germline stem cell line driven from neonatal ovaries. **Nat Cell Biol** 2009; 5:631-636.

