

TESIS DOCTORAL

ACTIVACIÓN FOLICULAR MEDIANTE FRAGMENTACIÓN DE LA CORTEZA OVÁRICA COMO TRATAMIENTO DE LA ESTERILIDAD ASOCIADA A LA BAJA RESERVA OVÁRICA Y LA INSUFICIENCIA OVÁRICA PREMATURA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Loida Pamplona Bueno

Licenciada en Medicina y especialista en Obstetricia y Ginecología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Facultad de Medicina - Universidad de Valencia

Solicitud de depósito realizada en abril de 2017

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Facultad de Medicina - Universidad de Valencia

**ACTIVACIÓN FOLICULAR MEDIANTE
FRAGMENTACIÓN DE LA CORTEZA OVÁRICA
COMO TRATAMIENTO DE LA ESTERILIDAD
ASOCIADA A LA BAJA RESERVA OVÁRICA Y LA
INSUFICIENCIA OVÁRICA PREMATURA**

Tesis presentada por:

Loida Pamplona Bueno

Licenciada en Medicina - especialista en Obstetricia y Ginecología

Tesis dirigida por:

Prof. César Díaz García

Prof. Antonio Pellicer Martínez

AGRADECIMIENTOS

César, gracias por confiar en mí cuando apenas sabías que también venía de la Autónoma de Madrid y poco más. Comencé la residencia con cierta extrañeza y desorientación, como todo el mundo; pero tú no viste lo que era sino lo que podía llegar a ser. Me prometiste que aprendería a investigar y que terminaría la tesis antes de finalizar la residencia... ¿puede haber objetivo más ambicioso? Durante estos cuatro años has sido fiel a tus palabras, y no solo me has enseñado a investigar, sino a INVESTIGAR con mayúsculas. Además has puesto todo tu esfuerzo en sacar adelante este proyecto de tal forma que sin tu dedicación hubiera sido imposible para mí si quiera acercarme a la meta. Muchas personas tienen buenas ideas, pero solo unas pocas saben “bajarlas a la tierra” y conseguir que pasen del plano de la imaginación a la realidad. Tú eres una de esas personas. Admiro tu capacidad resolutive, dinamismo, energía y calidad humana. Gracias por hacer malabares con el tiempo para estar disponible a cualquier hora y cualquier día del año. Ha sido un privilegio poder trabajar a tu lado y empaparme de tu excelencia. Un día me dijiste que la cualidad que más apreciabas en un ser humano es la lealtad; sabes que tienes la mía para siempre.

Antonio, una de las primeras cosas que recuerdo de ti es que recién nos presentamos las cinco residentes que comenzábamos gine en La Fe en mayo de 2013, nos reuniste y nos asignaste un proyecto de investigación a cada una. Y así llegó a mis manos el que hoy cristaliza en esta tesis. Tu visión y experiencia han sido fundamentales para tomar las decisiones importantes que han marcado su rumbo. Gracias por estar cerca aunque estés muy arriba.

Sonia, coincidiendo contigo en este proyecto he podido descubrir a una persona tremendamente inteligente y a la vez cercana y amable. Brillas con luz propia. Gracias por iluminar esta tesis con la profundidad de tu conocimiento sobre el tema. Gracias por mostrarme la importancia de las ciencias básicas.

Jessica, eres una excelente profesional y es inspirador trabajar a tu lado. Gracias por explicarme los entresijos de la reproducción asistida de forma comprensible. Gracias por escucharme, darme consejos, apoyarme y colaborar con las labores del día a día del estudio. Marta, gracias por ponerte al día rápido desde “pequeñita” y manejarte con soltura en mi ausencia. Tu colaboración ha sido esencial para mí.

A todo el equipo de la Unidad de Reproducción Asistida de La Fe, os debo un gran agradecimiento por permitir que este estudio haya tenido lugar en vuestra “casa”. Habéis tenido mucha paciencia conmigo hasta que el estudio echó a andar y habéis colaborado altruistamente en lo que he ido necesitando. Sé que soportáis una gran carga laboral y os agradezco por asumir todos los “extras” que os he generado.

A cada una de las pacientes que ha participado en el estudio. Pronto dejabais de ser un número para convertirnos en personas con nombre propio, miedos e ilusiones que traté de conocer un poco mejor. Al compartir la felicidad de las que conseguisteis hacer realidad vuestro sueño, supe que todo el esfuerzo valía la pena. Al resto, espero por lo menos haber aliviado en parte vuestro sufrimiento. Vosotras fuisteis la razón por la que no tiré la toalla aún en los momentos en los que estuve tentada a hacerlo. Gracias por esforzaros en acudir a los controles y pinchazos sin falta. Gracias por darme vuestra confianza.

A mi guardia, tanto mis mayores como mis pequeñas. Pablo, Blanca e Irene, os admiro tanto como os quiero. Gracias por darme lo mejor de vosotros y enseñarme sin medida. Farida y Sheila, gracias por tener paciencia conmigo y darme tanto cariño.

Vero, Laura, Cris y Ana: no creo en las casualidades; sé que aquel 16 de abril de 2013 fue providencial porque si hubiera podido escoger a mis co-R uno por uno, no habría elegido mejor. Sois como hermanas para mí. Gracias por crear buen rollo, estar siempre dispuestas a ceder por el bien común, ser un refugio en el que poder desahogarse, cuidar de los detalles... Hemos vivido tantas cosas juntas... Ojalá

podamos seguir unidas como una estrella de cinco puntas aunque la vida nos lleve lejos.

A mi familia de Lliria, porque cada sábado conseguís crear un paréntesis en el tiempo en el que poder descansar y me hacéis sentir en casa. Os interesáis genuinamente por la marcha de la tesis y el trabajo, y nunca faltan vuestras palabras de ánimo. Es reconfortante saber que este proyecto está presente en las oraciones de tanta gente querida.

Yaya Séfora, eres la sabiduría encarnada en una mujer. Tu vida es ejemplar para mí y tus consejos son perlas que atesoraré para siempre. Yaya Paqui, eres una mujer valiente, una pionera en un país que nunca estuvo a tu altura. Gracias por hacernos el camino más fácil a las mujeres de hoy en día, ojalá nunca nos falte tu coraje.

Jorge y Blanca, desde pequeña me decíais que la mejor herencia que me podías dejar era una buena educación... pero me habéis dejado muchísimo más que eso, tanto que no se puede expresar con palabras. Papi, de ti he aprendido el valor del esfuerzo y del servicio al prójimo, que lo normal es ser excelente y conformarse con menos no es una opción, que la medicina es una forma de vida y que te atrapa hasta convertirse en tu *hobby* a parte de tu trabajo. Tú recorriste este camino en condiciones mucho más duras que yo. Gracias por ser mi referente. Gracias por tener tu despacho siempre abierto y dejar a medias tu trabajo (por urgente que fuera) para solucionar mis problemas (por pequeños que fueran) sin emitir ni un solo reproche. Mami, tú me has contagiado la pasión por nuestro trabajo. Desde pequeña me encantaba escuchar los casos que habías tenido en la guardia y mi mayor premio era que me llevaras contigo al hospital. Esos ratitos juntas en el paritorio del San Carlos no tienen precio. De ti he aprendido a tratar a las mujeres, pero, sobre todo, me has transmitido tu sentido común (que es el menos común de los sentidos, y quizá el más necesario en obstetricia). Te estaré eternamente agradecida porque sé que elegiste limitar tu carrera profesional para dedicarte en cuerpo y alma a criarme, y lo hiciste con amor.

Dámaris, mi *sister* querida, gracias por creer en mí más que yo misma. Siempre has tenido palabras sinceras de admiración y ánimo listas para levantarme. Gracias por aportarme arte en medio de tanta ciencia.

A mi segunda familia: Jesús, Rosi, Josué, Vanina, Alberto y Anduriña. Gracias por adoptarme como hermana pequeña. Gracias por quererme y cuidarme tanto. A mis sobrinos Elías, Daniel, Emma y Andrés. Sois una fuente inagotable de sorpresas. Gracias por vuestros audios y dibujos.

Samuel, sin ti no soy nada. Mis éxitos lo son porque tú los has hecho posibles. Me has proporcionado el equilibrio y la chispa. El equilibrio de desconectar cuando percibías que ya había trabajado demasiado, y de reconectarme cuando a mí me faltaban las fuerzas. La chispa de disfrutar de cada paso del camino, saltar en los charcos como críos, reírnos juntos de los resbalones, echar carreras cuando vienen cuestas y planear nuevas cimas que conquistar. Es genial haber podido recorrer nuestro camino académico de la mano aunque pertenezcamos a disciplinas tan distintas. Desde selectividad, la universidad, la especialización y finalmente el doctorado... así que hasta que tú no presentes tu tesis, yo no habré terminado la mía. Espero ser tu sustento idóneo tal y como tú lo has sido para mí.

Sin embargo, mi agradecimiento más profundo no es para ningún ser humano. Un sabio dijo que hay dos maneras de vivir la vida: una como si nada es un milagro, la otra como si todo es un milagro. Me adhiero a esta última, y no puedo hacer otra cosa que asombrarme de la providencia divina. Agradezco a Dios porque esta tesis, y en definitiva, mi vida, es un milagro.

“Aprende del ayer, vive para hoy y ten esperanza en el mañana. Lo importante es no dejar de plantearse cuestiones”.

- Albert Einstein.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	7
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	13
INTRODUCCIÓN	14
MARCO TEÓRICO	14
DESARROLLO FOLICULAR	14
Mecanismos moleculares de control del reclutamiento folicular	14
Siguiendo pasos en el desarrollo folicular	16
LA RESERVA OVÁRICA	19
Edad.....	19
Hormona antimülleriana.....	21
Recuento de folículos antrales	22
ENVEJECIMIENTO OVÁRICO PREMATURO	24
Definiciones e historia natural.....	24
Etiología.....	26
Fisiopatología.....	26
Prevención.....	27
Pronóstico reproductivo.....	28
LA RESPUESTA OVÁRICA	28
ESTRATEGIAS DIRIGIDAS A MEJORAR EL MANEJO DE LA POBRE	
RESPUESTA	30
Identificación a priori de la baja pobre respondedora.....	31
Modificaciones de los protocolos de estimulación.....	31
Fragmentación ovárica para mejorar el número de folículos	
antrales.....	32
ACTIVACIÓN DE FOLÍCULOS PRIMORDIALES MEDIANTE	
FRAGMENTACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO, INHIBICIÓN DE PTEN Y	
ACTIVACIÓN DE AKT - PROCEDIMIENTO IVA (<i>IN VITRO</i>	
<i>ACTIVATION</i>)	33
Activación in vitro de folículos primordiales durmientes.	
Inhibidores de PTEN y estimuladores de Akt.	33
Vía de señalización intracelular Salvador / Warts / Hippo.....	34

Aplicación in vitro	36
Experiencia en modelos animales	38
Aplicación en pacientes.....	39
ACTIVACIÓN DE FOLÍCULOS PRIMORDIALES MEDIANTE	
PROCEDIMIENTO IVA MODIFICADO - OFFA (<i>OVARIAN</i>	
<i>FRAGMENTATION FOR FOLLICULAR ACTIVATION</i>)	42
HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	46
Objetivo primario	46
Objetivos secundarios	46
INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN	47
METODOLOGÍA	49
Fase 1: Ensayo aleatorizado, controlado, ciego único en bajas	
respondedoras (<i>Follicular Activation in Previously Diagnosed</i>	
<i>Poor Responders - FAPPOR</i>)	50
Diseño de la fase 1	50
Población de estudio	51
Criterios de inclusión (debe cumplirse uno)	51
Criterios de exclusión (la presencia de uno excluye la	
participación)	51
Estimación del tamaño muestral	52
Valoración inicial	53
Aleatorización	53
Descripción de la técnica quirúrgica	54
Seguimiento	57
Recuento de folículos antrales	57
Determinaciones hormonales	58
Proceso de fecundación in vitro	59
Definición de las variables resultado	61
Análisis estadístico.....	64
Autorización y registro.....	65
Fase 2: Estudio no aleatorizado no controlado en sub-población	
POI	66
Diseño de la fase 2	66
Población de estudio	66
Criterios de inclusión (debe cumplirse uno)	67
Criterios de exclusión (la presencia de uno excluye la	
participación)	67

Estimación del tamaño muestral	68
Valoración inicial	69
Descripción de la técnica quirúrgica	69
Seguimiento	69
Proceso de fecundación in vitro	69
Definición de nuevas variables resultado incluidas en la Fase 2.	70
RESULTADOS	71
Fase 1. Estudio FAPPOR	71
Reclutamiento de pacientes	71
Aleatorización	72
Análisis intermedio	74
Características basales de las pacientes	75
Variables relacionadas con la cirugía.....	77
Resultados del seguimiento	78
Resultados reproductivos	79
Fase 2. Valoración del efecto OFFA en POI	82
Características basales de las pacientes	85
Variables relacionadas con la cirugía.....	86
Resultados del seguimiento	88
Resultados reproductivos	89
DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	97
APÉNDICE DOCUMENTAL	107

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **AFC:** recuento de folículos antrales (*antral follicular count*)
- **AMH:** hormona antimülleriana (*anti-müllerian hormone*)
- **DGP:** diagnóstico genético preimplantacional
- **DIAPH:** *diaphanous-related formin*
- **eCDR:** cuaderno electrónico de registro de datos
- **ESHRE:** sociedad europea de reproducción humana y embriología (*European Society of Human Reproduction and Embriology*)
- **FAPPOR:** activación folicular en pobres respondedoras previamente diagnosticadas (*follicular activation in previously diagnosed poor responders*)
- **FIV:** fecundación in vitro
- **FSH:** hormona foliculoestimulante (*follicle-stimulating hormone*)
- **GnRH:** hormona liberadora de gonadotrofinas (*gonadotrophin releasing hormone*)
- **hCG:** gonadotrofina coriónica humana (*human corionic gonadotrophin*)
- **ICSI:** inyección intracitoplásmica (*intracytoplasmic sperm injection*)
- **IMC:** índice de masa corporal
- **IVA:** activación in vitro (*in vitro activation*)
- **MII:** metafase II

- **mmHg:** milímetros de mercurio
- **OC:** ovario contralateral
- **OFFA:** fragmentación ovárica para la activación folicular
(*ovarian fragmentation for follicular activation*)
- **OInt:** ovario-intervención
- **OPOI:** insuficiencia ovárica prematura oculta (*occult premature ovarian insufficiency*)
- **PIP3:** 3,4,5 fosfoinositol fosfato
- **POI:** insuficiencia ovárica prematura (*premature ovarian insufficiency*)
- **POR:** pobre respuesta ovárica (*poor ovarian response*)
- **POS:** senectud ovárica prematura (*premature ovarian senescence*)
- **PTEN:** *phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*
- **REM:** recuperación de espermatozoides móviles
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **UI:** unidades internacionales
- **VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial
(*vasculoendotelial growth factor*)
- **YAP:** *yes-associated protein*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE LA FOLICULOGÉNESIS	18
FIGURA 2: CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE POI DE LA ESHRE.....	25
FIGURA 3: CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE POR DE LA ESHRE	30
FIGURA 4: ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE LA RUTA HIPPO	36
FIGURA 5: DISEÑO DEL ESTUDIO.....	49
FIGURA 6: PASOS QUIRÚRGICOS	56
FIGURA 7: PROCEDIMIENTO DE ACTIVACIÓN FOLICULAR.....	60
FIGURA 8: DIAGRAMA DE FLUJO DE PACIENTES DEL ESTUDIO FAPPOR .	74

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS BASALES DE LAS PACIENTES (FASE 1)	76
TABLA 2: CIRUGÍA (FASE 1).....	77
TABLA 3: RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO (FASE 1).....	79
TABLA 4: RESULTADOS REPRODUCTIVOS (FASE 1)	81
TABLA 5: CARACTERÍSTICAS BASALES DE LAS PACIENTES (FASE 2)	85
TABLA 6: CIRUGÍA (FASE 2).....	87
TABLA 7: RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO (FASE 2).....	89
TABLA 8: RESULTADOS REPRODUCTIVOS (FASE 2)	90

INTRODUCCIÓN

MARCO TEÓRICO

“Existe una estrecha relación entre el pool de reserva folicular, la respuesta ovárica a la estimulación y la extensión de la vida reproductiva”.

Ferrareti, La Marca, Fauser et al (1)

DESARROLLO FOLICULAR

Las mujeres nacen con un *pool* finito de folículos ováricos que disminuye drásticamente durante la vida intrauterina desde un pico de unos 7 millones hasta 1 millón aproximadamente al nacimiento. Durante la infancia el descenso continua, de tal forma que en la edad de menarquia persisten unos 400.000 folículos. Finalmente en la menopausia solo quedan menos de 1.000 folículos en los ovarios (2).

Mecanismos moleculares de control del reclutamiento folicular

Cuando llega la menarquia, los ovarios van a reclutar mensualmente miles de folículos en oleadas (3). Los folículos primordiales están constituidos por un ovocito rodeado de una

monocapa de células fusiformes. Son microscópicos, con un tamaño menor de 0,05 milímetros. Se desconoce el mecanismo exacto por el que son reclutados y comienzan a madurar en un ciclo ovárico concreto ya que no son sensibles a los estímulos hormonales. Se sabe que ciertos factores intraováricos juegan un papel en esta activación, incluyendo neurotrofinas, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la proteína morfogenética 4, BMP7, el factor inhibidor de la leucemia, el factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento queratinocítico (4). Para que el ovario funcione correctamente, tan importantes son los estímulos promotores como los inhibidores. Si los mecanismos de supresión del crecimiento folicular fallaran, la reserva ovárica se agotaría prematuramente dando lugar a esterilidad (5). Estudios recientes han demostrado que dos cascadas de señalización intracelular son fundamentales para la supresión del crecimiento de los folículos primordiales. Se trata de la vía PI3-quinasa/Akt y la vía del sistema p27-Cdk. Ambas parecen funcionar de manera independiente a nivel ovárico (6).

Las células de la granulosa producen el ligando Kit, que actúa sobre el Kit intraovocitario y activa a la PI3-quinasa, encargada de producir el fosfolípido 3,4,5 fosfoinositol fosfato (PIP3). Éste a su vez activa a la proteincinasa PDK1, que fosforila a la quinasa AKT, que actúa sobre un factor de transcripción llamado FOXO3 inactivándolo, con lo que se impide la función de genes implicados en el inicio del crecimiento folicular (6).

Por otro lado, la PI3-quinasa también se puede activar gracias a la acción de la fosfatasa PTEN, un conocido gen de supresión tumoral (7).

En cuanto al p27-Cdk, se trata de un sistema regulador del ciclo celular. Los complejos Cdk promueven la transición entre las distintas fases del ciclo celular. La proteína p27 es un inhibidor del Cdk-2. Niveles altos de p27, y por consiguiente escasa actividad Cdk, son característicos de las células en estado quiescente, mientras que cuando disminuyen los niveles de p27 las células pueden volver a la fase S del ciclo celular (6). Se han detectado niveles elevados de p27 en los ovocitos de folículos primordiales, primarios y secundarios (8).

En definitiva, sabemos que el control de la activación de los folículos primordiales depende de una compleja interacción entre los ovocitos y las células somáticas que los rodean de forma paracrina. Pero queda mucho por comprender sobre cómo se articulan las interacciones a nivel intracelular y cómo se gestiona el delicado equilibrio entre estímulos activadores y supresores del crecimiento (9).

Siguientes pasos en el desarrollo folicular

En su desarrollo, los folículos primordiales dan lugar a folículos primarios (monocapa cúbica) y secundarios

(multicapa cúbica). Éstos tienen un diámetro entre 0,05 y 2 mm y fabrican la hormona antimülleriana (AMH) en sus células de la granulosa. La AMH actúa inhibiendo el reclutamiento de los folículos primordiales y atenuando el efecto de la FSH sobre los folículos en crecimiento (10). Tras unos seis meses de crecimiento, algunos de los folículos consiguen alcanzar un tamaño mayor a 2 mm y se genera en su seno una cavidad donde se acumula el líquido folicular (11). Son los folículos antrales. Son altamente sensibles a FSH, que es la hormona responsable de seleccionar el folículo en el que proliferarán más las células de la granulosa y se acumulará más líquido celular, dando lugar al folículo de Graaf que se encuentra preparado para la ovulación. La FSH induce la síntesis de inhibina folicular, que actúa sinérgicamente con los estrógenos sobre el feedback negativo hipofisario. Así que la inhibina y los estrógenos secretados por el folículo dominante producen una disminución de las concentraciones circulantes de FSH hasta que resultan insuficientes para mantener el desarrollo de aquellos folículos con menor capacidad de respuesta a la FSH conllevando su atresia (12). La FSH también induce la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa del folículo periovulatorio. El mRNA que codifica al receptor de la LH se detecta en las células de la granulosa de todos los folículos antrales, pero alcanza su máxima expresión en el folículo periovulatorio, a diferencia del mRNA del receptor de FSH cuyos niveles van disminuyendo según aumenta el tamaño

del folículo. Por tanto, en los últimos estadios de maduración la LH asume el papel de promover la maduración folicular, gracias a lo cual el folículo dominante puede completar su maduración a pesar de que los niveles de FSH estén en descenso, y simultáneamente se prepara para responder al estímulo ovulatorio de la LH (5). Esta última fase del desarrollo dura unos 14 días.

Por tanto, en condiciones naturales solo uno un folículo consigue dominar y alcanzar la ovulación. Todo el resto de folículos reclutados en esa oleada degenera en alguna de las etapas del proceso madurativo, generalmente mucho antes de hacerse sensibles a gonadotrofinas.

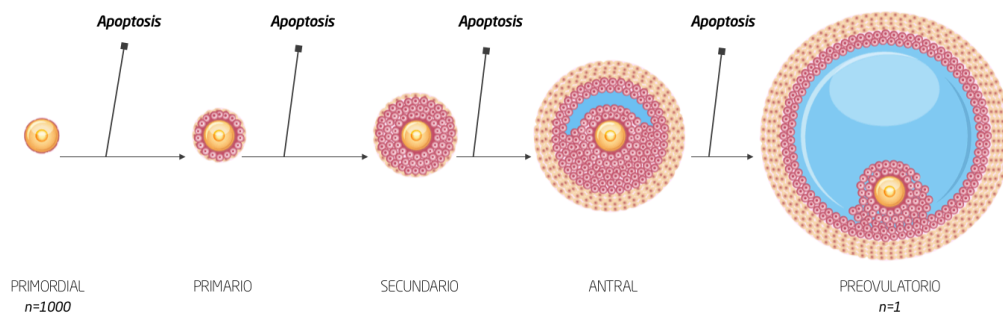


Figura 1: esquema de la foliculogénesis

La “edad ovárica” se refleja en la “reserva ovárica total” de una mujer, que está compuesta principalmente por folículos primordiales durmientes, quiescentes en estadios primitivos del desarrollo. Los folículos en crecimiento son un componente ínfimo de la reserva ovárica total.

El concepto de la reserva ovárica hace referencia a la cantidad y calidad de folículos primordiales que quedan en el ovario en un momento determinado (13). No existe ninguna herramienta clínica capaz de determinar la verdadera reserva ovárica. Los folículos primarios, secundarios y antrales pequeños producen AMH (14); los folículos antrales se pueden observar mediante ecografía (15). Pero ¿de qué manera podríamos aproximarnos a la cuantificación de los folículos primordiales? Ni siquiera una biopsia ovárica sería válida porque éstos no se distribuyen de forma homogénea en la corteza ovárica (13).

La estimación de la reserva ovárica se basa en varios parámetros indirectos, de los que destacan tres:

Edad

La edad siempre ha mostrado ser el más importante predictor de tanto la cantidad como la calidad de la reserva ovárica (16). La fertilidad natural desciende desde los 30 años, a un ritmo mayor a partir de los 35 años, y llegando a la esterilidad a una edad media de 41 años (17). El efecto deletéreo de la edad sobre la posibilidad de concepción espontánea se ha observado en grupos poblacionales que no utilizan métodos de control de

la fertilidad, siendo la edad media a la que estas mujeres dan a luz a su último hijo de unos 40-41 años en todos los grupos, lo que sugiere que existe un patrón universal de pérdida de la fertilidad (18). Sin embargo hay una gran variabilidad interindividual en este proceso de envejecimiento reproductivo, existiendo mujeres de edad relativamente joven con una densidad folicular claramente disminuida, así como mujeres alrededor de la edad a la cual la fertilidad natural se pierde pero que mantienen una densidad folicular propia de edades más tempranas. En condiciones naturales, se ha estimado que el 75% de mujeres que buscan gestación a los 30 años conseguirán tener un hijo en un plazo de un año, siendo este porcentaje del 66% a los 35 años y del 44% a los 40 años. Si ampliamos el plazo a 4 años, la tasa de éxito será del 91%, 84% y 64% respectivamente. Si durante este plazo de tiempo las mujeres que no han concebido de forma natural se someten a técnicas de reproducción asistida, se compensaría sólo la mitad de los nacimientos perdidos por posponer la búsqueda de embarazo de los 30 a los 35 años, y menos del 30% de los perdidos por posponer la búsqueda de los 35 a los 40 años. Por tanto, las técnicas de reproducción asistida no alcanzan a compensar los nacimientos “perdidos” por el declive natural de la fertilidad después de los 35 años (19).

Debe su nombre a que es responsable de la regresión de los conductos müllerianos en los varones durante la vida fetal. En las mujeres es producida por las células de la granulosa de los folículos en crecimiento (primarios, secundarios y antrales pequeños) durante toda la vida reproductiva (14). Los niveles de AMH disminuyen progresivamente con la edad hasta hacerse indetectable en la menopausia. Su variabilidad intraciclo e interciclo es pequeña (10). Se ha calculado una desviación de +3% a -19% de los niveles tanto intra como interciclo (20, 21), lo que se considera suficientemente bajo como para permitir su determinación en cualquier momento del ciclo (22). La relación entre los niveles de AMH y la respuesta a la estimulación ovárica controlada así como el número de ovocitos obtenidos tras fecundación in vitro está ampliamente demostrada (23). Sin embargo no puede decirse lo mismo sobre los aspectos cualitativos de la reproducción asistida. Tras cierta controversia por los resultados dispares obtenidos en distintos estudios, hoy en día se considera que la AMH no es un marcador adecuado de calidad embrionaria porque no ha demostrado estar correlacionada de forma consistente con la morfología embrionaria ni con la tasa de aneuploidía embrionaria (24). Algunos estudios han sugerido que los niveles de AMH son útiles como valor predictivo de recién nacido vivo tras ajustar por edad (25, 26). Sin embargo,

cuando se ha introducido esta variable en modelos de regresión logística, se ha observado poca (27) o ninguna (28) mejoría de las áreas bajo la curva de dichos modelos.

Recuento de folículos antrales

Se consideran folículos antrales aquellos que miden entre 2 y 10 mm, siendo el tamaño del folículo la media de sus dos diámetros mayores. Se suman los folículos antrales observados en ambos ovarios mediante la ecografía transvaginal. Hay que tener en cuenta que en cualquier estadio de maduración se van quedando atrás un gran número de folículos atrésicos; también en el estadio antral. Debido a ello, al cuantificar los folículos mayores a 2 mm por métodos de imagen podemos estar incluyendo algunos en estadio precoz/avanzado de atresia sin poder distinguirlos de los que son viables. Por tanto, el recuento de folículos antrales puede sobrestimar la reserva ovárica real. Aun teniendo en cuenta esta limitación, clásicamente demostró ser el método que mejor reflejaba la reserva ovárica de forma individual (13). Hoy en día sabemos que la AMH ofrece el mismo nivel de exactitud y valor clínico para la predicción de la respuesta ovárica (29).

En el pasado se han utilizado otros métodos tanto hormonales (FSH basal, estradiol basal, test dinámicos como el de

clomifeno) como de imagen (volumen ovárico, flujo vascular ovárico) e incluso histológicos (biopsia ovárica) habiéndose descartado hoy en día por tener menos sensibilidad y especificidad así como una mayor variabilidad en sus determinaciones (13).

Por tanto, en la práctica clínica lo que somos capaces de valorar no es más que un reflejo de la reserva ovárica total. La relación entre los resultados de los métodos empleados y la verdadera reserva ovárica es desconocida. Probablemente es moderada o buena para aspectos cuantitativos pero mala para valorar aspectos cualitativos (1). A pesar de estas limitaciones, la reserva ovárica es un concepto importante en reproducción asistida ya que es el principal determinante de la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas (30). Una baja reserva ovárica suele conllevar una pobre respuesta, y por consiguiente, una menor tasa de gestación y de recién nacido vivo, que se estiman alrededor del 9% y 6% respectivamente para este tipo de pacientes (31), en comparación con el 35% y 28% reportados de forma global (32, 33) (*datos por ciclo iniciado*).

Definiciones e historia natural

De forma fisiológica, la función ovárica disminuye paulatinamente hasta su cese con la menopausia a una edad media de 51 años. Sin embargo, en algunas mujeres este órgano envejece de forma prematura, es decir, antes de los 40 años. Aproximadamente en el 10% de las mujeres ocurre una senectud prematura de los ovarios (POS, por sus siglas en inglés) (34).

En algunos casos el cese de la función ovárica se establece de forma brusca. En otros, no se recupera tras un periodo de uso de anovulatorios o tras una gestación (35). Pero en la mayoría de casos hay un periodo prodrómico más o menos duradero de fallo parcial que se considera un estadio precoz de insuficiencia ovárica y que se ha dado en llamar “insuficiencia ovárica prematura oculta” (OPOI) (36). Clínicamente puede manifestarse con oligomenorrea o esterilidad. Al realizar una evaluación médica encontramos signos de baja reserva ovárica. Los niveles de FSH pueden no estar elevados o solo hacerlo de forma puntual, por lo que no se recomienda excluir el diagnóstico de OPOI ante una FSH normal (35).

La evolución natural es llegar a una insuficiencia ovárica total, pero los estudios realizados no han podido determinar

biomarcadores ni signos o síntomas que anticipen este acontecimiento. Por tanto, actualmente se desconoce cómo predecir el periodo de tiempo en el que el fallo ovárico se instaurará de forma completa, pudiendo ser de unos pocos meses a varios años (37).

Solo el 10% de las mujeres con envejecimiento prematuro de los ovarios presenta un fallo ovárico completo con la tríada característica de amenorrea, hipergonadotropismo e hipoestrogenismo antes de los 40 años. A esta circunstancia se la conoce con el nombre de insuficiencia ovárica prematura (POI). A lo largo de la historia ha recibido otros nombres menos apropiados como fallo ovárico prematuro o menopausia precoz. La guía de la ESHRE establece el criterio diagnóstico de oligo/amenorrea durante al menos cuatro meses junto con una FSH mayor de 25 UI/L en dos ocasiones separadas por un periodo de tiempo mayor a 4 semanas en una mujer menor de 40 años (38).

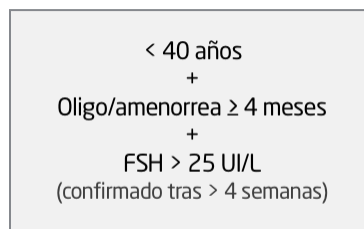


Figura 2: criterios diagnósticos de POI de la ESHRE

Etiología

La causa del POI es desconocida en el 90% de casos (39). En ocasiones la insuficiencia ovárica puede estar enmarcada dentro de un contexto sindrómico. Destacan las alteraciones asociadas al X frágil cuando la premutación del gen FMR1 está presente, es decir cuando existen entre 55 y 200 copias del triplete CGG en este gen (40). Aproximadamente el 2% de las mujeres con POI aislada y el 14% de las que además tienen historia familiar positiva son portadoras de dicha premutación, lo que hay que recordar que confiere un riesgo elevado de tener un hijo con síndrome de X frágil (41). Otros síndromes asociados son la galactosemia, la anemia de Fanconi, la hiperplasia adrenal congénita, el síndrome poliglandular autoinmune tipo 1 y 2, la ataxia-telangiectasia y un largo etcétera (39). Finalmente, se conoce que existe una predisposición familiar siendo éste el factor de riesgo más importante, ya que hasta el 15% de pacientes con POI tiene un familiar de primer grado afecto (42).

Fisiopatología

En cuanto a los mecanismos por los que ocurre la insuficiencia ovárica prematura, ésta puede ser debida a una disfunción folicular o bien a una depleción folicular precoz (43). La

disfunción folicular ocurre por alteraciones autoinmunes (ooforitis linfocítica, responsable de 4% de los casos de POI), defectos en la señalización intracelular (mutación del receptor de FSH o de LH), deficiencias enzimáticas (deficiencia de aromatasas) o luteinización precoz de los folículos antrales. La depleción folicular precoz ocurre cuando hay un número inicial de folículos insuficiente (documentada por ejemplo en el síndrome de blefarofimosis, ptosis y epicantus inverso) o bien cuando el ritmo de depleción está acelerado (en el síndrome de Turner o tras la exposición ambiental a ciertos tóxicos como el 2-bromopropano) (39).

Prevención

Algunos autores han propuesto desarrollar programas de screening que permitan detectar los casos de POI en estadios precoces (fase oculta) en población de riesgo (34). Hoy por hoy, solo se ha establecido esta indicación en la práctica clínica para la baja reserva asociada a la endometriosis (44). Así que nos encontramos con la situación de que en la inmensa mayoría de mujeres no se descubre el OPOI hasta que consultan por infertilidad (34).

Se estima que el 4,4% de estas pacientes podrá concebir de forma espontánea gracias a la actividad ovárica residual que aún conservan (45). El resto pueden optar a un tratamiento de reproducción asistida pero con pocas perspectivas de éxito debido a su baja reserva ovárica (46). La tasa de recién nacido vivo oscila entre el 6 al 11% por ciclo iniciado, en comparación con el 30% en pacientes con una reserva ovárica normal (32, 33). Por tanto, en muchas de estas pacientes, la única alternativa para cumplir sus deseos reproductivos acaba siendo la ovodonación.

LA RESPUESTA OVÁRICA

La pobre respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas (POR, por sus siglas en inglés) hace referencia a la respuesta insuficiente a los protocolos de tratamiento habituales durante la hiperestimulación ovárica controlada con gonadotrofinas en el contexto de un tratamiento de reproducción asistida.

La incidencia de pobre respuesta ovárica en los tratamientos de FIV se estima en torno al 10 - 25% (47). El amplio rango de prevalencia descrito en la literatura se explica por la ausencia

de consenso en cuanto a los criterios clínicos específicos que se han utilizado para definir la pobre respuesta. Han sido publicadas más de veinte formas diferentes de catalogarla (1). Ante la disparidad de criterios existente, la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) estableció en 2011 una definición de consenso para la pobre respuesta (1):

- Dos episodios de pobre respuesta ovárica (≤ 3 ovocitos recuperados en un esquema convencional con al menos 150 UI de gonadotrofinas al día) en ausencia de edad avanzada o test de baja reserva ovárica.
- Al menos dos de los siguientes criterios: edad ≥ 40 años o cualquier otro factor de riesgo de pobre respuesta ovárica, ciclo previo de FIV con ≤ 3 ovocitos (siguiendo un protocolo de estimulación convencional), test anómalo de reserva ovárica (contaje de folículos antrales $< 5 - 7$ y/o AMH $< 0,5 - 1,1$ ng/mL).

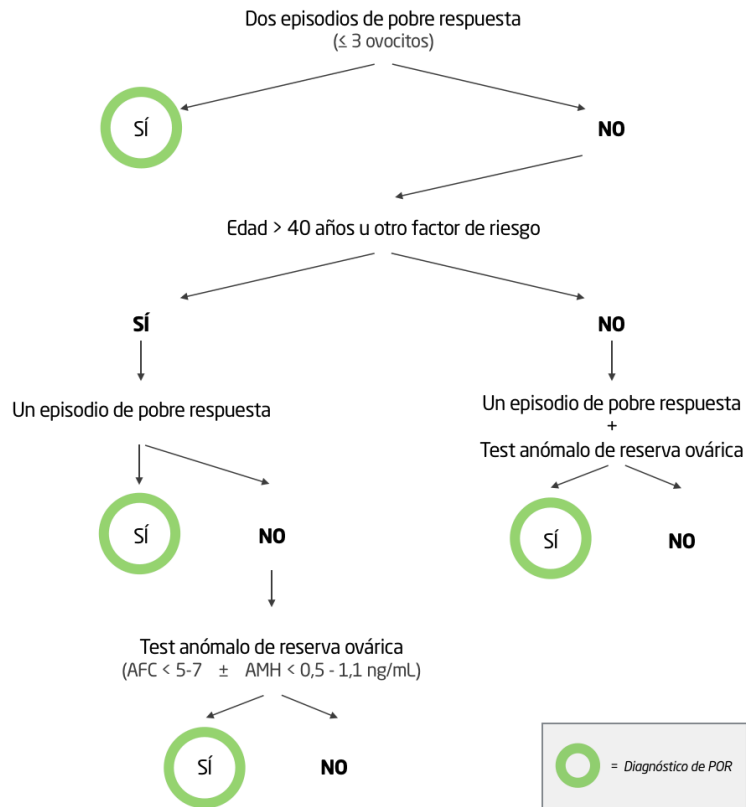


Figura 3: criterios diagnósticos de POR de la ESHRE

ESTRATEGIAS DIRIGIDAS A MEJORAR EL MANEJO DE LA POBRE RESPUESTA

Clásicamente los esfuerzos para conseguir un mejor manejo de las bajas respondedoras se han enfocado a la identificación a priori de las bajas respondedoras y a la modificación de los protocolos ya existentes.

Identificación a priori de la baja pobre respondedora

La identificación a priori de las bajas respondedoras no ha demostrado mejorar los resultados clínicos de las estimulaciones ováricas hoy por hoy (48). Idealmente tendría que determinar en qué casos la probabilidad de gestación es mínima para poderlos orientar hacia un acúmulo de ovocitos, de embriones o bien la ovodonación. Sin embargo, ningún test de reserva ovárica ha demostrado ser útil para predecir la probabilidad de gestación. Solo algunos de ellos (edad, AMH y recuento de folículos antrales) predicen de forma bastante precisa el riesgo de pobre respuesta ovárica (13).

Modificaciones de los protocolos de estimulación

Desde el inicio de la aplicación de las TRA se han propuesto múltiples protocolos para el manejo de las pacientes con pobre respuesta, obteniéndose resultados muy dispares en los estudios publicados y siendo muy complejo extraer conclusiones de los mismos. Se ha valorado el aumento de la dosis de gonadotrofinas empleadas (49, 50), el uso de FSH recombinante en lugar de urinaria purificada (51), el uso de FSH en fase lútea (52), modificaciones en los protocolos de desensibilización hipofisaria (53), y el priming folicular o pre-tratamiento con estrógenos, anticonceptivos orales

combinados o andrógenos (54, 55). La realidad es que ninguna de estas intervenciones ha demostrado su eficacia de forma contundente para aumentar la tasa de gestación en el subgrupo de pacientes pobres respondedoras.

Fragmentación ovárica para mejorar el número de folículos antrales

El grupo de trabajo de Hsueh y Kawamura ha descrito recientemente una técnica novedosa ya que supone un cambio en el enfoque del problema. Su objetivo son los folículos durmientes que pueden persistir en el ovario incluso después de la menopausia. Tratan de activarlos mediante varios estímulos para conseguir que se desarrollen y lleguen a dar lugar a folículos antrales susceptibles de ser estimulados con gonatropinas (56). Se basan la observación de que ciertos procedimientos utilizados en reproducción asistida emplean la ruptura de la corteza ovárica buscando inducir el crecimiento folicular mediante la alteración de las tensiones mecánicas. Por ejemplo, la resección en cuña y el drilling ovárico han demostrado aumentar el crecimiento folicular en pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos (57, 58). En preservación de la fertilidad, la corteza ovárica se suele fragmentar para mejorar su tolerancia a la congelación y el injerto, y al

reimplantar estos fragmentos se puede observar crecimiento folicular (59).

ACTIVACIÓN DE FOLÍCULOS PRIMORDIALES MEDIANTE FRAGMENTACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO, INHIBICIÓN DE PTEN Y ACTIVACIÓN DE AKT - PROCEDIMIENTO IVA (*IN VITRO ACTIVATION*)

Activación in vitro de folículos primordiales durmientes. Inhibidores de PTEN y estimuladores de Akt.

A pesar de que el mecanismo completo de activación folicular permanece sin descifrar, estudios realizados en ratones knockout, han demostrado que la delección específica en ovocitos del gen PTEN y Foxo3 (60, 61) promueve la activación y el crecimiento de todos los folículos primordiales. El gen PTEN codifica una enzima fosfatasa que regula negativamente la cascada de señalización PI3K-Akt-Foxo3. También se ha conseguido promover la activación de folículos primordiales durmientes empleando inhibidores de PTEN y/o activadores de Akt, tanto en ovarios murinos como humanos (56, 62). Dicha activación podría estar mediada a través de la inhibición de la proteína MST2, molécula implicada en la activación de la vía

Hippo (ver abajo) (63). Este tratamiento de activación in vitro (IVA) persigue activar los folículos primordiales durmientes que quedan en la corteza, pues son el principal componente de la reserva ovárica. Para ello se desarrolla un tratamiento de la corteza ya fragmentada durante 48 horas con la molécula inhibidora de PTEN Bpv(pic) y el estimulador de Akt 740YP.

Vía de señalización intracelular Salvador / Warts / Hippo

La coordinación de la proliferación y muerte celular es esencial para el mantenimiento del tamaño de los órganos y la homeostasis de los tejidos durante la vida postnatal. En mamíferos, la coordinación de ambos procesos es orquestada por vía de Salvador / Warts / Hippo (abreviada Hippo) (64). Esta vía de señalización consiste diferentes reguladores negativos que actúan en una cascada de quinasas que en última instancia antagoniza el coactivador transcripcional Yes Associated protein (YAP) y su PDZ-binding motif (TAZ) induciendo una supresión del crecimiento.

YAP es inactivado por una fosforilación mediada por la vía Hippo, lo que lo excluye del núcleo, mientras que la pérdida de la señalización Hippo promueve la acumulación de YAP en el núcleo y un aumento de su actividad. Una vez dentro del núcleo, la proteína YAP actúa de forma coordinada con los activadores transcripcionales TEAZ para desencadenar la

expresión de factores de crecimiento CCN e inhibidores de la apoptosis BIRC (baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing). Esto da lugar a un aumento de la proliferación y el crecimiento celular.

A diferencia de la mayoría de vías de señalización activadas por ligandos extracelulares, Hippo está regulada por una red de componentes relacionados con la adhesión, forma y polaridad celular (65). Estas características celulares están mediadas por cambios rápidos en la polimerización de la actina globular (forma G) a la actina filamentosa (forma F) que se inducen al fragmentar el tejido y que son los desencadenantes de la inhibición de la ruta Hippo, tal y como se muestra en la siguiente figura:

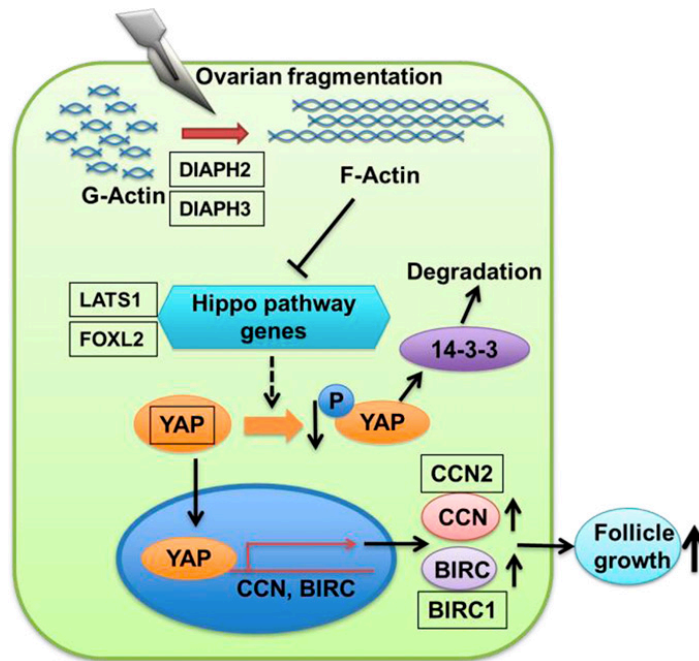


Figura 4: esquema del funcionamiento de la ruta Hippo (Kawamura et al., 2013)

Aplicación in vitro

Se ha investigado sobre ovarios murinos observándose que su fragmentación da lugar a un incremento transitorio de la polimerización de la G-actina a F-actina, se interrumpe la vía Hippo, disminuye la fosforilación de YAP, aumentan los niveles intranucleares de YAP y aumenta la expresión tanto de los factores de crecimiento CCN como de los inhibidores de la apoptosis BIRC (56).

El tratamiento de ovarios murinos con un péptido promotor de la polimerización actínica llamado jasplaquinolida, o con un componente del líquido folicular que se sabe que promueve la polimerización actínica llamado esfingosina-1-fosfato, aumenta la formación de F-actina, aumenta la concentración intranuclear de YAP y aumenta la expresión del factor de crecimiento CCN observándose finalmente crecimiento folicular (66). La importancia de YAP en el crecimiento folicular inducido por la fragmentación se ha demostrado mediante el uso de verteporfina, que es una pequeña molécula capaz de inhibir la interacción de YAP con los factores de transcripción TEAD (67).

En ovarios humanos se ha observado que, tras fragmentar tiras de corteza ovárica en pequeños cubos, se incrementan los niveles de CCN, lo que resalta el papel de estos factores de crecimiento en el desarrollo folicular (56).

Por último, destacar que se han llevado a cabo estudios genómicos y genéticos que apoyan el papel esencial de la vía de señalización Hippo y la polimerización actínica en la regulación del desarrollo folicular. En investigaciones realizadas sobre células de insectos se ha tratado de identificar genes capaces de interrumpir la vía Hippo utilizando un gen activado por el promotor de Ykri (el equivalente a YAP en los vertebrados). La mayoría de genes identificados están implicados en la polimerización de la actina. Se ha observado que su supresión da lugar a un incremento en la formación de

F-actina e interrumpe la vía Hippo (4). Tanto en ovarios murinos como humanos se ha observado la expresión de genes clave de la vía Hippo en folículos ováricos que se encontraban en diferentes estadios madurativos (56). Fallos en genes que codifican proteínas implicadas en esta vía se asocian a infertilidad en ratones así como a insuficiencia ovárica prematura, síndrome de ovario poliquístico y oncogénesis en pacientes humanas (4).

Experiencia en modelos animales

Utilizando el modelo del insecto *Drosophila*, se ha observado que la sobreexpresión de una forma activada de DIAPH (proteína relacionada con la polimerización de la actina) da lugar a un crecimiento excesivo de los discos imaginales de esta mosca. La disrupción de la vía Hippo mediante la polimerización actínica también está conservada en células HeLa humanas (68, 69).

En un modelo murino se llevó a cabo una intervención quirúrgica experimental para comprobar la hipótesis de que el daño sobre los ovarios promueve el crecimiento folicular. Se extirparon los ovarios de ratones jóvenes y se fragmentaron en tres trozos. Éstos fueron alotransplantados bajo la cápsula renal de animales adultos por cinco días. Se evidenció un gran incremento del tamaño de los injertos fragmentados respecto

a los ovarios intactos correspondientes (56). Este incremento del tamaño fue debido al fomento del desarrollo de los folículos a estadios antrales y preovulatorios. También se ha observado que al fragmentar ovarios de ratones de día 23 que contienen folículos antrales precoces o folículos más pequeños se promueve el desarrollo folicular. Estos hallazgos se han replicado en otros modelos como ratas, lo que sugiere que no se deben a cuestiones específicas de una sola especie (4).

Aplicación en pacientes

Tras caracterizar el funcionamiento de la vía Hippo in vitro, y comprobar su actividad en modelos animales, el siguiente paso natural era estudiar si la disrupción de la vía Hippo podía promover la activación y el crecimiento de folículos primordiales en el ser humano. El estudio pionero lo implementó el grupo de investigación del doctor Hsueh de la universidad de Standford en colaboración con el grupo del doctor Kawamura de Kawasaki, Japón y fue publicado en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* en agosto de 2013 (56, 70).

En dicho estudio, a pacientes previamente diagnosticadas de senescencia ovárica prematura con menopausia establecida, se les realizó ooforectomía uni o bilateral mediante cirugía laparoscópica y vitrificación la corteza ovárica. Tras

descongelar la corteza le aplicaron in vitro un estímulo mecánico (fragmentación en múltiples alícuotas) junto con otro químico (incubación en un medio con activadores del PI3K e inhibidores de PTEN). En una segunda cirugía reimplantaron el tejido en la serosa de la trompa de Falopio. Posteriormente, en aquellas pacientes en las que se observó crecimiento folicular, llevaron a cabo ciclos convencionales de FIV.

Esta técnica fue probada en veintisiete pacientes con insuficiencia ovárica prematura. Los resultados fueron los siguientes: ocho pacientes presentaron crecimiento folicular, habitualmente semanas o pocos meses tras la intervención. Obtuvieron ovocitos maduros en cinco pacientes. Una paciente quedó gestante y finalmente dio a luz a un recién nacido sano. Sólo trece pacientes presentaban folículos residuales en el análisis histológico de las piezas, y las ocho a las que se consiguió inducir la ovulación pertenecían a este grupo, lo que supone un 62% de respuesta al tratamiento en términos de activación ovárica. En 2015 el mismo grupo publicó una actualización de sus resultados. Durante este periodo incluyeron a diez pacientes más. Consiguieron dos nuevos embarazos, de los cuales uno terminó en aborto y otro dio lugar a un recién nacido sano (70).

En conclusión, sabemos que el ovario humano está organizado de tal forma que los folículos primordiales se sitúan en la región cortical, que es más rígida que la zona interna

correspondiente a la médula. Estos folículos permanecen en estado quiescente por mecanismos desconocidos. Una vez son activados y comienza su crecimiento, las señales de la vía Hippo generadas por folículos cercanos en el área cortical podrían ser interrumpidas debido a los cambios en la rigidez del nicho, dando lugar a un incremento de la actividad YAP y secreción de los factores de crecimiento CCN seguido de proliferación celular y crecimiento folicular a la etapa secundaria. Según los folículos van creciendo, se van desplazando hacia la región medular, que es más blanda, y por tanto podría volver a funcionar la señalización Hippo, lo que ralentizaría de nuevo el crecimiento folicular (4). Basándose en estudios sobre cultivos foliculares, Woodruff y Shea concluyeron que la activación folicular depende del entorno físico del ovario además de las ya conocidas señales hormonales (71). Hasta ahora el estudio del funcionamiento ovárico no había considerado los aspectos mecánicos y físicos, pero gracias a que hoy en día disponemos de datos que avalan su importancia, podemos trabajar con un modelo holístico que integre tanto el control hormonal como el mecánico y así aplicar este conocimiento para el tratamiento de patologías médicas como la insuficiencia ovárica prematura.

ACTIVACIÓN DE FOLÍCULOS PRIMORDIALES MEDIANTE PROCEDIMIENTO IVA MODIFICADO - OFFA (OVARIAN FRAGMENTATION FOR FOLLICULAR ACTIVATION)

Fruto de un estudio minucioso de la base teórica presentada en el apartado anterior, nuestro grupo de investigación se planteó varias cuestiones: ¿Se deben al azar los resultados observados? ¿Son reproducibles? Y lo más importante, ¿pueden ser mejorados? Para ello contamos con la experiencia que nos ha aportado el programa de preservación de la fertilidad de nuestro servicio clínico. Se trata de uno de los más importantes a nivel internacional, habiendo realizado hasta la fecha más de 600 criopreservaciones de corteza ovárica. Nos ha dotado de una experiencia práctica de gran valor en cuanto a la aplicación de técnicas de extracción de tejido ovárico y reimplante del mismo mediante abordajes mínimamente invasivos (72).

Los puntos de mejora que identificamos e implementamos son los siguientes:

1. Eliminar el proceso de incubación del tejido

Los tiempos de isquemia ejercen un efecto dañino sobre el tejido condicionando su viabilidad (73). Al prescindir del proceso de incubación logramos minimizar el daño tisular. Por otro lado, las sustancias en las que se incubaba el tejido ovárico para realizar el IVA (activadores de PI3K e inhibidores de PTEN) tienen efecto oncogénico *in vivo* y por tanto pueden

inducir malignidad (74). Aunque es cierto que se restringen a un uso *in vitro*, hemos considerado prudente abstenernos de poner en contacto las muestras de tejido con sustancias potencialmente oncogénicas. Finalmente, eliminar la incubación nos permite realizar el procedimiento en un único acto quirúrgico conllevando una mayor aceptabilidad por las pacientes y un menor coste económico.

2. Modificar el sitio de reimplante a la subcortical ovárica preferentemente

Se han evaluado distintos sitios de reimplante intraabdominal - extraovárico en primates, siendo el peritoneo pélvico el que menor supervivencia folicular proporciona (75). En programas de preservación de la fertilidad se ha observado un mayor desarrollo folicular tras el reimplante bajo la cortical ovárica comparado con reimplante bajo el peritoneo adyacente (76). Sin embargo, la cantidad de tejido que se puede colocar en remanente ovárico es limitada, lo que no ocurre en otras localizaciones. Por tanto, elegimos de forma preferente al propio ovario al existir evidencias de que ofrece un área de mejor vascularización pero no descartamos otras localizaciones como el peritoneo pélvico para poder reimplantar el tejido excedente.

3. Evitar la vitrificación del tejido

Por un lado, como ya hemos comentado, resulta ventajoso simplificar el procedimiento de tal manera que se pueda llevara a cabo en un único acto quirúrgico. Por otro, se sabe

que el tejido ovárico es sensible a los cambios de temperatura y sufre daños tanto durante el proceso de enfriamiento como durante la descongelación (77). Esto se traduce en una disminución del *pool* folicular (78), que si bien es menor que la asociada al daño por isquemia - reperfusión (79), puede ser trascendente en pacientes que ya parten de una reserva ovárica escasa. Por tanto, evitar la vitrificación del tejido ovárico contribuye a preservar su vitalidad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La fragmentación de la corteza ovárica in vitro activa el crecimiento de folículos primordiales, condicionando la aparición de un mayor número de folículos antrales, lo que posibilitaría una mayor obtención de ovocitos tras estimulación ovárica controlada, siendo útil para mejorar la tasa de éxito de la FIV en pacientes con baja respuesta ovárica.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo primario

- Valorar si la activación folicular mediante fragmentación ovárica aumenta el pool de folículos antrales en pacientes bajas respondedoras.

Objetivos secundarios

- Valorar si la activación folicular mediante fragmentación ovárica mejora la respuesta ovárica tras estimulación con gonadotrofinas en tratamientos de fecundación in vitro.
- Valorar si la activación folicular mediante fragmentación ovárica mejora los resultados reproductivos (tasa de gestación y recién nacido).
- Valorar si la activación folicular mediante fragmentación ovárica mejora la calidad embrionaria.
- Valorar si los resultados obtenidos por el grupo de Hsueh con la técnica IVA son reproducibles en pacientes con fallo ovárico establecido con la técnica OFFA.

INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN

La baja respuesta ovárica es un problema frecuente en los tratamientos de FIV. Hasta una de cada cuatro pacientes sometidas a esta técnica de reproducción asistida presentará una pobre respuesta ovárica. Esto compromete el éxito del tratamiento ya que la tasa de gestación en bajas respondedoras es significativamente menor que en pacientes normorrespondedoras.

Además, hasta el momento no se ha descrito ninguna estrategia útil para mejorar los resultados de FIV en este subgrupo de pacientes. Se ha propuesto adaptar los protocolos de estimulación aumentando la dosis de FSH o bien incluyendo pre-tratamiento con otras hormonas, sin que ninguna de estas intervenciones haya demostrado eficacia. Por lo tanto, la realidad es que actualmente no existe solución para el problema de la baja respuesta, aunque se trata de un problema frecuente.

En nuestro medio, el coste del tratamiento de FIV oscila entre 6000 - 8000 euros. Teniendo en cuenta que menos del 16% de las bajas respondedoras consigue gestar, se realiza una gran inversión para obtener resultados relativamente pobres. Aumentar la tasa de gestación en bajas respondedoras supondría una reducción de costes sanitarios para el Sistema Nacional de Salud, así como un ahorro para la sociedad en

cuanto a costes indirectos (pérdida o reducción de la capacidad para trabajar o disfrutar del ocio de un paciente que requiere venir regularmente a visitas de control, que ingresa para punciones foliculares o que debe convalecer en su domicilio...), y un aumento de la calidad de vida de las pacientes y sus parejas. Obviamente un análisis coste - beneficio más detallado sería necesario una vez se evaluase la eficacia de la intervención propuesta.

METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos planteados y verificar o rechazar la hipótesis de trabajo principal se ha planteado un estudio con un diseño en dos fases (figura 5).

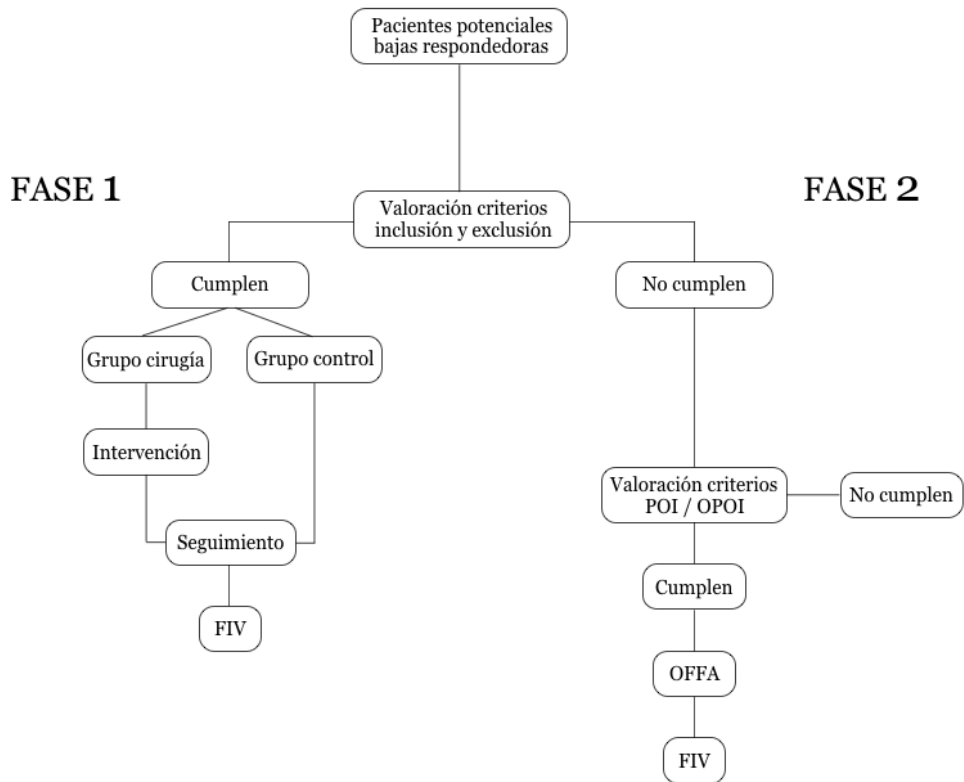


Figura 5: diseño del estudio

Fase 1: Ensayo aleatorizado, controlado, ciego único en bajas respondedoras (*Follicular Activation in Previously Diagnosed Poor Responders - FAPPOR*)

Diseño de la fase 1

Treinta y seis pacientes previamente confirmadas como bajas respondedoras acorde a criterios de la ESHRE serán aleatorizadas a dos brazos de tratamiento:

- Brazo 1 (control): no se realiza ninguna intervención sobre la paciente.
- Brazo 2 (intervención): procedimiento de activación folicular mediante fragmentación mecánica de la corteza (OFFA) unilateral.

El presente diseño permite realizar un doble control: pacientes a las que se les ha realizado el procedimiento vs pacientes control, y a la vez cada paciente es control de sí misma (ovario en el que se ha realizado el procedimiento *versus* ovario contralateral -ovario control-).

Tras la realización del procedimiento se realiza una monitorización del crecimiento folicular mediante control ecográfico y analítico bisemanal. En el momento en que se aprecia un incremento en el número de folículos antrales del 100% (doblan el número de folículos), se realiza un procedimiento de FIV mediante protocolo estandarizado.

Población de estudio

Pacientes del servicio de Reproducción humana del Hospital Universitario La Fe afectas de esterilidad subsidiaria de tratamiento mediante FIV o ICSI que sean bajas respondedoras confirmadas en base a los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión (debe cumplirse uno)

- Al menos dos episodios de pobre respuesta ovárica (≤ 3 ovocitos recuperados en un esquema de estimulación convencional).
- Un ciclo previo de FIV con ≤ 3 óvulos (siguiendo un protocolo de estimulación convencional) y presencia de un test anómalo de reserva ovárica (contaje de folículos antrales de ≤ 5 o AMH ≤ 5 pM).

Criterios de exclusión (la presencia de uno excluye la participación)

- Pacientes mayores de 40 años.
- Sospecha clínica de endometriosis ovárica.
- Cirugía previa sobre el ovario.

- Malformaciones del tracto genital no corregidas en el momento de la valoración y/o alteraciones de la cavidad endometrial.
- Pacientes con ciclos irregulares, periodos de amenorrea de más de 40 días o con ciclos anovulatorios (definidos por progesterona sérica en el día 21 del ciclo de ≤ 10 ng/mL).
- Parejas con factor masculino severo: oligoastenozoospermia severa, oligoastenoteratozoospermia y azoospermia, definido éste como REM $< 5,00$.
- Todas aquellas pacientes que de forma voluntaria no den su consentimiento expreso por escrito.

Estimación del tamaño muestral

Basándonos en datos obtenidos en nuestra población de bajas respondedoras, en las cuales se obtuvo de media 2,9 ovocitos con una desviación estándar de 2,54 y asumiendo que la técnica permitiría doblar el número de ovocitos obtenidos con nuestra intervención, así como un 15% de pérdidas, son necesarias 18 pacientes por brazo para poder demostrar diferencias si las hubiese, asumiendo un error *alfa* del 5% y un *beta* del 10%.

Valoración inicial

Previamente a la inclusión de la paciente en el estudio se realiza una primera visita en fase folicular inicial en la que se actualizan los datos de recuento folicular y se extrae una muestra de sangre para las determinaciones hormonales basales (FSH, estradiol y AMH). Al ovario con menor número de folículos antrales se le adjudica la nomenclatura ovario-intervención (OInt); el otro ovario pasará a denominarse ovario contralateral (OC). También se recogen los datos de la historia clínica de la paciente y se constata que es apta para participar en el estudio mediante comprobación por *check-list* en cuaderno de recogida de datos electrónico. Se le da una copia de la hoja de información al paciente y se resuelven las dudas respecto al objetivo y funcionamiento del estudio. Si la paciente está de acuerdo, firma el consentimiento informado en el momento en que se tienen los resultados de las determinaciones hormonales.

Aleatorización

La asignación de las pacientes a los grupos de estudio se realiza mediante un generador de números aleatorios (www.random.org). Los números generados están guardados en un archivo digital al que solo tiene acceso una persona

ajena al estudio, la cual informa al investigador vía telefónica cuando éste solicita aleatorizar a una paciente, para así garantizar el ocultamiento de la asignación.

Descripción de la técnica quirúrgica

Extracción de la corteza ovárica

Se realiza mediante abordaje laparoscópico colocando un trócar tipo Hasson a nivel umbilical y tres trócares de 5 mm en ambas fosas iliacas y suprapúbico. El pneumoperitoneo se fija a 12 mmHg. El ovario del que se extraerá la corteza es aquel en el que se haya contabilizado un menor número de folículos antrales (OInt). Se procede a decorticación de dicho ovario mediante disección con tijera fría de la interfase cortico-medular de la cara posterior del ovario elegido. La cantidad de corteza extraída será de al menos $\frac{3}{4}$ partes de toda la superficie posterior del ovario, lo que normalmente equivale a un fragmento de corteza ovárica de entre 1 y 2 cm². Usualmente el lecho precisa poca o ninguna medida hemostática; de requerirlo, se realizaría coagulación selectiva de punto sangrante mediante energía bipolar con sistema de detección de impedancia en el tejido (Biclamp, ERBE, USA).

Fragmentación de la corteza ovárica

Se lleva a cabo en una mesa auxiliar estéril y refrigerada entre 4 y 10°C preparada para tal efecto al lado de la mesa

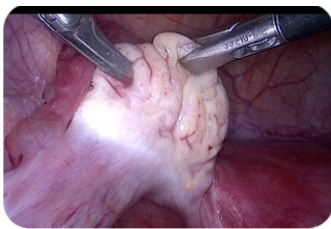
operatoria. El biólogo del equipo acude a quirófano cuando la corteza ovárica está lista para ser extraída. La manipulación de la corteza tiene lugar en una batea estéril de borde bajo de medidas 20 cm x 30 cm x 4 cm y el tejido está permanentemente irrigado con medio M199 a 4°C (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Tras completar la limpieza de la médula que pudiera encontrarse adherida mediante rascado con bisturí frío hoja #24, se realiza la fragmentación del tejido en cubos de 1 mm de arista (1 mm³) con una hoja de bisturí frío #11. Estos fragmentos son introducidos en una cánula de biopsia endometrial modificada que se le entrega al cirujano principal para su recolocación en ovario.

Reimplante de los microfragmentos

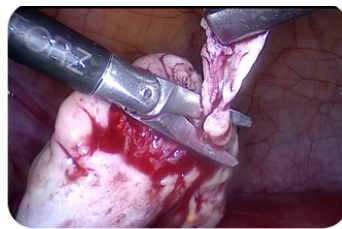
Se procede a tunelizar un trayecto de aproximadamente 15 mm x 10 mm en la cara anterior del ovario decorticado. Dicha tunelización se realiza seccionando la cortical ovárica a nivel próximo a la entrada del pedículo útero-ovárico con tijera fría y posterior disección subcortical roma con técnica de tracción-contratracción empleando una pinza tipo Maryland y otra tipo Manhes. El bolsillo ovárico subcortical se llena hasta el máximo de su capacidad con los microfragmentos de corteza ovárica. Se reservan entre 1 y 5 microfragmentos para su estudio anatomopatológico a posteriori. El extremo del túnel se cierra con puntos simples de monofilamento de polipropileno 5-0 (Prolene, Ethicon, USA) mediante anudado intracorpóreo. En

caso de que hubiese microfragmentos excedentes, éstos se colocan en bolsillos peritoneales realizados mediante hidrodissección a la altura del mesoovario ipsilateral, cerrándose igualmente con puntos sueltos. De esta forma todo el proceso de activación folicular se lleva a cabo en un único acto quirúrgico.

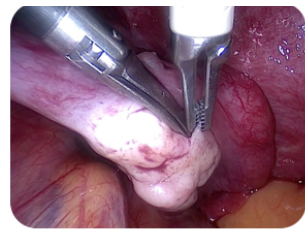
Figura 6: pasos quirúrgicos



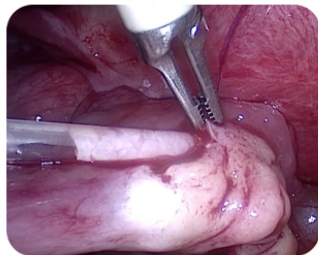
1. Decorticación cara posterior



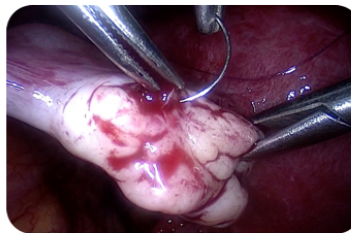
2. Extracción del fragmento de corteza ovárica



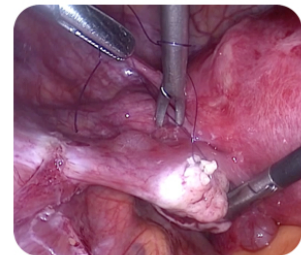
3. Tunelización cara anterior



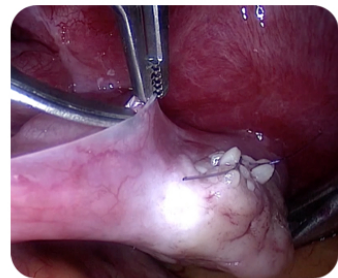
4. Introducción microfragmentos



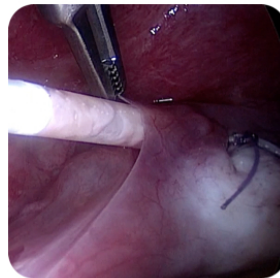
5. Punto de sutura en extremo del túnel ovárico



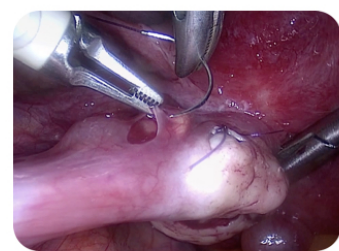
6. Cierre del túnel ovárico



7. Creación del bolsillo peritoneal



8. Introducción microfragmentos



9. Cierre del bolsillo peritoneal

Seguimiento

Comienza dos semanas tras la cirugía en las pacientes que pertenecen a este grupo, y con la siguiente regla en las pacientes asignadas al grupo control.

El recuento de folículos antrales y las determinaciones hormonales se actualizan cada dos semanas, y siempre que la paciente tenga la menstruación independientemente del tiempo que haya pasado tras el último control.

El seguimiento se extiende por un máximo de seis meses. Puede ser de duración inferior si en algún control se detecta un incremento de folículos antrales de al menos el 100% respecto a su basal y las condiciones son óptimas para iniciar un ciclo de estimulación ovárica.

Recuento de folículos antrales

El recuento de folículos antrales se realiza por ginecólogos con un entrenamiento adecuado en ecografía. La exploración se lleva a cabo mediante un equipo Voluson (General Electric, España) o bien un Siemens Acuson S2000 (Siemens, Washington DC) equipado con transductor endovaginal 2D con 6,5 - 9 MHz de forma estandarizada de acuerdo con las recomendaciones publicadas (15). El recuento se obtiene mediante barrido bidimensional del ovario contando

individualmente cada folículo antral y midiendo transversalmente sus dos ejes mayores. Se considera folículo antral cualquier imagen anecogénica de entre 2 y 10 mm incluida dentro del parénquima ovárico. Los parámetros del ecógrafo se adecúan a las características clínicas de cada paciente. Se registra el número y tamaño de los folículos en cada ovario por separado, y también la suma total de folículos entre ambos ovarios.

Determinaciones hormonales

La toma de muestras se realiza por venopunción y recogida en un tubo seco de 7 ml. La obtención del suero se realiza tras separación mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El análisis de las muestras y determinación de AMH se centraliza en un solo laboratorio (IVI-Valencia) y los de FSH y Estradiol en otro (HUP La Fe). La cuantificación de AMH se realiza usando el sistema automatizado de quemoluminiscencia Roche Modular E170. Los coeficientes de variación intra e interensayo son inferiores al 2,9% y 3,3% respectivamente. La FSH y el estradiol se cuantifican mediante el sistema de quemoluminiscencia Architect de Abbott Diagnostics. El coeficiente de variación intra e interensayo es del 3% y 4% para la FSH y del 4.6% y 5% para el estradiol respectivamente.

El ciclo de estimulación ovárica se realiza tras finalizar el seguimiento, bien por un criterio temporal o bien por mejoría ecográfica significativa (acorde a protocolo, si la paciente duplica el número de folículos antrales). El protocolo de estimulación aplicado es el mismo para todas las pacientes y es el protocolo seguido por nuestro grupo en pacientes bajas respondedoras: administración diaria 300 UI de menotropina urinaria altamente purificada (HMG-Hp, Menopur, Ferring SAU, Madrid, Spain) en un ciclo con antagonista de la GnRH (Cetrorelix, Cetrotide, Merck SL, Madrid, Spain) añadido cuando el mayor de los folículos alcanza un diámetro de 14 mm o las cifras de estradiol sérico sobrepasan los 500 pg/mL. La ovulación se desencadena con hCG recombinante humana (Ovitrelle, Merck SL, Madrid, Spain) siendo la punción 36 horas después. Los embriones son transferidos en día + 3 o en blastocisto y siempre en ciclo fresco salvo contraindicación médica (niveles de progesterona > 2 ng/mL o aspecto ecográfico del endometrio sugestivo de patrón no receptivo), en cuyo caso son congelados y transferidos en un ciclo diferido.

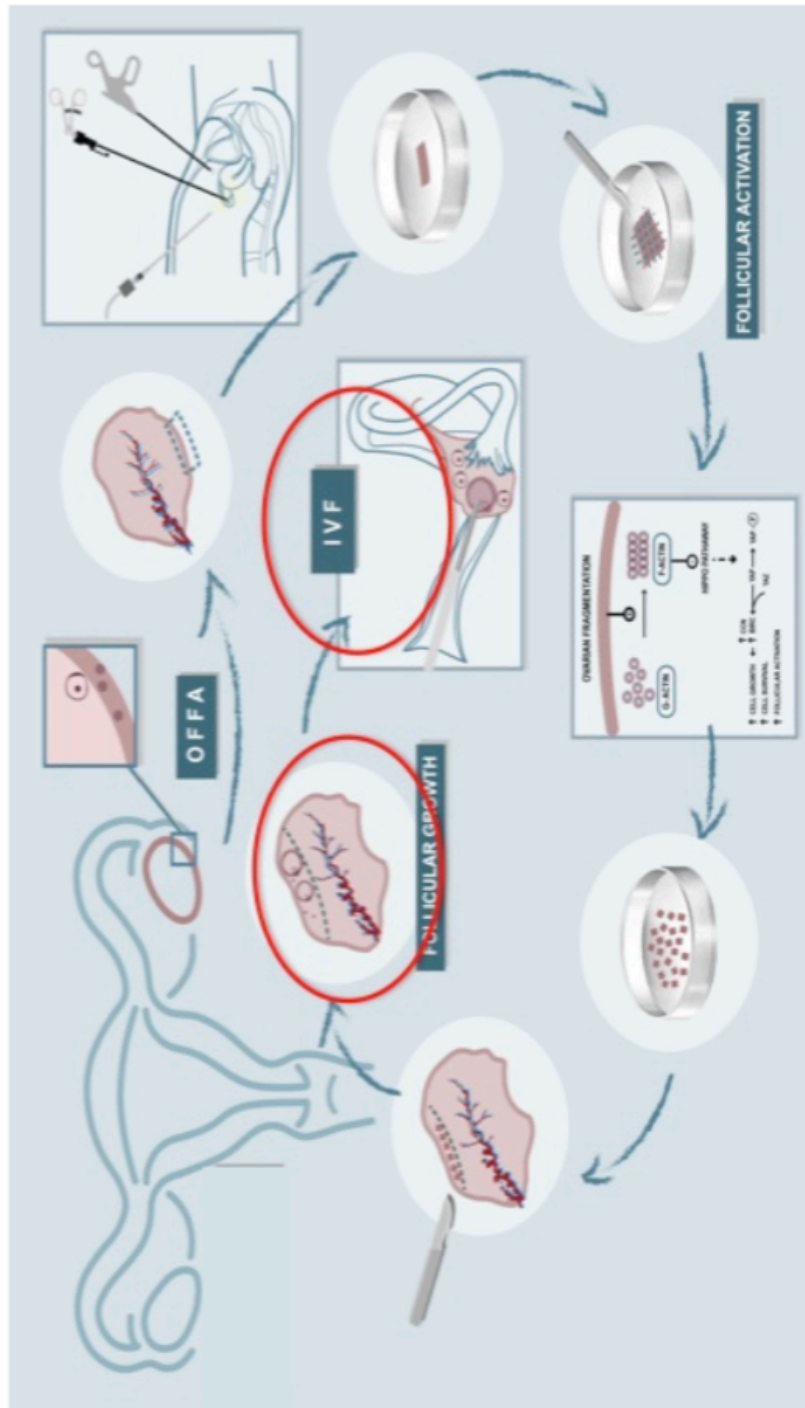


Figura 7: procedimiento de activación folicular

- **Tiempo hasta realización del ciclo de FIV:** tiempo transcurrido desde la cirugía (en pacientes intervenidas) o desde el primer control (en pacientes no intervenidas) hasta el comienzo de la estimulación ovárica controlada.
- **Incremento de AMH respecto a AMH basal:** diferencia entre la última determinación de AMH obtenida y la que se obtuvo en la primera visita.
- **Número de folículos antrales en el momento de inicio de ciclo:** AFC con el que se inicia la estimulación ovárica controlada.
- **Incremento de folículos antrales respecto a recuento basal:** diferencia entre el último AFC y el que se obtuvo en la primera visita.
- **Variación de número de folículos antrales en ovario-intervención respecto a recuento basal:** diferencia entre el último AFC del ovario operado y el que se obtuvo en la primera visita en ese mismo ovario.
- **Dosis de gonadotrofinas empleadas:** suma de la dosis de gonadotrofinas diaria durante el número de días que dura la estimulación ovárica.
- **Estradiol máximo el día de *triggering*:** niveles de estradiol alcanzados el día que se indica la administración de hCG.

- **Número de ovocitos obtenidos:** número total de ovocitos obtenidos tras la punción ovárica.
- **Número de ovocitos MII obtenidos.**
- **Tasa de fecundación:** porcentaje de cigotos obtenidos sobre el número de ovocitos inyectados. Se consideraron morfológicamente normales cuando eran visibles dos pronúcleos centrados y de igual tamaño.
- **Tasa de clivaje:** número de embriones segmentados en día +2 y +3 respecto al número total de ovocitos que fecundaron.
- **Tasa de blasto:** número de embriones que llegan a día +5 respecto al número total de ovocitos que fecundaron.
- **Tasa de embriones de máxima calidad:** número de embriones de máxima calidad sobre el número total de ovocitos que fecundaron. La calidad embrionaria se evaluó en días +2 o +3 siguiendo los criterios descritos por Veeck (80): los embriones de máxima calidad en día +2 tienen 2 a 4 células y un 15% de fragmentación tipo I-II en ausencia de multinucleación; los embriones de máxima calidad en día +3 tienen 6 a 8 células y un 20% de fragmentación tipo I-II. La fragmentación de tipo I es mínima en volumen y típicamente asociada a sólo una blastómera, mientras que los fragmentos de tipo II ocupan principalmente el espacio perivitelino (81).
- **Número de embriones transferidos.**

- **Tasa de implantación:** número de embriones que se implanta de manera satisfactoria sobre el total de embriones transferidos. En la práctica se considera que la implantación ha ocurrido cuando se observa saco gestacional intraútero mediante ecografía transvaginal.
- **Tasa de gestación bioquímica:** número de pacientes con test de embarazo positivo sobre el número de embriones transferidos (**por transferencia**) o bien sobre el número total de pacientes que fueron sometidas a al menos una transferencia embrionaria (**por ciclo**). El aumento de la b-HCG sérica se comprueba 15 días tras la transferencia embrionaria. Si posteriormente no se observa saco gestacional intraútero mediante ecografía se considera que ha ocurrido un aborto bioquímico (82).
- **Tasa de gestación clínica:** número total de gestaciones clínicas (definidas por la presencia de saco gestacional intraútero tras dos semanas del test de gestación positivo) sobre el número total de transferencias (**por transferencia**) o bien sobre el número total de pacientes que fueron sometidas a al menos una transferencia embrionaria (**por ciclo**).
- **Tasa de gestación evolutiva:** número total de gestaciones que se desarrollan más allá de la semana 12 respecto al total de ciclos llevados a cabo.

- **Tasa de recién nacido vivo:** número de ciclos que han dado lugar a nacimiento vivo respecto al total de ciclos llevados a cabo.
- **Tasa de aborto:** número de gestaciones clínicas cuyo desarrollo se detuvo antes de las 20 semanas sobre el total de gestaciones. Los abortos se clasifican en tempranos (antes de semana 12) o tardíos (más allá de la semana 12) (82).

Análisis estadístico

La información de las variables del estudio se recoge en un cuaderno electrónico de registro de datos (eCRD) diseñado específicamente para este estudio. Dicho eCRD está dotado de reglas de coherencia interna, para controlar las incoherencias y/o incorrecciones en la recogida y tabulación de los datos. Las leyes de coherencia interna se garantizan a partir de campos índice que eviten la duplicidad de registro, detecten datos fuera de rango o sospechosos e impiden la grabación de datos inconexos.

El analista de datos es ciego respecto a la intervención asignada a cada brazo. El análisis estadístico se ha realizado con el paquete estadístico SPSS 20.0. Las variables cuantitativas que siguen una distribución normal se expresan como media y desviación estándar y las variables no normales como mediana

y rango intercuartílico. Las variables categóricas se expresan en valores absolutos y porcentajes. Las diferencias observadas se consideran estadísticamente significativas si $p < 0,05$. La comparación entre grupos de variables cuantitativas se realiza mediante el test de la t-Student o U-Mann según proceda. La comparación de las variables categóricas, mediante el test de Chi-cuadrado o Fisher según proceda. Las comparaciones intra-paciente (ovario operado vs no operado) se realiza mediante los test de t-Student para muestras pareadas o Wilcoxon para variables cuantitativas y mediante el test de McNemar para variables cualitativas.

Autorización y registro

El Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital La Fe evaluó este proyecto y emitió un informe favorable para su puesta en marcha el 14 de enero de 2014 con número de registro 2014/0004 (anexo 1). Igualmente la fase 1 ha sido registrada en clinicaltrials.gov con el código NCT02354963.

Fase 2: Estudio no aleatorizado no controlado en subpoblación POI

Diseño de la fase 2

En una segunda fase, y con intención de comparar si la técnica de activación in vitro modificada sin incubación con inhibidores de PTEN y activadores de Akt es igualmente efectiva en pacientes con POI documentado, aquellas pacientes identificadas como POI durante el screening de la fase 1 son propuestas para, en un diseño pragmático, realizar la cirugía de activación folicular y observar de forma prospectiva cuál es el resultado de la función ovárica y de los tratamientos de reproducción asistida en caso de que deseen realizarlos. El seguimiento de las pacientes es censurado en el momento en que opten por ovodonación, tras cesar sus deseos reproductivos o en el momento de consecución de una gestación.

Población de estudio

Pacientes descartadas en la Fase 1 del estudio que cumplan criterios de POI u OPOI (ver abajo). A aquellas pacientes que no cumplan los criterios de prestación de servicios de la seguridad social se les ofrece realizar el tratamiento en el Instituto

Valenciano de Infertilidad a través de un convenio de colaboración entre la Fundación IVI y el grupo acreditado de investigación en medicina reproductiva del IIS La Fe.

Criterios de inclusión (debe cumplirse uno)

- Oligo/amenorrea durante al menos cuatro meses junto con una FSH mayor de 25 UI/L en dos ocasiones separadas por un periodo de tiempo mayor a 4 semanas en paciente menor de 40 años.
- Periodos de oligomenorrea con o sin sintomatología climatérica acompañante, junto con esterilidad y/o muy baja reserva ovárica (AMH menor de 3 pM o menos de 4 folículos antrales) o bien FSH mayor de 25 UI/L en al menos alguna determinación basal.

Criterios de exclusión (la presencia de uno excluye la participación)

- Pacientes mayores de 45 años.
- Sospecha clínica de endometriosis ovárica.
- Cirugía previa sobre el ovario.
- Malformaciones del tracto genital no corregidas en el momento de la valoración y/o alteraciones de la cavidad endometrial.

- Parejas con factor masculino severo: oligoastenozoospermia severa, oligoastenoteratozoospermia y azoospermia, definido éste como REM < 5,00.
- Todas aquellas pacientes que de forma voluntaria no den su consentimiento expreso por escrito.

Estimación del tamaño muestral

La finalidad de la fase 2 del estudio es realizar una prueba de concepto sobre la factibilidad de las modificaciones presentadas respecto al procedimiento inicialmente propuesto por los doctores Hsueh y Kawamura. Hasta la fecha sólo existen tres series publicadas de pacientes POI en las que se ha realizado el procedimiento de activación, dos de ellas compartiendo veintisiete pacientes. Con el procedimiento original, que incluye vitrificación del tejido e incubación durante dos días, se han descrito dos recién nacidos en treinta y siete pacientes (70). Con el mismo procedimiento omitiendo el paso de la vitrificación se ha descrito un recién nacido vivo en catorce pacientes (83). De forma empírica y en base a estos datos decidimos incluir catorce pacientes, como en la última serie publicada.

Valoración inicial

La valoración inicial se realiza tal y como está descrita en la fase 1 del estudio; de hecho se realiza en el momento del screening de dicha fase.

Descripción de la técnica quirúrgica

La técnica quirúrgica se realiza de la misma forma a como fue descrita en la Fase 1 del estudio. La única diferencia es que se realiza de forma bilateral sobre los dos ovarios de forma sistemática, salvo imposibilidad técnica.

Seguimiento

Comienza dos semanas tras la cirugía y se lleva a cabo de mediante la misma cadencia descrita en la fase 1, al igual que la misma metodología en lo referente a determinaciones hormonales y controles ecográficos.

Proceso de fecundación in vitro

El ciclo de estimulación ovárica se realiza si se observa un incremento en el número de folículos antrales en caso de que hubiese folículos antrales de inicio, o en el momento en que se

visualicen folículos antrales en caso de que no los hubiese de inicio. El protocolo de estimulación aplicado se deja a elección del médico tratante en función al número de folículos y características clínicas de la paciente, no existiendo un protocolo definido. A aquellas pacientes de más de 38 años se les ofrece la posibilidad de realizar un screening genético preimplantacional si así lo desean.

Definición de nuevas variables resultado incluidas en la Fase 2

Las variables resultado incluidas en la fase 2 son esencialmente aquellas definidas en la fase 1. Además se incluyen las siguientes variables clínicas:

- **Recuperación de la función endocrina** (en aquellas pacientes en las que había cesado definitivamente), definida ésta como normalización de los niveles de estradiol y FSH o bien la recuperación de la menstruación si la paciente estaba en amenorrea.
- **Realización de ciclo de FIV** como variable dicotómica, e igualmente se recoge el número de tratamientos de FIV realizados.
- **Tipo de protocolo de FIV:** variable descriptiva en el que se detalla el tipo de protocolo empleado para realizar la estimulación ovárica.

RESULTADOS

Fase 1. Estudio FAPPOR

Reclutamiento de pacientes

Fueron revisadas 377 historias clínicas, de las cuales excluimos 347 por los siguientes motivos:

- En 302 casos no se cumplían los criterios necesarios para aceptar su participación:
 - 69 pacientes tenían más de 40 años, o cumplirían esta edad durante el seguimiento.
 - 56 pacientes no cumplían alguno de los requisitos para ser catalogadas de POR.
 - 51 pacientes tenían un diagnóstico clínico de endometriosis.
 - 13 pacientes tenían un antecedente de cirugía sobre el ovario.
 - 14 pacientes presentaban malformaciones del tracto genital no corregidas.
 - 7 pacientes eran anovuladoras.
 - 7 casos asociaban un factor masculino severo y rechazaron utilizar semen de donante.

- 88 pacientes por otras razones (estar incluidas en otros ensayos clínicos, padecer alguna alteración genética susceptible de DGP, tener antecedentes de patología oncológica habiendo recibido tratamiento gonadotóxico...).
- 23 pacientes válidas según su historial clínico rechazaron participar por los siguientes motivos:
 - 10 pacientes ya habían tomado la decisión de recurrir a la ovodonación.
 - 7 pacientes manifestaron que no estaban dispuestas a participar en un ensayo clínico.
 - 5 pacientes habían decidido abandonar la búsqueda de gestación.
- 15 mujeres ya habían conseguido quedar gestantes espontáneamente en el momento en que fueron contactadas.
- Fue imposible contactar con 7 pacientes.

Aleatorización

Treinta pacientes firmaron el consentimiento informado:

- Una lo revocó a los pocos días porque comenzó un nuevo trabajo que no podía compatibilizar con los requisitos del estudio, por lo que fue considerada un fallo de *screening*.

- Veintinueve pacientes fueron aleatorizadas:
 - Once fueron asignadas al **grupo cirugía**. Todas fueron intervenidas, excepto una que tuvo que trasladarse a otra comunidad autónoma por motivos laborales antes de establecer fecha para la cirugía.
 - Dieciocho fueron asignadas al **grupo control**. Hubo dos pérdidas en el seguimiento, una por no estar dispuesta a cumplir los plazos temporales del estudio y otra porque inició los trámites de divorcio cuando se encontraba en la quinta semana de seguimiento.

El proceso de reclutamiento y aleatorización está reflejado en la figura 8.

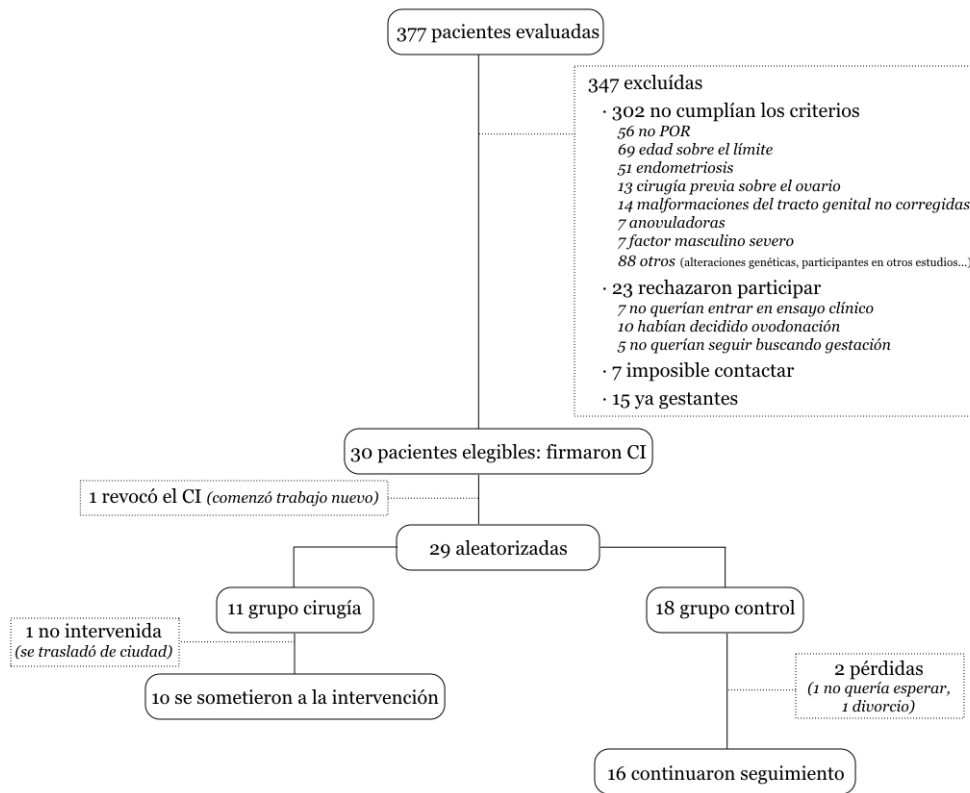


Figura 6: diagrama de flujo de pacientes del estudio FAPPOR

Análisis intermedio

Al no ser un estudio ciego, los investigadores que participaban en el seguimiento de las pacientes tenían la impresión subjetiva de que el AFC era mayor en el grupo de pacientes intervenidas y requerían un menor tiempo de seguimiento hasta alcanzar este objetivo. Tras exponérselo al asesor estadístico, se decidió realizar un análisis de los datos

disponibles dado que, en caso de confirmarse la sospecha, podríamos estar sometiendo a las pacientes a los riesgos derivados de una intervención quirúrgica de forma innecesaria. El análisis intermedio detectó un incremento del recuento de folículos antrales estadísticamente significativo en las pacientes que se habían intervenido quirúrgicamente respecto al grupo control. Habiendo alcanzado la significación estadística para la variable objetivo primario, decidimos detener el ensayo clínico y realizamos el análisis estadístico definitivo.

- De las dieciséis pacientes que permanecían en el grupo control, doce habían llegado a finalizar el seguimiento antes de detener el estudio, mientras que las otras cuatro tenían una mediana de seguimiento de cien días.
- Las diez pacientes intervenidas finalizaron el seguimiento con buen cumplimiento del mismo.

Realizamos un análisis estadístico por protocolo entre el grupo de pacientes no intervenidas respecto al grupo control. Las variables resultado fueron analizadas por ciclo iniciado.

Características basales de las pacientes

Las características basales de las pacientes están reflejadas en la tabla 1. No obtuvimos diferencias estadísticamente

significativas, por lo que ambos grupos se pueden considerar comparables.

Tabla 1: características basales de las pacientes (fase 1)

	Grupo control n = 12	Grupo cirugía n = 10	p
Edad	36.5 [35.0-38.0]	34.5 [33.8-37.3]	NS
Edad de la pareja	37.0 [37.0-42.0]	38.0 [36.8-39.3]	NS
IMC	21.0 [20.0-24.0]	22.0 [19.8-24.0]	NS
Gestaciones previas	5 (41.7%)	2 (20.0%)	NS
Partos previos	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NS
Abortos previos	5 (41.7%)	2 (20.0%)	NS
Etiología de la esterilidad			NS
Solo POR	11 (91.7%)	10 (100.0%)	
Factor tubárico	1 (8.3%)	0 (0.0%)	
Tiempo de esterilidad (meses)	36.0 [36.0-72.0]	48.0 [36.0-120.0]	NS
AFC inicial total	5.0 [1.3-5.0]	3.5 [2.8-4.0]	NS
AMH inicial (pmol/L)	2.2 [0.3-4.0]	3.0 [1.0-3.6]	NS
Número de FIV previos	1.0 [1.0-1.75]	1.0 [1.0-2.3]	NS
Número de ciclos previos con pobre respuesta	1.0 [1.0-1.0]	1.0 [1.0-2.0]	NS

IMC: índice de masa corporal; POR: pobre respuesta ovárica; AFC: recuento de folículos antrales; AMH: hormona antimülleriana; FIV: fecundación in vitro

Variables relacionadas con la cirugía

Los aspectos técnicos relacionados de la cirugía están reflejados en la tabla 2. Se detectó la presencia de endometriosis en dos casos; en ambos se trataba de lesiones puntiformes sobre el peritoneo parietal pélvico, superficiales, muy poco extensas y con apariencia antigua, por lo que no desestimamos la permanencia de estas pacientes en el estudio. Una paciente presentó un episodio de fiebre sin foco a los tres días de la cirugía que se autolimitó en dos días sin requerir ningún tratamiento específico.

Tabla 2: cirugía (fase 1)

	Grupo cirugía n = 10
Tamaño de la corteza ovárica extraída (cm ²)	2.0 [1.0-2.5]
Número de fragmentos reimplantados	81.0 [55.3-108.5]
Sitio del reimplante <i>Subcortical</i> <i>Subcortical + subperitoneal</i>	4 (40.0%) 6 (60.0%)
Biopsias con presencia de folículos primordiales	1 (10.0%)
Cortical ovárica de aspecto fibrótico	1 (10.0%)
Presencia de endometriosis pélvica	2 (20.0%)
Duración de la cirugía (minutos)	110.0 [81.5-124.5]
Complicaciones quirúrgicas	1 (10.0%)

Resultados del seguimiento

Las variables relacionadas con el seguimiento de las pacientes están reflejadas en la tabla 3. El seguimiento de las pacientes intervenidas tuvo una duración menor puesto que fue más habitual que consiguieran doblar su AFC inicial antes de cumplir los seis meses de seguimiento, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre el AFC inicial y el final del ovario contralateral. Sin embargo, en el ovario-intervención sí que aumentó el AFC en las pacientes operadas respecto al grupo control, y este incremento fue significativo tanto en valores absolutos como relativos ($p = 0.02$ y 0.048 respectivamente). Esto se tradujo en un incremento del AFC global, también de forma estadísticamente significativa ($p = 0.027$). En cuatro pacientes intervenidas y en tres del grupo control se observó un incremento del AFC mayor al 100% (objetivo primario). El incremento de la AMH fue discreto y no alcanzó la significación estadística.

Tabla 3: resultados del seguimiento (fase 1)

	Grupo control n = 12	Grupo cirugía n = 10	p
Duración del seguimiento (días)	141.5 [117.3-162.3]	87.0 [62.0-153.3]	NS
AFC del OC			
Inicial	3.0 [1.0-3.8]	2.5 [2.0-3.0]	NS
Final	3.0 [2.3-3.8]	3.0 [2.0-4.0]	NS
Incremento (%)	63.0 [8.3-175.0]	83.0 [0.0-150.0]	NS
AFC del OInt			
Inicial	1.0 [0.0-2.0]	1.0 [0.8-1.3]	NS
Final	1.0 [1.0-2.8]	3.0 [1.8-4.3]	0.02
Incremento (%)	0.0 [(-62.5)-100.0]	200.0 [100.0-350.0]	0.048
AFC Total			
Inicial	5.0 [1.3-5.0]	3.5 [2.8-4.0]	NS
Final	5.0 [3.3-6.0]	6.5 [4.0-7.5]	0.027
Incremento (%)	20.0 [0.0-162.5]	75.0 [45.8-200.0]	NS
AMH			
Inicial (pmol/L)	2.2 [0.3-4.0]	3.0 [1.0-3.6]	NS
Final (pmol/L)	2.6 [1.1-4.8]	2.9 [1.7-6.5]	NS
Incremento (%)	73.4 [35.1-163.4]	88.1 [(-24.2)-120.1]	NS

AFC: recuento de folículos antrales; OC: ovario contralateral; OInt: ovario-intervención; AMH: hormona antimülleriana

Resultados reproductivos

Las variables relacionadas con los resultados reproductivos de las pacientes están reflejadas en la tabla 4. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En global, en los doce ciclos del grupo control se obtuvieron cuarenta y cinco ovocitos, de los cuales treinta y cuatro fueron maduros y veintiocho fecundaron. Doce embriones presentaron un desarrollo adecuado y fueron transferidos a siete pacientes. Tres pacientes quedaron gestantes; una de ellas dio a luz a un recién nacido vivo sano, otra tuvo una gestación gemelar con parto prematuro a las 26 semanas de gestación con buena evolución de ambas recién nacidas, y hay una gestación en curso de 17 semanas en el momento actual.

En los diez ciclos del grupo cirugía se obtuvieron treinta ovocitos, de los cuales veintiuno fueron maduros pero solo diez fecundaron. Ocho embriones presentaron un desarrollo adecuado y fueron transferidos a cuatro pacientes. Dos pacientes quedaron gestantes; una de ellas dio a luz a un recién nacido vivo sano y la otra tuvo un aborto diferido tras haberse observado saco gestacional con vesícula vitelina y embrión de dos milímetros.

La causa de cancelación de los ciclos fue ausencia de respuesta en un caso de cada grupo. Adicionalmente, una paciente del grupo cirugía tuvo una ovulación espontánea por lo que se decidió realizar un nuevo ciclo de tratamiento con la siguiente regla y fue el ciclo que incluimos en el análisis.

Tabla 4: resultados reproductivos (fase 1)

	Grupo control n = 12	Grupo cirugía n = 10	p
Dosis total de gonadotrofinas (UI)	2400.0 [2100.0-3750.0]	2400.0 [1800.0-3000.0]	NS
E2 máximo (pg/mL)	996.0 [602.0-1743.0]	657.0 [451.0-1126.0]	NS
Folículos > 16 mm	3.0 [2.0-5.8]	2.0 [0.8-3.5]	NS
Número de folículos puncionados	4.0 [2.0-7.5]	4.0 [1.8-5.8]	NS
Número de ovocitos obtenidos	2.5 [2.0-5.8]	3.0 [1.0-5.0]	NS
Número de MII obtenidos	2.5 [1.0-4.0]	2.5 [1.0-3.3]	NS
Tasa de fecundación (%)	81.2 [12.5-100.0]	33.3 [0.0-81.3]	NS
Tasa de clivaje	50.0% (12/24)	72.7 % (8/11)	NS
Tasa de blasto	8.3% (2/24)	18.2 % (2/11)	NS
Tasa de embriones de máxima calidad	50.0% (12/24)	36.4 % (4/11)	NS
Número de embriones transferidos	2.0 [0.5-2.0]	0.0 [0.0-2.0]	NS
Ciclos con transferencia embrionaria	7 (58.3%)	4 (40.0%)	NS
Tasa de implantación	28.6% (4/14)	25.0% (2/8)	NS
Tasa de gestación clínica	25.0% (3/12)	20.0% (2/10)	NS
Tasa de aborto	0.0% (0/12)	10.0% (1/10)	NS
Tasa de gestación evolutiva	25.0% (3/12)	10.0% (1/10)	NS
Ciclos cancelados	1 (8.3%)	2 (20.0%)	NS

UI: unidades internacionales; E2: estradiol; MII: metafase II

Fase 2. Valoración del efecto OFFA en POI

Llevamos a cabo la cirugía de activación folicular sobre diecisiete pacientes en situación de fallo ovárico. Sin embargo, para el análisis hemos excluido dos casos por las siguientes razones: una por padecer síndrome de Asherman y otra por no cumplir criterios de POI (fallo ovárico instaurado a la edad de cuarenta y cuatro años). Adicionalmente una paciente está recién intervenida y todavía no disponemos de datos sobre el seguimiento.

Por tanto, analizamos a catorce pacientes, con edades comprendidas entre los veintiséis y los cuarenta y tres años. Las pacientes mayores de cuarenta años habían sido diagnosticadas de POI antes de cumplir esta edad. En tres casos se trataba de un POI oculto. Una paciente fue diagnosticada de X frágil en rango de pre-mutación con expansión de 58 tripletes. Todas las pacientes habían consultado por esterilidad, excepto una mujer sin pareja que presentó amenorrea y sintomatología climatérica con veintiséis años edad, motivo por el que solicitó valoración. Todas las pacientes tenían una baja reserva ovárica reflejada en un escaso número de folículos antrales y niveles de AMH muy bajos o incluso indetectables. Nueve pacientes se habían sometido a ciclos de FIV previamente. En todos los ciclos se

habían obtenido menos de cuatro ovocitos o bien habían sido cancelados por ausencia de respuesta ovárica.

En cuanto a los aspectos técnicos relacionados con la cirugía, en la mayoría de casos se optó por un abordaje bilateral, puesto que no era preciso que cada paciente sirviera de control de sí misma a diferencia de la fase 1, lo que nos permitió ampliar la superficie de trabajo. El reimplante también fue predominantemente bilateral. No ocurrió ninguna complicación intra ni postquirúrgica.

Siete pacientes de las que intervinimos no tenían ningún folículo antral visible por ecografía cuando se les realizó la valoración inicial. En todas ellas observamos desarrollo folicular tras la cirugía; sin embargo, los niveles de AMH permanecieron por debajo de los límites de detección excepto en una paciente. En todas las pacientes con folículos antrales en la valoración inicial, el AFC aumentó al doble o más durante el seguimiento, excepto en una que partía de cinco folículos antrales y llegó a tener hasta siete. No pudimos obtener datos del seguimiento de una paciente que acudió al primer control estando ya gestante tras concepción espontánea; actualmente tampoco podemos valorar su función ovárica puesto que está en periodo de amamantamiento.

En siete pacientes fue posible comenzar al menos un ciclo de estimulación ovárica. Realizamos un total de diecinueve ciclos con los siguientes protocolos de estimulación: uno largo con agonistas, once cortos con antagonistas, seis mínimamente

estimulados siguiendo el protocolo descrito por Teramoto *et al* (84) y uno natural. Debido a la heterogeneidad en los tipos de ciclo empleados no reportamos niveles de estradiol máximo en estas pacientes. En los ciclos con estimulación convencional, los niveles de estradiol máximo oscilaron entre 215 y 844 pg/mL. Tres ciclos fueron cancelados por falta de respuesta ovárica y dos por ovulación espontánea. Recuperamos un total de veintiún ovocitos, de los cuales quince eran MII. Seis de ellos fecundaron y tres tuvieron un desarrollo adecuado, por lo que fueron transferidos. Uno dio lugar a una gestación evolutiva que actualmente se encuentra en curso.

En total obtuvimos cuatro gestaciones, todas en un intervalo de tiempo menor a seis meses desde la cirugía. Tres fueron concebidas espontáneamente, en dos casos tras haberles realizado varios ciclos de FIV por lo que una dispone de cinco ovocitos vitrificados. La gestación por FIV ocurrió en la paciente con X frágil en pre-mutación. Se realizó DGP en los tres embriones de esta paciente, obteniendo un resultado normal en uno de ellos que fue el que se le transfirió. Las tres pacientes con POI oculto quedaron gestantes. Fruto de estas gestaciones ha nacido un recién nacido sano, y otras dos pacientes se encuentran en el tercer trimestre de embarazo actualmente. Una gestante tuvo un aborto diferido en semana doce. De las diez pacientes sin gestación, una se encuentra todavía en fase de seguimiento.

Realizamos una comparación estadística entre las pacientes que quedaron gestantes y las que no.

Características basales de las pacientes

Las características basales de las pacientes están reflejadas en la tabla 5. No observamos diferencias estadísticamente significativas excepto para el estado de la función ovárica, predominando el POI en las que no gestaron y el POI oculto en las que sí ($p = 0,01$). Aun sin alcanzar significación estadística, se observa una tendencia a presentar niveles basales de FSH más bajos en las pacientes que quedaron gestantes.

Tabla 5: características basales de las pacientes (fase 2)

	Pacientes que no gestaron <i>n</i> = 10	Pacientes que gestaron <i>n</i> = 4	p
Edad	37.0 [26.0-43.0]	37.5 [35.0-38.0]	NS
Edad de la pareja	40.0 [33.0-52.0]	36.0 [32.0-40.0]	NS
IMC	21.0 [19.0-30.0]	26.0 [22.0-26.0]	NS
Gestaciones previas	1 (10.0%)	1 (25.0%)	NS
Partos previos	1 (10.0%)	0 (0.0%)	NS
Abortos previos	0 (0.0%)	1 (25.0%)	NS
Etiología de la esterilidad			NS
<i>Solo POR</i>	9 (90.0%)	3 (75.0%)	
<i>Factor masculino</i>	0 (0.0%)	1 (25.0%)	
<i>Factor tubárico</i>	1 (10.0%)	0 (0.0%)	
Tiempo de esterilidad (meses)	24.0 [7.0-120.0]	27.5 [18.0-36.0]	NS

Estado de la función ovárica POI OPOI	10 (100.0%) 0 (0.0%)	1 (25.0%) 3 (75.0%)	0.01
Tiempo en oligo/amenorrea (meses)	23.0 [12.0-64.0]	42.0 [42.0-42.0]	NS
AFC inicial	0.0 [0.0-3.0]	1.0 [0.0-5.0]	NS
AMH inicial (pmol/L)	0.0 [0.0-1.0]	0.0 [0.0-2.0]	NS
FSH basal inicial (UI/L)	71.0 [29.0-179.7]	13.5 [7.0-32.0]	NS
E2 basal inicial (pg/mL)	5.0 [0.0-55.0]	23.0 [0.0-28.0]	NS
Número de FIV previos	3.0 [2.0-6.0]	3.0 [3.0-3.0]	NS
Número de ciclos previos con pobre respuesta	2.0 [0.0-6.0]	1.5 [0.0-3.0]	NS

IMC: índice de masa corporal; POR: pobre respuesta ovárica; POI: insuficiencia ovárica prematura; OPOI: insuficiencia ovárica prematura oculta; AFC: recuento de folículos antrales; AMH: hormona antimülleriana; FSH: hormona foliculoestimulante; E2: estradiol; FIV: fecundación in vitro

Variables relacionadas con la cirugía

Los aspectos técnicos relacionados de la cirugía están reflejados en la tabla 6. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en las pacientes que quedaron gestantes predominó el reimplante en localización combinada subcortical y peritoneal respecto a las que no quedaron gestantes, en las que se realizó principalmente subcortical.

Tabla 6: cirugía (fase 2)

	Pacientes que no gestaron n = 10	Pacientes que gestaron n = 4	p
Lateralidad de la extracción <i>Unilateral</i> <i>Bilateral</i>	1 (10.0%) 9 (90.0%)	1 (25.0%) 3 (75.0%)	NS
Tamaño de la corteza ovárica extraída (cm ²)	2.0 [0.4-3.0]	3.0 [1.0-4.0]	NS
Número de fragmentos obtenidos	129.0 [50.0-252.0]	156.0 [85.0-210.0]	NS
Número de fragmentos reimplantados	123.0 [50.0-245.0]	157.5 [85.0-200.0]	NS
Lateralidad del reimplante <i>Unilateral</i> <i>Bilateral</i>	1 (10.0%) 9 (90.0%)	0 (0.0%) 4 (100%)	NS
Sitio del reimplante <i>Subcortical</i> <i>Subcortical + subperitoneal</i>	8 (80.0%) 2 (20.0%)	1 (25.0%) 3 (75.0%)	NS
Biopsias con presencia de folículos primordiales	2 (20.0%)	0 (0.0%)	NS
Cortical ovárica de aspecto fibrótico	4 (40.0%)	3 (75.0%)	NS
Presencia de endometriosis pélvica	3 (30.0%)	0 (0.0%)	NS
Complicaciones quirúrgicas	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NS

Las variables relacionadas con el seguimiento de las pacientes están reflejadas en la tabla 7. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los resultados del seguimiento. Todas las pacientes que abandonaron el seguimiento pertenecían al grupo sin gestación. Tres pacientes decidieron recurrir a la ovodonación en un plazo menor a tres meses tras la cirugía al no haber alcanzado un desarrollo folicular suficiente como para realizar estimulación ovárica y no desear seguir realizándose controles. Dos pacientes decidieron dejar de intentar gestar, ambas de cuarenta y tres años. En las pacientes que gestaron se observó una tendencia a la mejoría en todos los parámetros de estimación de la reserva ovárica, tanto ecográficos como hormonales, aun si alcanzar la significación estadística. Cuatro pacientes recuperaron los ciclos menstruales en un plazo inferior a tres meses aunque no quedaron gestantes. La única gestante que partía de un estado de POI completo gestó antes de recuperar la menstruación y actualmente se encuentra lactando.

Tabla 7: resultados del seguimiento (fase 2)

	Pacientes que no gestaron n = 10	Pacientes que gestaron n = 4	p
Buen cumplimiento del seguimiento	5 (50.0%)	4 (100.0%)	NS
Mejor AFC	3.5 [1.0-6.0]	7.0 [3.0-7.0]	NS
Mejor FSH basal (UI/L)	58.0 [7.0-93.0]	7.0 [2.0-16.0]	NS
Mejor AMH (pmol/L)	0.0 [0.0-1.0]	1.0 [1.0-5.0]	NS
Reanudación de la menstruación	4 (40.0%)	-	NS
Tiempo hasta reanudar menstruación (días)	41.0 [22.0-90.0]	-	NS

AFC: recuento de folículos antrales; FSH: hormona foliculoestimulante; AMH: hormona antimülleriana

Resultados reproductivos

Las variables relacionadas con los resultados reproductivos de las pacientes están reflejadas en la tabla 8. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los parámetros de reproducción asistida. Sin embargo, en el grupo de pacientes que quedaron gestantes fuimos capaces de iniciar un mayor número de ciclos de FIV y obtuvimos un mayor número de ovocitos totales y MII.

Tabla 8: resultados reproductivos (fase 2)

	Pacientes que no gestaron n = 10	Pacientes que gestaron n = 4	p
Número de ciclos de FIV <i>Ninguno</i> <i>Uno</i> <i>Dos o más</i>	6 (60.0%) 1 (10.0%) 3 (30.0%)	1 (25.0%) 0 (0.0%) 3 (75.0%)	NS
Número de ovocitos obtenidos	0.0 [0.0-2.0]	6.0 [0.0-7.0]	NS
Número de MII obtenidos	0.0 [0.0-2.0]	4.0 [0.0-5.0]	NS
Tasa de gestación por FIV	-	25.0% (1/4)	
Tasa de gestación espontánea	-	75.0% (3/4)	

FIV: fecundación in vitro; MII: metafase II

DISCUSIÓN

Es la primera vez que se realiza el procedimiento de activación folicular en pobres respondedoras de forma controlada, y en mujeres con insuficiencia ovárica prematura según las modificaciones técnicas descritas. Hemos obtenido una tasa de gestación del 20% en pobres respondedoras, sin diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. La tasa de gestación en mujeres con insuficiencia ovárica prematura ha sido del 29%, lo que sugiere que puede tratarse de una buena alternativa de tratamiento en esta población.

La muestra de la primera fase del estudio está constituida por un grupo homogéneo de pobres respondedoras asignadas de forma aleatoria a un brazo de tratamiento y otro control. Tras dicha aleatorización, los grupos se han demostrado comparables. Las pacientes asignadas a la intervención fueron sometidas a un procedimiento invasivo pero técnicamente sencillo, con una duración de tiempo razonablemente breve y sin aparición de complicaciones significativas. Esto nos permitió darles el alta hospitalaria al día siguiente de la intervención, y plantearnos en un futuro realizar el procedimiento sin ingreso hospitalario con la consiguiente reducción de los costes asociados al mismo. Fruto de la intervención, durante el seguimiento fue detectado un

incremento significativo del recuento de folículos antrales, tanto en el ovario intervenido respecto al ovario control, así como en el recuento total de folículos antrales en las pacientes intervenidas respecto al grupo control. Sin embargo, un mayor número de folículos antrales no se tradujo en una mejoría de los resultados reproductivos, lo que puede indicar que la intervención logra activar el desarrollo folicular, resultando en dicho incremento de folículos antrales, pero no mejora el número de ovocitos obtenidos ni la tasa de gestación. Estas observaciones podrían justificarse por la ausencia de efecto del procedimiento sobre la calidad folicular, de tal forma que el incremento en el número de folículos no se acompañe de un aumento de la calidad funcional de los mismos ni de los ovocitos que potencialmente contengan. Una mala calidad ovocitaria inherente a una baja reserva ovárica podría explicar nuestros hallazgos en este grupo de pacientes (85, 86). Igualmente, tampoco parece que el aumento de folículos antrales se traduzca en una disminución del tiempo hasta realizar el ciclo de FIV, ni en una disminución de las dosis de gonadotrofinas empleadas, ni en una mejora los resultados reproductivos en pacientes pobres respondedoras. Nuestras tasas de gestación son congruentes con las publicadas por otros estudios en este tipo de pacientes.

En la segunda fase del estudio intervinimos a un grupo de pacientes con insuficiencia ovárica prematura. En este caso

asumimos la limitación de no disponer de un grupo control. Sin embargo, al existir precedentes en la literatura, resulta interesante confrontar nuestros datos con los publicados hasta la fecha por otros grupos de investigación. La experiencia en humanos se limita a los casos reportados por Hsueh y Kawamura, con treinta y siete pacientes intervenidas, tres gestaciones y dos recién nacidos vivos; así como los publicados por Zhai, que intervino a catorce pacientes con una gestación y un recién nacido vivo. En nuestro estudio hemos obtenido una mejor tasa de gestación, con cuatro gestaciones, un recién nacido vivo y dos gestaciones cursando su tercer trimestre tras catorce intervenciones. Esto puede deberse a varios motivos.

Por un lado, nosotros hemos incluido a pacientes con POI oculto, que son mujeres que clínicamente han entrado en el camino del fallo ovárico pero todavía no cumplen estrictamente todos los criterios necesarios para el diagnóstico de POI de la ESHRE. Nuestras gestaciones han ocurrido principalmente en este grupo de pacientes. Esto es congruente con la observación de Hsueh y Kawamura de que un menor tiempo de evolución del POI es un factor predictivo de éxito del IVA (70). Nosotros proponemos ampliar la posibilidad de intervención a mujeres con POI oculto sin necesidad de esperar a que se instaure el fallo ovárico completo aumentando así la posibilidad de éxito del tratamiento.

Por otro lado, los aspectos diferenciales de la técnica quirúrgica pueden haber contribuido a la mejora de las tasas

de gestación obtenidas en nuestro estudio. Prescindir del proceso de incubación con activadores de PI3K e inhibidores de PTEN no ha supuesto un impedimento para que se active el desarrollo folicular. Según las bases teóricas detalladas en la sección introductoria, probablemente el estímulo mecánico de la fragmentación con la consiguiente interrupción de la vía Hippo da lugar al crecimiento de los folículos preantrales a partir del estadio secundario, mientras que el estímulo químico mediante incubación en activadores de PI3K e inhibidores de PTEN promueve el crecimiento de los folículos desde el estadio primordial. Prescindir de la incubación nos ha permitido simplificar el procedimiento sin dejar de lograr la activación folicular. En cuanto a la localización del reimplante, es cierto que a primera vista podría parecer que se obtienen mejores resultados en las pacientes a las que se les realiza un reimplante mixto subcortical y peritoneal. Sin embargo, este tipo de abordaje se lleva a cabo cuando existe un excedente de fragmentos, es decir, está directamente relacionado con la cantidad de tejido ovárico extraído y este factor puede introducir un sesgo en la observación.

El hecho de que no hayamos detectado una correlación entre la presencia de folículos primordiales en las muestras de tejido ovárico analizadas y la consecución de crecimiento folicular visible por ecografía, a diferencia de Hsueh y Kawamura que han descrito esta variable como factor predictor del éxito del IVA, puede deberse a que solo destinábamos uno o dos

fragmentos de tejido por paciente al análisis histológico (unos 2 mm³) ya que nuestro objetivo era eminentemente clínico, frente al 10 - 20 % del volumen total de la corteza ovárica que analizaban ellos (70). Sabemos que los folículos primordiales no se distribuyen de forma homogénea a lo largo del ovario y si el número remanente de folículos primordiales es escaso puede ser comprensible que no sean detectados en fragmentos tisulares pequeños, siendo la biopsia ovárica un método poco sensible y específico para valorar la reserva folicular (87).

La principal limitación de este estudio es que no demuestra que haya tenido lugar la activación folicular a nivel bioquímico tras el procedimiento de fragmentación. Conscientes de esta limitación, hemos almacenado muestras de todas las pacientes intervenidas para poder realizar un análisis molecular a posteriori como parte de un estudio futuro.

CONCLUSIONES

- La activación in vitro de folículos por fragmentación ovárica aumenta el *pool* de folículos antrales en pacientes pobres respondedoras.
- Dicho aumento no se traduce en una mejor respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada durante los tratamientos de FIV en términos de dosis de gonadotrofinas empleadas, ovocitos obtenidos, embriones transferidos o tasas de gestación y recién nacido vivo.
- Si bien el estudio no fue diseñado para demostrar diferencias en las variables mencionadas en el párrafo anterior, de existir, su relevancia clínica parece mínima.
- La activación in vitro de folículos por fragmentación ovárica aumenta el *pool* de folículos antrales en pacientes POI.
- Las tasas de gestación en nuestra serie de pacientes POI aumentaron tras activación folicular en comparación con las tasas de gestación de pacientes POI no intervenidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction*. 2011;26(7):1616-24.
2. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocrine Reviews*. 2009;30(5):465-93.
3. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update*. 2012;18(1):73-91.
4. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocrine Reviews*. 2015;36(1):1-24.
5. Strauss JF, Barbieri RL. The ovarian life cycle. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013. p. 160-72.
6. Adhikari D, Liu K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocrine Reviews*. 2009;30(5):438-64.
7. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*. 2001;264:29-41.
8. Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol*. 2007;21:2189-202.
9. McLaughlin EA, McIver SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*. 2009;137:1-11.
10. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update*. 2014;20(3):370-85.

11. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reproduction*. 1986;1(2):81-7.
12. Fabregues F, Balasch J. Foliculogénesis: papel de la FSH y la LH. In: Bajo Arenas J, Coroleu Lletget B, editors. *Fundamentos de reproducción: Editorial Médica Panamericana*; 2009. p. 24-6.
13. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human Reproduction Update*. 2006;12(6):685-718.
14. Weenen C, Laven J, Von Bergh A, Cranfield M, Groome N, Visser J, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(2):77-83.
15. Broekmans F, De Ziegler D, Howles C, Alain Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril*. 2010;94(3):1044-51.
16. Broekmans FJ. Testing for Ovarian Reserve in Assisted Reproduction programs: the current point of view. *Facts, Views & Vision in ObGyn*. 2009;1(2):79-87.
17. te Verde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction Update*. 2002;8(2):141-54.
18. Eijkemans MJC, van Poppel F, Habbema DF, Smith KR, Leridon H, te Velde ER. Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2014;29(6):1304-12.
19. Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Human Reproduction*. 2004;19(7):1548-53.
20. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Human Reproduction*. 2005;20(4):923-7.

21. Streuli I, Fraisse T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, de Ziegler D. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertility and Sterility*. 2008;90(2):395-400.
22. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction Update*. 2010;16(2):113-30.
23. Arce J-C, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertility and Sterility*. 2013;99(6):1644-53.e1.
24. Lie Fong S, Baart E, Martini E, Schipper I, Visser J, Themmen A, et al. Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? . *Reprod Biomed Online*. 2008;16(5):664-70.
25. Lee T, Liu C, Huang C, Hsieh K, Lin P, Lee M. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reprod Biol Endocrinology*. 2009;7:100.
26. Khader A, Lloyd S, McConnachie A, Fleming R, Grisendi V, La Marca A, et al. External validation of anti-Müllerian hormone based prediction of live birth in assisted conception. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):3.
27. Li HWR, Lee VCY, Lau EYL, Yeung WSB, Ho PC, Ng EHY. Role of Baseline Antral Follicle Count and Anti-Müllerian Hormone in Prediction of Cumulative Live Birth in the First In Vitro Fertilisation Cycle: A Retrospective Cohort Analysis. *PLOS ONE*. 2013;8(4):e61095.
28. Rongieres C, Colella C, Lehert P. To what extent does anti-müllerian hormone contribute to a better prediction of live birth after IVF? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015;32(1):37-43.
29. Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJM. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF:

- comparison with the antral follicle count. *Fertility and Sterility*. 2009;91(3):705-14.
30. Pellicer A, Ardiles G, Neuspiller F, Remohi J, Simon C, Bonilla-Musoles F. Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal basal FSH levels using 3-D ultrasound. *Fertil Steril*. 1998;70:671-5.
31. Polyzos NP, Nwoye M, Corona R, Blockeel C, Stoop D, Haentjens P, et al. Live birth rates in Bologna poor responders treated with ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;28(4):469-74.
32. Gunby J, Bissonnette F, Librach C, Cowan L. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2007 results from the Canadian ART Register. *Fertility and Sterility*. 2011;95(2):542-7.
33. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Human Reproduction*. 2011;26(7):1768-74.
34. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Prospectively assessing risk for premature ovarian senescence in young females: a new paradigm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13(1):34.
35. Shestakova IG, Radzinsky VE, Khamoshina MB. Occult form of premature ovarian insufficiency. *Gynecological Endocrinology*. 2016;32(sup2):30-2.
36. Cox L, Liu JH. Primary ovarian insufficiency: an update. *International Journal of Women's Health*. 2014;6:235-43.
37. Luisi S, Orlandini C, Regini C, Pizzo A, Vellucci F, Petraglia F. Premature ovarian insufficiency: from pathogenesis to clinical management. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2015;38(6):597-603.
38. Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*. 2016;31(5):926-37.
39. Nelson LM. Primary Ovarian Insufficiency. *The New England journal of medicine*. 2009;360(6):606-14.

40. Willemsen R, Levenga J, Oostra B. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet.* 2011;80:214-25.
41. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertility and Sterility.* 2007;87(3):456-65.
42. van Kasteren Y, Hundscheid R, Smits A, Cremers F, van Zonneveld P, Braat D. Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum Reprod.* 1999;14:2455-9.
43. Nelson L, Anasti J, Flack M. Premature ovarian failure. In: Adashi E, Rock J, Rosenwaks Z, editors. *Reproductive endocrinology, surgery, and technology.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 1393-410.
44. Bedoschi G, Turan V, Oktay K. Fertility preservation options in women with endometriosis. *Minerva Gynecol.* 2013;65:99-103.
45. Bidet M, Bachelot A, Bissauge E, Golmard JL, Gricourt S, Dulon J, et al. Resumption of Ovarian Function and Pregnancies in 358 Patients with Premature Ovarian Failure. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;96(12):3864-72.
46. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Human Reproduction Update.* 2013;19(1):26-36.
47. Pellicer A, Ballester MJ, Serrano MD, Mir A, Serra-Serra V, Remohi J, et al. Etiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile women with normal basal FSH levels. *Hum Reprod.* 1994;9:906-11.
48. Mol BW, Verhagen TEM, Hendriks DJ, Collins JA, Coomarasamy A, Opmeer BC, et al. Value of ovarian reserve testing before IVF: a clinical decision analysis. *Human Reproduction.* 2006;21(7):1816-23.
49. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Human Reproduction Update.* 2003;9(1):61-76.

50. Youssef MA, van Wely M, Al-Inany H, Madani T, Jahangiri N, Khodabakhshi S, et al. A mild ovarian stimulation strategy in women with poor ovarian reserve undergoing IVF: a multicenter randomized non-inferiority trial. *Human Reproduction*. 2017;32(1):112-8.
51. Raga F, Bonilla-Musoles F, Casañ E, Bonilla F. Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. *Hum Reprod*. 1999;14(6):1431-4.
52. Rombauts L, Suikkari A, MacLachlan V, Trounson A, Healy D. Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril*. 1998;69:665-9.
53. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martinez-Salazar FJ, Landazabal A, Remohi J, et al. High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod*. 2000;15:2292-6.
54. Escriva AM, Diaz-Garcia C, Monterde M, Rubio JM, Pellicer A. Antral Follicle Priming Before Intracytoplasmic Sperm Injection in Previously Diagnosed Low Responders: A Randomized Controlled Trial (FOLLPRIM). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;100(7):2597-605.
55. Fábregues F, Peñarrubia J, Creus M, Manau D, Casals G, Carmona F, et al. Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. *Human Reproduction*. 2009;24(2):349-59.
56. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(43):17474-9.
57. Stein I, Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*. 1935;29:181.
58. Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in

anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012(6).

59. Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirow D, et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Annals of Medicine*. 2011;43(6):437-50.

60. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, et al. Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. *Science*. 2008;319(5863):611.

61. Fan H-Y, Liu Z, Cahill N, Richards JS. Targeted Disruption of Pten in Ovarian Granulosa Cells Enhances Ovulation and Extends the Life Span of Luteal Cells. *Molecular Endocrinology*. 2008;22(9):2128-40.

62. Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(22):10280-4.

63. Kim D, Shu S, Coppola MD, Kaneko S, Yuan ZQ, Cheng JQ. Regulation of proapoptotic mammalian ste20-like kinase MST2 by the IGF1-Akt pathway. *PLoS One*. 2010;5(3):e9616.

64. Pan D. Hippo signaling in organ size control. *Genes & Development*. 2007;21(8):886-97.

65. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:63-70.

66. Cheng Y, Feng Y, Jansson L, Sato Y, Deguchi M, Kawamura K, et al. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *The FASEB Journal*. 2015;29(6):2423-30.

67. Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee S-J, Anders RA, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & Development*. 2012;26(12):1300-5.

68. Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K-I, Yonemura S, Tao C, Sasaki H, et al. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *The EMBO Journal*. 2011;30(12):2325-35.

69. Fernández BG, Gaspar P, Brás-Pereira C, Jezowska B, Rebelo SR, Janody F. Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development*. 2011;138(11):2337.
70. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*. 2015;30(3):608-15.
71. Woodruff TK, Shea LD. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011;28(1):3-6.
72. Donnez J, Dolmans M-M, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and Sterility*. 2013;99(6):1503-13.
73. Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertility and Sterility*. 2004;82(3):679-85.
74. Jiang B-H, Liu L-Z. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Advances in cancer research*. 2009;102:19-65.
75. Díaz-García C, Milenkovic M, Groth K, Dahm-Kähler P, Olausson M, Brännström M. Ovarian cortex transplantation in the baboon: comparison of four different intra-abdominal transplantation sites. *Human Reproduction*. 2011;26(12):3303-11.
76. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Human Reproduction Update*. 2009;15(6):649-65.
77. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans M-M, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011;23(2):160-86.

78. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Kreienberg R, Woriedh M, et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction*. 2009;138:319-27.
79. Lee J, Kong HS, Kim EJ, Youm HW, Lee JR, Suh CS, et al. Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice: a comparative study between cryoinjury and ischemic injury. *Human Reproduction*. 2016;31(8):1827-37.
80. Veeck L. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology*. New York, USA: Parthenon Publishing; 1999. p. 46-51.
81. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility*. 1999;71(5):836-42.
82. Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Human Reproduction*. 2005;20(11):3008-11.
83. Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, et al. In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(11):4405-12.
84. Teramoto S, Kato O. Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: a large-scale retrospective study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;15(2):134-48.
85. Haadsma ML, Mooij TM, Groen H, Burger CW, Lambalk CB, Broekmans FJM, et al. A reduced size of the ovarian follicle pool is associated with an increased risk of a trisomic pregnancy in IVF-treated women. *Human Reproduction*. 2010;25(2):552-8.
86. Sunkara SK, Khalaf Y, Maheshwari A, Seed P, Coomarasamy A. Association between response to ovarian stimulation and miscarriage following IVF: an analysis of 124

351 IVF pregnancies. *Human Reproduction*. 2014;29(6):1218-24.

87. Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R. Assessment of ovarian reserve: Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Human Reproduction*. 2004;19(5):1055-9.

Anexo 1: dictamen del comité ético de investigación biomédica.



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafin Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **14 de enero de 2014**, el Proyecto de Investigación titulado **“ACTIVACIÓN FOLICULAR EN PACIENTES CON BAJA RESPUESTA OVÁRICA MEDIANTE FRAGMENTACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO.”**, con nº de registro **2014/0004**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. CESAR DIAZ GARCIA** del servicio de **REPRODUCCION** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. JUAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)
Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)
Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)
Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)
Dra. REMEDIOS CLEMENTE GARCIA ((Medicina Intensiva) (Miembro CBA))
Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)
Dr. RAMIRO JOVER ATIENZA (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)
Dr. FRANCISCO PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)
Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)
Dr. JOSE LUIS PONCE MARCO ((Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)
Dr. JOSE LUIS VICENTE SANCHEZ (Jefe de sección-Unidad de Reanimación)
Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)
Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA (Gerente del Departamento de salud nº 7-La Fe)
Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL ((Gastroenterología Pediátrica)
Dr. ISIDRO VITORIA MIÑANA (Pediatria)

Dra. EUGENIA PAREJA IBARS (Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático)
Dr. JAIME SANZ CABALLER (Investigador del Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)
Dra. MARIA LUISA MARTINEZ TRIGUERO (Análisis Clínicos)
Dra. MARIA TORDERA BAVIERA (Farmacéutica del Hospital)
Dr. JESUS DELGADO OCHANDO (Diplomado en Enfermería) (Miembro Comisión de Investigación)
Dr. JOSE MULLOR SANJOSE (Investigador del Grupo de Investigación Traslacional en Enfermedades Neurosensoriales)
Dr. JOSE ANTONIO AZNAR LUCEA (Jefe de Unidad - Hemostasia y Trombosis)
Dr. ENRIQUE VIOSCA HERRERO (Jefe de Servicio - Medicina Física y Rehabilitación)
Dr. RAFAEL BOTELLA ESTRADA (Dermatología)

Lo que firmo en Valencia, a 14 de enero de 2014



Fdo.: Don Serafin Rodriguez Capellán D.
Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica