

Cociente FSH/LH en la estimulación ovárica:
influencia en los resultados de la FIV en mujeres
mayores de 35 años.

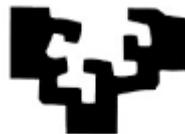
Fermín Aspichueta Vivanco
Tesis Doctoral UPV-2018

DIRECTORES

Roberto Matorras Weinig
Antonia Expósito Navarro

Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario
Cruces, Bilbao

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Agradecimientos:

A mi director de tesis, el Dr. Roberto Matorras Weinig. Gracias por darme la oportunidad de comenzar este trabajo y por introducirme en el mundo de la reproducción humana.

A la Dra. Antonia Expósito Navarro, codirectora de este trabajo, muchas gracias por todo lo que me enseñaste, por haber tenido la paciencia de enseñarme tan bien. Muchas gracias Toñi.

A Lorena Crisol, una de las mejores compañeras que he tenido y que tanto nos ayudamos.

A mis antiguos compañeros del servicio de Ginecología del Hospital de Cruces, en especial a la Dra. Begoña Prieto. Así como a los compañeros del servicio de Reproducción humana, en especial a Paula y a Charo que me ayudaron en la elaboración de este trabajo.

A Blanca Corral, por toda su ayuda en la fase final.

A los compañeros del IVI Bilbao.

A Teresa Visus, por su insistencia en que este trabajo acabara de la mejor manera.

A mi familia, en especial a Fermina y Pedro, mis padres.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
INTRODUCCIÓN	2
A. <i>BREVE HISTORIA</i>	<i>2</i>
B. <i>CONCEPTO DE ESTIMULACIÓN OVARICA.....</i>	<i>2</i>
B.1. Inducción ovárica.....	2
B.2. El ciclo ovárico	4
B.3. Estimulación ovárica	9
B.4. Pautas de estimulación	16
B.4.1 Agonistas:	18
B.4.1.1. Protocolo largo.....	19
B.4.1.2. Protocolo corto	21
B.4.1.3. Protocolo ultracorto.....	22
B.4.2. Antagonistas.....	23
B.4.2.1. Protocolo de dosis múltiples.....	24
B.4.2.2. Protocolo de dosis múltiples.....	24
C. <i>ASPECTOS DE LABORATORIO EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA</i>	<i>26</i>
C.1. Recuperación de los ovocitos	26
C.2. Preparación del semen para la fecundación	27
C.3. Inseminación ovocitaria: FIV-ICSI.....	28
C.3.1. Inseminación convencional (FIV).....	28
C.3.2. Inyección intracitoplasmática (ICSI).....	28
C.4. Fecundación.....	29
C.5. Cultivo secuencial hasta blastocisto	29
C.6. Transferencia embrionaria	30
C.7. Vitrificación embrionaria	31
D. <i>RESULTADOS</i>	<i>32</i>
E. <i>RIESGOS.....</i>	<i>33</i>
E.1. Hemorragia postpunción	33
E.2. Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO)	34
E.3. Embarazo múltiple	36
E.4. Embarazo ectópico.....	37
E.5. Defectos congénitos.....	38
E.6. Anomalías cromosómicas.	38
F. <i>CONTROL DE CALIDAD.....</i>	<i>39</i>
G. <i>PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</i>	<i>39</i>
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	43
A. <i>OBJETIVO PRINCIPAL.</i>	<i>44</i>
B. <i>OBJETIVOS SECUNDARIOS.</i>	<i>44</i>
MATERIAL Y MÉTODOS	45

A.	<i>DISEÑO DEL ESTUDIO</i>	46
B.	<i>INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO DE LOS SUJETOS</i>	46
C.	<i>POBLACIÓN DEL ESTUDIO</i>	46
D.	<i>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</i>	46
E.	<i>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</i>	47
F.	<i>ASPECTOS ÉTICOS</i>	47
G.	<i>CRITERIOS DE RETIRADA O ABANDONO DEL TRATAMIENTO A LAS PARTICIPANTES</i>	48
H.	<i>DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO</i>	49
G.1.	Grupo (300/150):.....	49
G.2.	Grupo (300/75):.....	49
I.	<i>TRATAMIENTOS PREVIOS</i>	51
J.	<i>EJECUCIÓN DEL TRATAMIENTO</i>	51
K.	<i>SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO</i>	52
L.	<i>VARIABLES DE ESTUDIO</i>	52
L.1.	Variables de identificación	52
L.2.	Datos recogidos en la historia de la paciente.....	53
L.3.	Datos del ciclo FIV/ICSI.	53
L.3.1.	Procesamiento de semen	53
L.3.2.	Punción folicular	54
L.3.3.	Clasificación de la madurez ovocitaria.....	54
L.3.4.	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	55
L.3.5.	Valoración de la fecundación	55
L.3.6.	Clasificación de los embriones.....	56
L.3.7.	Dosis total acumulada de recFSH y reclH	56
L.3.8.	Embriones transferidos y tasa de implantación.....	57
L.3.9.	Número de embarazos según criterio bioquímico.....	57
L.3.10.	Número de embarazos clínicos.....	57
L.3.11.	Evaluación del embarazo	57
M.	<i>VALIDEZ DE LAS DETERMINACIONES</i>	57
N.	<i>VARIABLE PRINCIPAL PARA LA EFICACIA</i>	58
O.	<i>GARANTÍA DE CALIDAD DE LOS DATOS</i>	58
P.	<i>ESTUDIO DE COSTES</i>	58
Q.	<i>ANÁLISIS DE DATOS Y ESTUDIO ESTADÍSTICO</i>	58
	RESULTADOS	60
A.	<i>SUJETOS BAJO ESTUDIO</i>	61
B.	<i>ANÁLISIS DE LOS SUJETOS BAJO ESTUDIO</i>	63
B.1.	Serie de datos bajo análisis.....	63
C.	<i>ANÁLISIS PRINCIPAL POR PROTOCOLO (PP)</i>	64
C.1.	Descripción de la muestra	64
C.2.	Características de la infertilidad.....	65
C.3.	Características del seminograma:	66

D.	<i>ANÁLISIS PRINCIPAL POR INTENCIÓN DE TRATAR (ITT)</i>	67
D.1.	Descripción de la muestra	67
D.2.	Características de la infertilidad:	68
D.3.	Características del seminograma	69
E.	<i>ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA</i>	69
E.1.	Análisis por protocolo (PP)	69
E.2.	Análisis por intención por tratar (ITT)	70
F.	<i>ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DEL LABORATORIO:</i>	70
F.1.	Variables del laboratorio	71
F.1.1.	Variables del laboratorio por PP	71
F.1.2.	Variables del laboratorio por ITT	72
F.2.	Tasa de fecundación	73
F.2.1	Tasa de fecundación por PP	73
F.2.2.	Tasa de fecundación por ITT	73
F.3.	Calidad embrionaria	73
F.3.1	Calidad embrionaria por PP	74
F.3.2.	Calidad embrionaria por ITT	74
F.4.	Tasa de implantación:	75
F.4.1.	Tasa de implantación por PP:	75
F.4.2.	Tasa de implantación por ITT:	75
F.5.	Tasa de gestación	76
F.5.1.	Tasa de embarazo por PP:	76
F.5.2.	Tasa de embarazo por ITT	76
G.	<i>EVOLUCIÓN DEL EMBARAZO</i>	77
G.1.	Evolución del embarazo por PP	77
G.2	Evolución del embarazo por ITT	78
H.	<i>GASTO EN MEDICAMENTOS:</i>	78
I.	<i>COMPLICACIONES</i>	80
	DISCUSIÓN	81
A.	<i>POBLACIÓN DE ESTUDIO</i>	86
B.	<i>ACTIVIDAD LH</i>	86
C.	<i>POBLACIONES ANALIZADAS</i>	88
D.	<i>LIMITACIONES: BAJAS RESPONDEDORAS</i>	100
E.	<i>NUEVAS CONSIDERACIONES</i>	101
	CONCLUSIONES	103
	BIBLIOGRAFÍA	105

ABREVIATURAS

BR	Bajas respondedoras
BPC	Buena práctica clínica
C.C	Citrato de clomifeno
CCO	Complejo cúmulo-corona-ovocito
CEIC	Comité ético de investigación clínica
CP	Corpúsculo polar
Da	Dalton
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FIV	Fecundación in-vitro
FIVTE	Fertilización in vitro y transferencia embrionaria
F/I	FIV/ICSI
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
hCG	Hormona gonadotropina coriónica
H-H-O	Eje hipotálamo –hipófisis – ovario
hMG	Gonadotropina menopáusica humana
IAC	Inseminación artificial conyugal
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de masa corporal
ITT	Intención por tratar
LH	Hormona luteinizante
MI	Metafase I
MII	Metafase II
Mm	Milímetros
OR	Odds ratio
OMS	Organización mundial de salud
pg/mL	Picogramos/mililitro
PN	Pronúcleos
PP	Por protocolo
PRL	Prolactina
ROA	Reserva ovárica anormal
r.p.m.	Revoluciones por minuto
rec-FSH	Hormona folículo estimulante recombinante
rec-LH	Hormona luteinizante recombinante
RNV	Recién nacidos vivos
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
TRA	Tratamiento de reproducción asistida
TSH	Hormona estimulante de tiroides
uFSH	SH urinaria
UI/L	Unidades internacionales/litro
uMG	Gonadotropina menopáusica urinaria

URH	Unidad de Reproducción Humana
VEGF	Factor de crecimiento folicular vascular endotelial
VG	Vesícula germinal

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

A. BREVE HISTORIA

El primer recién nacido vivo producto de una fecundación *in-vitro* (*FIV*) data de 1978 con el nacimiento de Louis Brown en Inglaterra gracias al trabajo de Robert G. Edwards y Patrick Steptoe (Steptoe and Edwards, 1978). Aunque la historia de *FIV* comienza mucho antes. Heape, en 1890, transfirió embriones de conejo a una coneja naciendo días más tarde (Heape, 1891). A finales de la década de los 50, Chang continuó y confirmó los primeros estudios de Heape, a través de la capacitación espermática, con el nacimiento de unos conejos gracias a *FIV* (Chang, 1959).

Los pasos claves a la hora de poner a punto el *FIV* fue el desarrollo de medios de cultivo para el correcto desarrollo embrionario, la ya comentada capacitación espermática y, por último, y no por ello menos importante, la obtención de ovocitos maduros y viables.

B. CONCEPTO DE ESTIMULACIÓN OVARICA

B.1. Inducción ovárica

El ovario tiene dos funciones esenciales: la liberación periódica de óvulos y la secreción de hormonas esteroideas. Ambas funciones están integradas en un ciclo continuo de crecimiento y maduración folicular, ovulación, formación y ulterior involución del cuerpo lúteo, todo lo cual constituye el ciclo ovárico (Balasch, 2010). Éste está influenciado bajo la acción de dos hormonas hipofisarias como son la hormona folículo estimulante (Folotropina-FSH) y la hormona luteinizante (lutropina-LH).

El ovario tiene la capacidad para producir estrógenos, andrógenos y progestágenos. Los andrógenos son secretados por células de la teca y el estroma bajo la influencia de la LH, siendo precursores de la producción de estrógenos. Éstos tienen la propiedad de estimular la aparición de los caracteres secundarios femeninos y mantenerlos; pueden ser sintéticos (estradiol), no esteroideos. La conversión a estrógenos tiene lugar en las células de la granulosa mediante la acción de la enzima aromatasa y bajo el efecto de la FSH. Los prostágenos son sustancias esteroideas cuya misión fundamental es asegurar la continuidad del embarazo. Pueden ser naturales (progesterona) o sintéticos.

Inicialmente se usó el ciclo natural, usando el pico natural espontáneo de LH para conseguir un ovocito maduro. Este procedimiento no resultó tan fácil como se esperaba ya que conseguir el óvulo resultaba complicado debido a que sólo había uno y además se producían ovulaciones prematuras. Con la aparición de las gonadotropinas se consiguió el desarrollo de múltiples folículos y así aumentar el número de óvulos. Actualmente se intenta reproducir este evento, mediante la administración de hormona gonadotropina coriónica (hCG), ya que esta tiene una constitución muy similar a la LH y consigue actuar sobre los receptores de esta, produciendo el mismo efecto.

El momento de aplicación de la hCG varía de acuerdo al tipo de ciclo de estimulación ovárica que se esté llevando a cabo.

- Por ecografía: folículo mayor entre 18 y 20 milímetros (mm) de diámetro medio.
- Por análisis de sangre: estradiol en suero >200 picogramos/mililitro (pg/mL) (por cada folículo mayor de 17 mm).

Con la aparición en 1980 de los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se evitaba esa ovulación prematura que ocurría en un porcentaje considerable de ciclos.

El paso de la inducción de la ovulación es extremadamente importante, hasta el punto que las tasas de embarazo dependen directamente del número de óvulos obtenidos, los cuales se relacionan con el número de embriones óptimos que serán usados en la transferencia.

Figura 1: Inducción de la evolución



B.2. El ciclo ovárico

La hipófisis y el hipotálamo, a través de neurotransmisores, son los encargados de llevar a cabo la función reproductiva. Desde el hipotálamo se secretan hormonas como por ejemplo la GnRH, ésta a través del sistema portal llega a la hipófisis o glándula pituitaria, donde controla la secreción de gonadotropinas, como son la LH, FSH y la prolactina (PRL). La GnRH es secretada de manera pulsátil y por tanto también las gonadotropinas. Varía con los ciclos y se calcula que la secreción se produce cada 90 minutos en la fase folicular precoz y cada 200 minutos al final de la fase lútea

La hipófisis tiene dos partes, la anterior y la posterior. La anterior o adenohipófisis es donde se secretan la FSH, LH y PRL. En la posterior la oxitocina y la vasopresina. La FSH y la LH son secretadas por la célula gonadotropa, que es sensible a la estimulación pulsátil por la GnRH.

Esas pulsaciones de GnRH están reguladas por:

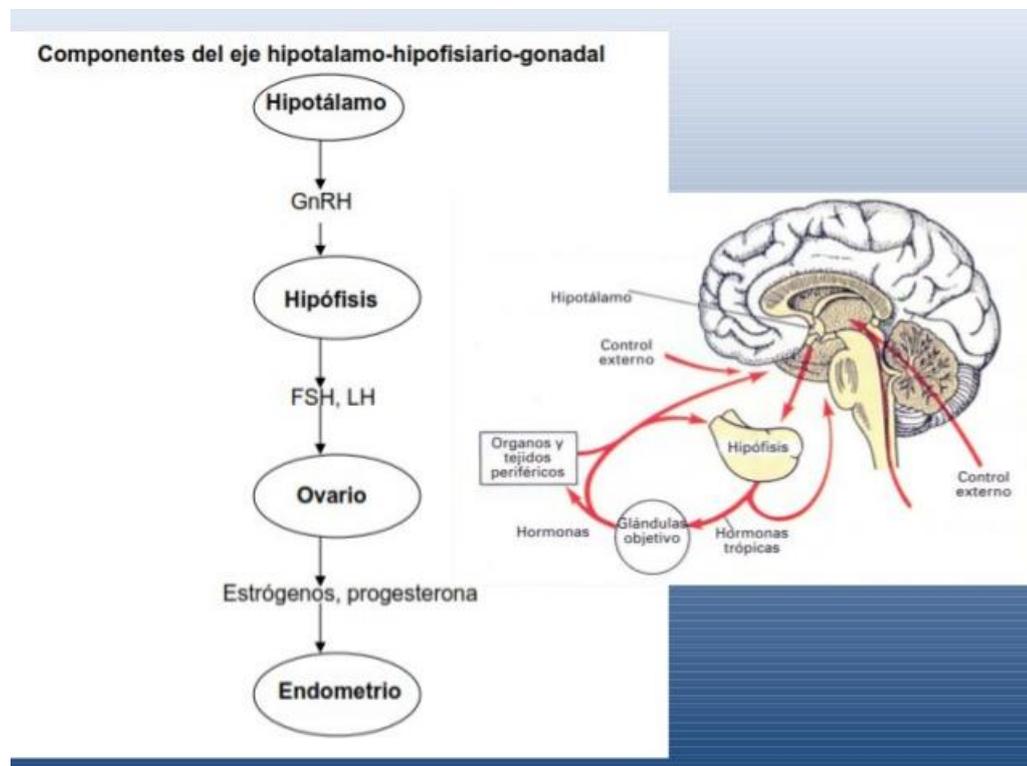
- Opioides endógenos: Dentro de los cuales residen las endorfinas, encefalinas y dinorfinas. El aumento de endorfinas puede inhibir la secreción de GnRH y por tanto la de gonadotropinas
- Catecolestrágenos

- Glándula Pineal

Existen centros de retroalimentación (*feed-back*) en el hipotálamo e hipófisis, que están directamente relacionados con los ovarios. Esta retroalimentación es el eje principal para un correcto ciclo ovárico y por tanto de la producción del ovocito maduro una vez al mes.

El desarrollo folicular comienza con un reclutamiento inicial, fase folicular, donde los folículos primordiales abandonan su estadio inactivo y restablecen su desarrollo, así, gracias a factores desconocidos e independientes a la estimulación con gonadotropinas estimulan el crecimiento de los folículos primordiales. Estos son la fuente de ovocitos en la vida reproductiva de la mujer. Sin embargo, un solo folículo es el que logra la evolución definitiva en cada ciclo. El “reclutamiento” comienza en la fase lútea del ciclo anterior, debido a la disminución de las concentraciones de estradiol y progesterona, provocando, por efecto de la retroalimentación, una acción estimuladora en el eje hipotálamo – hipófisis – ovario (H-H-O) y una elevación de las gonadotropinas.

Figura 2: Interacción H-H-O en el control del ciclo menstrual.



El reclutamiento culmina con la selección donde la cohorte folicular en maduración reduce su número. El folículo crea un ambiente donde su destino es la maduración y conseguir su ovulación. Este proceso es el resultado de dos acciones (Fritz et al., 1982). Por una parte, la unión de los estrógenos a la FSH en el folículo y por otra la acción de los estrógenos sobre la secreción de la hipófisis de la FSH.

Lo que sucede es que los estrógenos participan positivamente en la maduración de los folículos, pero este efecto tiene su retroalimentación negativa en la hipófisis. La caída de los niveles de FSH provoca una disminución de la actividad aromatasa y limita la producción de estrógenos en los folículos menos maduros, provocando la atresia folicular.

Así, el folículo reclutado o dominante, no sufre esa supresión de FSH ya que presenta un mayor número de receptores de FSH debido a que posee un mayor número de células de la granulosa por lo que la acción de la FSH es mayor por la alta concentración de estrógenos dentro del propio folículo. El folículo pasa a ser dominante una semana antes de la ovulación (Goodman et al., 1983).

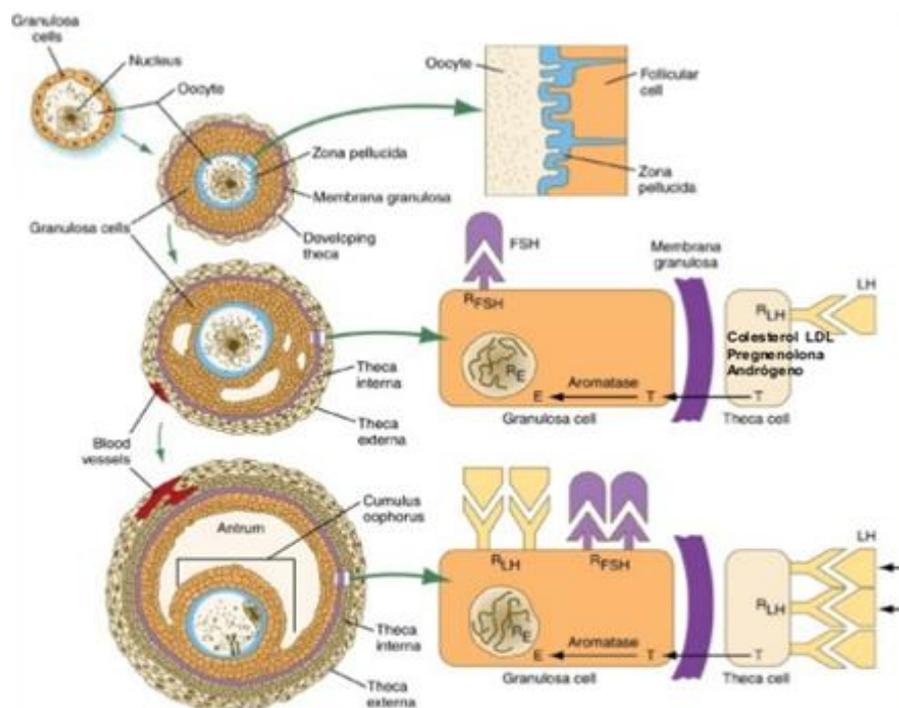
En cada ciclo menstrual, los niveles de FSH se elevan al final de la fase lútea debido a la disminución de los niveles de estradiol, progesterona e inhibina como consecuencia de la involución del cuerpo lúteo. Esta elevación de la FSH es la responsable de que una serie de folículos no entren en atresia (Welt et al., 1997), proceso denominado **reclutamiento folicular**, tras este proceso y a través de mecanismos poco conocidos el uno de esos folículos será *el elegido*. La inhibina producida por este folículo actúa sinérgicamente con los estrógenos en el control negativo sobre la secreción de la FSH en la hipófisis, de tal manera que al disminuir los niveles de FSH producida, los niveles de la misma son insuficientes para el crecimiento del resto de folículos de la cohorte que le dirigirá a la atresia. (Chikasawa et al., 1986). Ya en la fase preovulatoria, cuando el tamaño antral es máximo, la LH estimula la expresión de receptores de progesterona en las células de la granulosa del folículo elegido, promoviendo la luteinización del folículo y la producción de progesterona, que inhibe la proliferación de las células de la granulosa (Chaffkin et al., 1992). Por todo esto, aunque sólo se requiere la FSH para que se inicie la foliculogénesis, la esteroidogénesis completa en el ovario depende la LH. El folículo inicia su desarrollo sólo cuando valores circulantes de FSH se elevan por encima de un determinado umbral

y la duración de esa elevación será la responsable del número de folículos que maduren. De la misma forma, marcando un límite inferior de LH de 1,2 unidades internacionales/litro (UI/L) por debajo del cual no se lleva a cabo la, ya citada, esteroidogénesis. Incluso se ha descrito que niveles de LH inferiores a 0,5 UI/L se relacionan con aumento en la tasa de aborto (Westergaard et al., 2000).

En la primera etapa del ovocito, *folículo primordial o primario*, éste se ve sometido a un importante crecimiento, así como el de las células que lo rodean (células de la teca), viendo ya el *folículo antral*. Se adquiere el estadio de *folículo preovulatorio*, en el que se ve una capa de células de la granulosa especializadas llamadas cumulus oophorus. Se van viendo más cambios morfológicos y funcionales, como el de las células de la teca que producen andrógenos (testosterona) a través de la unión de la LH a sus receptores, así como la producción por parte de las células de la granulosa de estrógenos (estradiol) a través de la acción de la FSH. Todo este proceso lleva el nombre de “dos células – dos gonadotropinas” (Falck et al., 1959)

Pequeños y sostenidos incrementos de la LH periférica son necesarios para provocar el crecimiento y el desarrollo de los folículos antrales menores hasta el estadio preovulatorio (Richards et al., 1980)

Figura 3: Teoría de las 2 células – 2 gonadotropinas:
Vantman B, Vega M.
Revista Médica
Clínica Las Condes
2010; 21: 348-62.)



Los folículos crecen en los ovarios sin la ayuda de las gonadotropinas hasta el estadio de folículo antral temprano (folículos de Graaf). De aquí en adelante, la acción de las gonadotropinas, FSH principalmente, es un factor clave en el desarrollo de esos folículos antrales. La enzima P450 aromatasa de las células de la granulosa emplean a los andrógenos como sustrato para la producción de estradiol, favoreciendo el desarrollo folicular inducido por la FSH.

La regulación fisiológica de la foliculogénesis en ciclos espontáneos e inducidos con GnRH está relacionada, al parecer, con la acción de la LH sobre los folículos antrales mayores. Los folículos alcanzan un diámetro de 10-12 mm y tiene receptores de LH, llegados a este punto la FSH y la LH son igualmente efectivas para soportar y fomentar la función de las células de la granulosa (Filcori, 2003). La secreción de estrógenos y el crecimiento folicular sigue aumentando, aunque la FSH sea suspendida y reemplazada por la administración de hormona luteinizante recombinante (recLH). Por lo que se cree que el desarrollo de folículos mayores estimulados por LH es parcial o totalmente independiente de la FSH.

Por tanto, se sabe que tanto la FSH, como factores ovocitarios y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimulan el crecimiento folicular en el estadio antral. El EGF es el encargado de la expresión de los receptores de la LH y de la proliferación de las células de la granulosa, a su vez la expresión de los receptores de la LH es estimulada por la FSH, y así adquirir por parte de las células de la granulosa el fenotipo maduro.

Una vez que el folículo elegido alcanza un diámetro de alrededor de 14-15mm, aumentan los niveles de estradiol (24 a 36 horas antes de la ovulación) y el nivel circulante de éste provoca una inhibición en la secreción de LH, provocando así una acción estimulante. El aumento del estradiol junto con una descarga hipotalámica de GnRH, condicionan que se produzca el pico preovulatorio de LH. Éste induce la reanudación y culminación de la meiosis, la ruptura de la pared del folículo, así como la luteinización de las células de la granulosa para dar origen al cuerpo lúteo. También, gracias al pico de la LH, se expresan los receptores de progesterona, participando éstos en los fenómenos que acompañan a la ovulación. Se sabe que la participación de la progesterona implica un papel dominante contribuyendo a la relajación de la pared del folículo, aumento de su volumen y al acercamiento en la superficie del ovario.

El folículo dominante se convierte en cuerpo lúteo, que es una fuente de hormonas sexuales secretadas por el ovario durante la fase preovulatoria. El cuerpo lúteo involuciona y es remplazado por el cuerpo albicans. La fase menstrual dura de 4 a 6 días y se caracteriza por un aumento de la FSH y a su vez estimula la producción de inhibina B (Welt et al., 1997)

B.3. Estimulación ovárica

La finalidad a la hora de la estimulación ovárica en mujeres con gonadotropinas es la obtención de, a través de un desarrollo folicular múltiple, un número de ovocitos viables para, en último término, conseguir el tan deseado embarazo. Para conseguirlo, se administran gonadotropinas en dosis suficiente para superar el umbral de FSH de los folículos precursores, anular los mecanismos intraováricos endógenos de selección folicular y mantener el crecimiento de múltiples folículos preovulatorios. Esto se consigue habitualmente administrando las gonadotropinas bajo supresión hipofisaria con análogos de la GnRH (Balasch et al., 2001). Inicialmente, los preparados gonadotrópicos contenían gonadotropina menopáusica urinaria (uMG) que más tarde evolucionarían hacia FSH urinaria (uFSH) y más recientemente hacia rec FSH y rec LH. Recientemente, un nuevo grupo de fármacos ha aparecido recibiendo el nombre de corifolitropina alfa con un sistema de liberación retardado de rec FSH (Devroey et al., 2009).

El tratamiento con FSH al inicio de la estimulación ovárica es esencial para que se adquiera sensibilidad hacia la LH de modo que ésta sea capaz de sostener el desarrollo folicular desde la mitad hasta el final de la fase folicular. Las concentraciones de LH que existen tras la supresión hipofisaria con agonistas GnRH, son suficientes en la mayoría de las mujeres sometidas a fecundación in vitro y estimuladas con FSH sola. Se puede pensar que incorporar a todos los protocolos de estimulación ovárica la LH ya que es muy complicado conocer con exactitud las concentraciones exactas requeridas por cada paciente de esta hormona, existiendo evidencias claras de que no influye negativamente sobre los resultados. La LH ejerce un efecto directo sobre la estimulación y la modulación de la foliculogénesis. Es verdad que concentraciones elevadas de LH en la fase folicular son perjudiciales para el desarrollo folicular, provocando un empeoramiento en los resultados y sugiriendo que niveles altos de esta hormona afectan a los ciclos de

estimulación ovárica.

Sin embargo, existen estudios (Westergaad et al., 2000), que han sugerido que la supresión hipofisaria en algunas mujeres normogonadotropas podría tener como consecuencia la existencia de una depresión demasiado profunda de las concentraciones de LH, lo que comportaría un incremento significativo en el riesgo de abortos bioquímicos o clínicos tras la *FIV*. De acuerdo con dichos autores, la existencia de unos niveles demasiado bajos de LH (<0.5 IU/L) en el día 7-8 de la estimulación folicular en ciclos de fecundación asistida comportaría un defecto en las acciones de la LH sobre el complejo folículo - ovocito en la fase folicular media - avanzada, que mermaría la capacidad fecundante de los ovocitos y se asociaría a un incremento del riesgo de pérdida embrionaria. Existen indicios del efecto positivo de la LH (se acorta el tratamiento, menos consumo de gonadotropinas y disminuye el número de folículos menores). Aparece aquí, el valor mínimo o umbral, por debajo del cual la síntesis de estradiol es deficitaria y un valor máximo o techo, por encima del cual el crecimiento y el desarrollo folicular se ven perjudicados (Shoham, 2002)

Por todo esto, la administración de LH sólo será estrictamente necesaria en mujeres con hipogonadismo hipogonadotrópico, mientras que el hipotético efecto beneficioso de la LH sigue siendo objeto de debate (Levi-Setti et al., 2004)

Aquellas mujeres que responden peor al protocolo largo con agonistas de GnRH son las que piden más la acción de la LH y aquellas en las que se necesita cantidades excesivas de FSH para el desarrollo folicular.

El primer paso que se dio para la estimulación de la ovulación en mujeres anovuladoras fue gracias al uso del citrato de clomifeno (C.C), éste fue el primero de una gran lista de fármacos que en la actualidad son los encargados de inducir la respuesta ovárica, así como la maduración ovocitaria. El uso de C.C. ha disminuido drásticamente una vez que aparecieron las gonadotropinas, éstas son el tratamiento de primera elección en pacientes con disfunción hipoestrogénica. Existen varios tipos de gonadotropinas, tanto de origen urinario como recombinante, que junto a los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), agonistas o antagonistas, son los responsables de la búsqueda maduración folicular múltiple.

- Agonistas de la GnRH

Esta hormona, producida en el hipotálamo fisiológicamente, estimula la liberación de gonadotropinas hipofisarias. Al administrar exógenamente esta hormona conseguiremos un estímulo hipofisario, *flare up*, seguido de un bloqueo reversible en la liberación hipofisaria de FSH y LH. La finalidad en su uso es evitar un pico prematuro de LH, producido éste, al aumentar los niveles de estrógenos en sangre con el incremento en el tamaño de los folículos en desarrollo. Como consecuencia de este pico de LH los folículos se luteinizan y se liberan los ovocitos con la consecuente pérdida de los mismos.

Existen diferencias si ese pico de LH viene inducido por el agonista o si estamos trabajando respecto al ciclo natural: si viene inducido por agonistas se liberan menos gonadotropinas hipofisarias, por lo que la fase lútea se expresa defectuosamente (Humaidan et al., 2010).

- Antagonistas de la GnRH

Estos suprimen en el transcurso de horas la liberación de gonadotropinas, por lo que el fenómeno del *flare up* provocado por lo agonistas no aparece. Conseguimos evitar el pico prematuro de LH endógeno.

Tabla 1: Tipo de gonadotropinas

TIPOS DE GONADOTROPINAS	
Hormona foliculoestimulante recombinante alfa (α FSH-r)	Inyectable subcutánea (SC)
Hormona foliculoestimulante recombinante beta (β FSH-r)	Inyectable SC
Hormona luteinizante recombinante (LH-r)	Inyectable SC
Gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG-r)	Inyectable SC
Gonadotropina coriónica humana urinaria (hCH-u)	Inyectable intramuscular (IM)

- Gonadotropina menopáusica humana (hMG):

Obtenida por purificación a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas. Se suministra en viales que contienen 75 UI de FSH más 75 UI de efecto LH y proteínas contaminantes.

Su mecanismo de acción se basa en que junto con su componente FSH recluta folículos ováricos y estimula su crecimiento, la LH provoca la maduración, sin ser suficiente para provocar la ovulación.

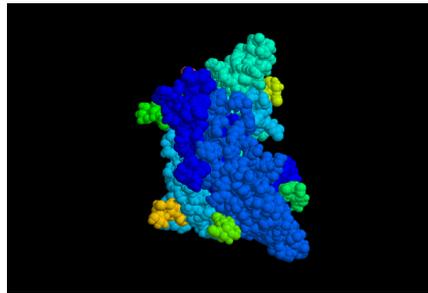
Tanto la FSH como la LH son esenciales en la regulación gonadal, esenciales para la maduración ovocitaria en mujeres y la espermatogénesis en varones.

- Hormona Foliculoestimulante (FSH):

El avance farmacológico con esta molécula ha sido enorme, hasta obtener una FSH humana por recombinación genética, se trata de una molécula altamente purificada. Su mecanismo de acción determina el desarrollo de las células granulosas ováricas, iniciando el crecimiento folicular y el incremento de inhibina B. Junto con la LH estimulan la ovulación. Estimula la conversión de andrógenos en estradiol e incrementa el número de receptores para la LH. El ligero incremento de FSH al final de la fase lútea parece importante para iniciar el siguiente ciclo ovulatorio.

La FSH es una glicoproteína compuesta por dos unidades monoméricas de proteína enlazada a una molécula de azúcar. El dímero contiene dos unidades polipeptídicas, las subunidades alfa y beta. La FSH tiene una subunidad beta de 118 aminoácidos (FSH- β), que le confiere su acción biológica específica y es responsable de la interacción con el receptor de FSH. La parte de azúcar de la hormona se compone de fucosa, galactosa, manosa, galactosamina, glucosamina y ácido siálico, siendo éste último fundamental para su vida media biológica. La vida media de la FSH es 3-4 horas. Su peso molecular es 30000 daltones (Da).

Figura 4: Imagen tridimensional de la molécula de FSH



- Hormona Luteinizante (LH):

La hormona luteinizante es un heterodímero con un peso molecular aproximado de 30000 Da. Está compuesta por dos subunidades, la α y la β . La subunidad α (también llamada subunidad común) de la hormona estimulante de tiroides (TSH), de la hCG, y de la FSH es idéntica a la de la LH. Contiene 92 aminoácidos hasta alcanzar un peso molecular de 14.600 Da. La subunidad β contiene 112 – 114 aminoácidos, con seis puentes disulfuro y un peso molecular de 14.800 Da. Esta subunidad es única para cada hormona y es la responsable de ejercer la especificidad biológica e inmunológica.

La estructura bioquímica de la LH se corresponde como un dímero glucoproteico formado por dos subunidades proteínicas unidas por enlaces no covalentes (α y β). La hormona contiene cuatro cadenas glucídicas unidas por una asparagina, dos de ellas se unen a la subunidad α y las otras a las β (Chappel, 1995). El tamaño total de la molécula glucosilada es de unos 40.000 Da.

Ya hemos comentado la necesidad de esta hormona a ciertas dosis en el proceso de estimulación ovárica, al usar gonadotropinas el problema se resuelve al recurrir a la hMG (FSH+LH). Al igual que con la FSH, con la LH, hemos obtenido una hormona altamente purificada y con una gran especificidad.

El gen de la subunidad alfa se encuentra en el cromosoma 6q 12.21. El gen de la subunidad beta está localizado en el grupo de genes LHB/CGB del cromosoma 19q 13.32.

Figura 5: Imagen tridimensional de la molécula de LH

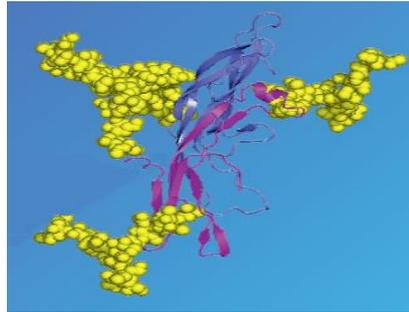


Tabla 2: Características de las gonadotropinas:

GONADOTROPINAS			
	hMG	FSH	LH
Mecanismo de acción	Su elemento FSH recluta y estimula folículos	Recluta folículos y estimula su crecimiento.	Estimula la maduración folicular
Indicaciones	Inducción de la ovulación	Inducción de la ovulación	Baja respuesta
	Hipogonadismo hipogonadotropo	Estimulación ovárica en tratamiento de reproducción asistida (TRA).	Mayores de 35 años.
	Disfunción hipotálamo hipofisaria grave.	Pacientes con niveles de LH elevados	Con FSH en pacientes con hipogonadismo – hipogonadotropo.
Ventajas	Desarrollo folicular múltiple en TRA.	Desarrollo folicular múltiple en TRA	Reduce el desarrollo de folículos menores.
		Máxima seguridad y eficacia.	
Inconvenientes	Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).	SHO	Elevado coste

- Gonadotropina coriónica humana (hCG)

Tras estimular el crecimiento folicular, debemos inducir la ovulación y esta hormona es la que, fundamentalmente, utilizamos. En los ciclos de estimulación ovárica el pico de la LH se produce con hCG, es importante cumplir los tiempos desde que introducimos la hCG hasta que puncionamos los folículos, intervalo que irá de las 34 – 38 horas.

Como en los otros casos, actualmente se dispone de hCG recombinante, además de la urinaria.

B.4. Pautas de estimulación

El éxito de los tratamientos de reproducción asistida depende, fundamentalmente, de una correcta elección en los protocolos elegidos a la hora de llevar a cabo la estimulación ovárica en las mujeres.

La mayoría de los casos se eligen tratamientos que reciben el nombre de superovulación, cuya finalidad es conseguir el correcto crecimiento y maduración de un número mayor de folículos y en su último fin conseguir embriones de la mejor calidad posible para obtener así las mejores tasas de implantación.

Lo ideal sería conseguir unas pautas de estimulación ovárica en las que las tasas de cancelación sean lo más bajas posibles, disminuir al máximo los riesgos y efectos secundarios, coste bajo y en último término optimizar la búsqueda del embarazo único buscando con esas estimulaciones ovocitos de la mejor calidad posible.

Se tendría que conseguir seguir unas pautas individualizadas, basadas en la edad de la paciente, sus estimulaciones previas, si las ha tenido, así como la reserva ovárica.

A partir del éxito, ya comentado, de Steptoe y Edwards en 1978 donde consiguieron el ansiado embarazo en un ciclo natural sin ayuda de gonadotropinas exógenas, la administración exógena de fármacos ha ayudado crucialmente a las pacientes sometidas a *FIV*. El número de cancelaciones disminuyó mientras que el número de ovocitos obtenidos en punción aumentó, por lo que las tasas de gestación aumentaron. En contraposición, la estimulación ovárica en *FIV* tiene, principalmente, dos importantes inconvenientes: el SHO y el embarazo múltiple (Pelinck et al., 2002), entre otros muchos que más adelante comentaremos. Por esto último el **ciclo natural** es una opción que en ciertos pacientes puede ser la adecuada. Éstos tienen que tener un determinado perfil, que tengan una baja reserva ovárica, sanos y con una buena respuesta. Evidentemente, tiene puntos negativos como que tenemos que llevar a cabo más ciclos que en una *FIV* convencional, hay mucho más riesgo de fracaso en cada paso de todo el proceso, aumenta la tasa de cancelación por el pico prematuro de la hormona luteinizante u

obtenemos ovocitos postmaduros (Tarlatis and Kolibianakis, 2007).

Sin embargo, tenemos como lecturas positivas siempre que podamos llevar a cabo este tipo de ciclos que a menor dosis de gonadotropinas menor daño endometrial y aumenta de esta forma la receptividad del endometrio al embrión (Martínez-Conejero, 2007), así como, si todo va bien, conseguir un embarazo único.

Anteriormente hemos comentado que el uso de citrato de clomifeno en los protocolos de estimulación en nuestros días ha disminuido drásticamente. Éste fármaco induce el desarrollo de dos o más folículos en las mujeres con ovulación normal (Coughlan et al., 2010), aunque el número de ovocitos no suele exceder de 3 o 4 por ciclo. Existe la opción de pautar el citrato de clomifeno junto con gonadotropinas exógenas, incluso estudios publicados recientemente compararon dos protocolos de estimulación distintos, uno de ellos de citrato de clomifeno junto con gonadotropinas antagonistas de la GnRH versus el protocolo largo de agonistas de la GnRH, éste último el más habitual en los centros de reproducción asistida. Concluyeron que aunque obtuvieron más ovocitos en el protocolo largo, la madurez de los mismos así como las tasas de gestación, fueron similares en ambos grupos (Lin et al., 2006). Además, se concluía que existía una reducción significativa en la dosis total de gonadotropinas necesarias.

Con el uso y la administración de gonadotropinas exógenas, podemos controlar, de una manera bastante real, el momento exacto en el que los ovocitos pueden ser obtenidos del folículo ovárico. Así como, la obtención de un número elevado de ovocitos aumenta las probabilidades de conseguir embriones viables y, por tanto, la posibilidad de embarazo.

La finalidad de estas pautas de estimulación es la de conseguir un aumento de la concentración de gonadotropinas en la fase folicular temprana (Hodgen, 1982), permitiendo el reclutamiento de múltiples folículos antes de que se produzca la selección endógena del folículo dominante y la consecuente atresia del resto de la cohorte folicular.

El aumento de las gonadotropinas sobrepasa los mecanismos de control naturales, lo que proporciona un impulso para el desarrollo folicular (Baird, 1987). Este desarrollo se ajustará definiendo de la mejor manera posible el tiempo y la dosis de las gonadotropinas.

Los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas son péptidos sintéticos que han sufrido modificaciones en su estructura para alterar su afinidad por el receptor de la GnRH o para retrasar su aclaramiento metabólico, aumentando así su vida media y su actividad.

En sus comienzos, los análogos de la GnRH se utilizaron como adyuvantes en mujeres con antecedentes de resultados negativos en *FIV* (como, por ejemplo, picos prematuros de LH). En nuestros días además de evitar esos picos prematuros, conseguimos el aumento el número de ovocitos aspirados y fecundados y, por consiguiente, el número de embriones viables a transferir (Hughes et al., 1992).

En la actualidad, se nos presentan dos tipos de análogos de la GnRH:

- Antagonistas: éstos a su vez, se dividen en protocolo de dosis única y de dosis diaria y actúan uniéndose al receptor, bloqueándolo y provocando, con el paso de unas horas, la supresión hipofisaria.
- Agonistas: su administración continuada produce una estimulación de la secreción de gonadotropinas endógenas (efecto flare up), seguido de un efecto supresor producido por la desensibilización hipofisaria.

La aparición de los agonistas de GnRH para provocar la supresión hipofisaria supuso un paso fundamental en el desarrollo de la estimulación ovárica controlada.

B.4.1 Agonistas:

Hay tres protocolos en los que se utilizan **agonistas** de la GnRH, se eligen en función del momento del ciclo en el que empiezan a utilizarse y en su duración (Felberbaun and Diedrich, 1999)

- Protocolo largo: el agonista se administra a mitad de la fase lútea del ciclo previo.
- Protocolo corto: el agonista se administra entre el primer y el tercer día del ciclo, aprovechando el efecto flare up.

- Protocolo ultracorto: el agonista tan sólo se administra durante los tres primeros días del ciclo.

La base de todos estos protocolos es individualizar la dosis a cada mujer, ajustándolo a sus características para, de esta manera, obtener el mayor rendimiento ovárico, así como la menor aparición de efectos secundarios (SHO).

B.4.1.1. Protocolo largo

El **protocolo largo** es el más frecuentemente utilizado en las clínicas de reproducción asistida. Consiste en utilizar el agonista de GnRH desde la fase lútea media (21- 22 día ciclo) del ciclo precedente. Se acortará esta fecha si el ciclo menstrual de la paciente es inferior a 28 días.

Existen dos pautas básicas de tratamiento con gonadotropinas según la dosis utilizada:

1. Pauta inicial fijada: La pauta se inicia en el segundo o tercer día del ciclo menstrual con una dosis fija de gonadotropinas, previa ecografía para descartar la presencia de quistes funcionales y analítica (estradiol) para evaluar el grado de desensibilización de la hipófisis. Se mantiene esta pauta durante 5 días, a continuación, se solicita ecografía vaginal y estradiol; ajustando la dosis de gonadotropinas según la respuesta ovárica, posteriormente se monitoriza con ecografía y estradiol cada 48-72 horas.
2. Pauta descendente: Ésta se inicia, también, el segundo o tercer día del ciclo con una dosis de gonadotropinas que se mantiene durante 2 – 3 días, reduciéndose a una dosis menor y constante en los siguientes días. El tercer día de estimulación se recurre a analizar los niveles de estradiol, de tal manera que si se obtienen unos resultados entre 100 y 200 pg. se puede considerar que los ovarios han iniciado una respuesta correcta.

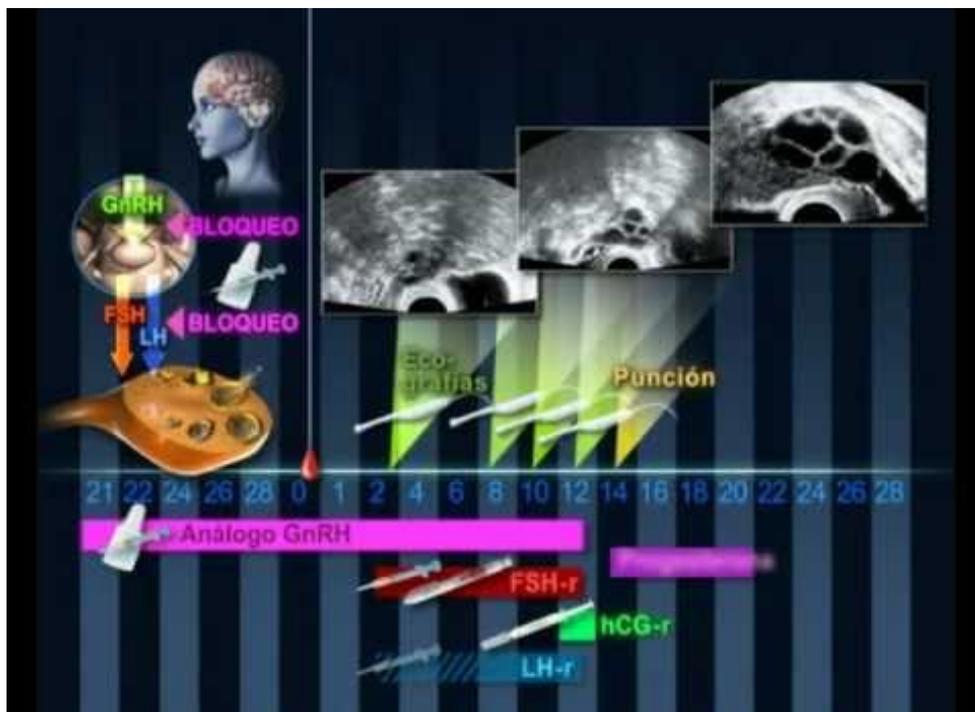
La administración de agonista de GnRH y gonadotropinas continúa hasta que se obtiene más de 3 folículos iguales o mayores de 18 mm por ecografía, y valoraremos los niveles sanguíneos de estradiol para decidir el momento más adecuado. En ese momento se administra HCG y se programa la punción 36 horas después. (Nader and Berkovitz, 1990).

Se administrará una dosis única que asemeja el pico de LH, que induce la ovulación de manera natural, produciendo el desprendimiento del ovocito de las células de la granulosa.

Anteriormente, ya se ha hablado de un umbral en los niveles de LH. Se sabe que para el correcto desarrollo y crecimiento del folículo y del ovocito se requieren unos niveles mínimos de LH (*umbral LH*). Esto explica que dosis demasiado elevadas pueden provocar la luteinización y la atresia folicular (*techo LH*) (Balasch et al., 1995).

Los análogos agonistas de GnRH, provocan niveles residuales bajos de LH, en la mayoría de los casos son suficientes para una correcta foliculogénesis, aunque en ocasiones puede sobrepasar ese *techo de LH* conllevando una disminución de la capacidad fecundante del ovocito y aumentando el riesgo de pérdida embrionaria (Westergaard et al., 2000). Se suele utilizar, asociada a la FSH recombinante, dosis bajas de LH recombinante desde el comienzo de la estimulación ovárica controlada.

Figura 6: Protocolo largo de agonistas de GnRH (Atlas de reproducción asistida del Dr. Herrero)



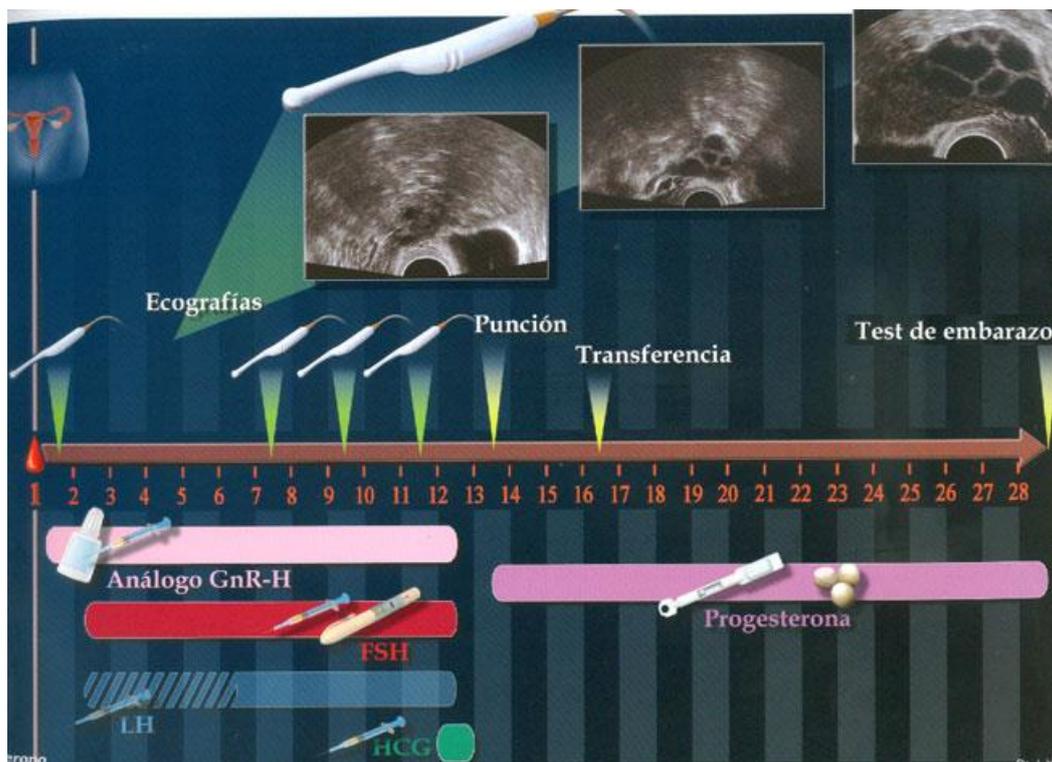
B.4.1.2. Protocolo corto

El **protocolo corto** se emplea sobre todo en pacientes con antecedentes de baja respuesta. Este protocolo se aprovecha del efecto estimulante (flare up) del agonista de GnRH, facilitando el reclutamiento folicular y disminuyendo la dosis total de gonadotropinas necesarias. Este efecto se suma al de las gonadotropinas. El inicio del agonista GnRH se da en la fase folicular temprana (primer día del ciclo), las gonadotropinas se empiezan a administrar en el segundo o tercer día del ciclo y la desensibilización de la hipófisis se presentaría al cuarto o quinto día de tratamiento. Esta estrategia impide una supresión ovárica tan profunda como la del protocolo largo, con la ventaja del estímulo de las gonadotropinas endógenas. De esta manera, la ventaja es doble, previene el pico endógeno de la LH y disminuye la dosis total de gonadotropinas.

El flare up inducido por el análogo de la GnRH se realiza a expensas de la LH, por lo que aumentan considerablemente las concentraciones de LH al inicio de la estimulación (a diferencia del protocolo largo donde los niveles de LH se mantienen constantes o disminuidos). Este incremento de la LH provoca una elevación en los niveles de progesterona y testosterona, por el propio efecto de la LH (Padilla, 1996). Utilizando protocolos de estimulación con minidosis podemos disminuir la dosis de análogos de la GnRH.

La administración de agonista y gonadotropinas continúa hasta la administración de HCG. La recuperación ovocitaria se lleva a cabo de 36 horas.

Figura 7: Protocolo corto de agonistas de la GnRH (Atlas de reproducción asistida del Dr. Herrero)



B.4.1.3. Protocolo ultracorto

El **protocoo ultracorto** consiste en la administración de análogos de la GnRH únicamente durante los primeros tres días del ciclo. Las gonadotropinas se administran en el segundo o tercer día del ciclo. Su uso está dirigido principalmente a las pacientes con antecedentes de baja respuesta. No siempre son eficaces en la prevención de la LH. (Acharya et al., 1992) Se ha visto que el protocolo largo es el que mejores tasas de embarazo ofrece. (Daya, 2007). Sus principales ventajas son:

- Se anulan, prácticamente, los picos prematuros de LH.
- El número de tratamientos disminuye por ovulaciones endógenas.
- Permite programar el día de la obtención ovocitaria.
- El crecimiento folicular es más sincrónico.

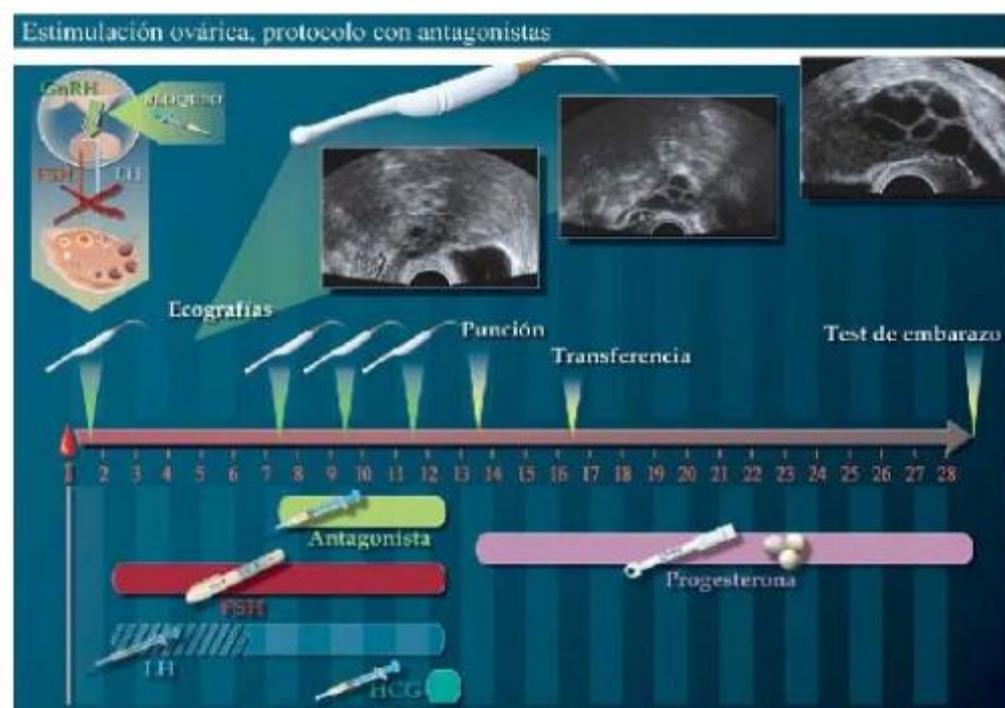
Por otra parte, existen inconvenientes:

- Provoca insuficiencia en el cuerpo lúteo, por lo que se necesita el uso de progesterona en la fase lútea.
- El número de SHO es mayor.
- Las dosis requeridas de gonadotropinas son más altas.

B.4.2. Antagonistas

En 1972 se sintetizó el primer **antagonista** de GnRH, tras la sustitución de múltiples aminoácidos de la molécula original. El mecanismo de acción es por medio de un bloqueo competitivo de los receptores para la GnRH, el cual es inmediato y no va acompañado del efecto estimulante hipofisario inicial (flare up) que se observa en los agonistas de GnRH, generando una disminución de la duración en los días de tratamiento (Hall et al.,1993).

Figura 8: Protocolo con antagonistas de la GnRH (Atlas de reproducción asistida del Dr. Herrero)



Se ha documentado la eficacia del antagonista de la GnRH en prevenir los picos prematuros de LH durante los ciclos de estimulación ovárica en fertilización in vitro y transferencia embrionaria (FIVTE) (Albano et al., 1996; Felberbaum et al., 2000). Los antagonistas de la GnRH actúan de forma competitiva, uniéndose al receptor, bloqueándolo y provocando así una supresión hipofisaria que se caracteriza por ser

profunda e inmediata. Este mecanismo de acción permite administrar los antagonistas de la GnRH en el transcurso de la estimulación ovárica. También se ha demostrado que el uso de antagonistas de la GnRH disminuye el número de días de estimulación; además de presentar menor riesgo de SHO (Albano et al., 2000).

Figura 9: Acción de los agonistas y antagonistas



De las diferentes pautas de tratamiento con antagonistas de GnRH en los ciclos de FIVTE, las más usadas son dos: protocolo dosis única y protocolo dosis múltiples.

B.4.2.1. Protocolo de dosis múltiples

El **protocolo de dosis múltiples** consiste en la administración diaria del antagonista de la GnRH desde el sexto día de estimulación ovárica con gonadotropinas hasta el día de la hCG. Se establece que la dosis de 0,25 mg/día es la dosis mínima adecuada para este protocolo. (Albano et al., 1998). Históricamente, este protocolo fue desarrollado por el grupo de Diedrich y cols, en la Universidad de Lübeck (Alemania), de esta ciudad recibe, también, el nombre este protocolo.

B.4.2.2. Protocolo de dosis única

El **protocolo de dosis única**, también llamado protocolo francés (desarrollado por Olivennes y cols.), consiste en la administración de una sola dosis de GnRH cuando el folículo mayor ha alcanzado un diámetro de 14mm. Si transcurridas 72 horas no se ha administrado la hCG, se administra una segunda inyección de antagonista. (Olivennes et

al., 1995). El estudio de dosis definitivo señaló como dosis mínima eficaz los 3 mg de antagonista de la GnRH en el protocolo de dosis única. (Olivennes et al., 1998).

Tanto el protocolo de dosis múltiple como el de dosis única son seguros y eficaces. Aunque está demostrado que la dosis de gonadotropinas, el número de días de administración de las mismas, así como el número de ovocitos recuperados en punción es significativamente menor que los obtenidos en el protocolo largo con agonistas de la GnRH. Esto conlleva una menor tasa de hospitalización debido al SHO. Por otra parte, varios estudios han demostrado que las tasas de gestación son ligeramente inferiores, no significativamente, en los grupos de pacientes tratadas con antagonistas respecto a las tratadas con agonistas

Tabla 3: Ventajs de los antagonistas de la GnRH frente a los agonistas (Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J et al, 2008. McGrawHill)

VENTAJAS DE LOS ANTAGONISTAS DE LA GnRH FRENTE A LOS AGONISTAS
Eliminación del efecto flare up por la liberación inicial de la FSH Y LH.
Comienzo de la estimulación ovárica coincidiendo con el reclutamiento folicular.
Utilización de menores dosis de gonadotropinas.
Realización de una estimulación más controlada y personalizada.
Posibilidad de usar el citrato de clomifeno (con o sin gonadotropinas).
Se puede inducir la ovulación con un agonista de la GnRH.
Menor coste.

C. ASPECTOS DE LABORATORIO EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La *FIV* consiste en una serie de técnicas cuya finalidad es la unión de los dos gametos, masculino y femenino, fuera del organismo materno. El éxito de estas técnicas depende de unas buenas prácticas de laboratorio. La introducción de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), supuso el paso fundamental en las técnicas de *FIV*. El primer embarazo en la especie humana lo publicó Palermo en 1992 (Palermo et al., 1992), gracias al ICSI y, principalmente, en casos de factor masculino severo los resultados han mejorado ostensiblemente.

Antes de llevar a cabo el ICSI, debemos realizar otras muchas, y no menos importantes, prácticas. La primera de ellas, una vez que la paciente está preparada, ya en quirófano y anestesiada, será la **recuperación de los ovocitos**.

C.1. Recuperación de los ovocitos

El principio de esta técnica es la recuperación de ovocitos que se encuentran en el líquido de la punción folicular. Se realiza con una aguja guiada bajo control ecográfico vaginal. Tras introducir la sonda vaginal en la vagina, se localizan los folículos, puncionándose y aspirando el líquido. Éste será examinado bajo lupa (10x) en una cabina calefactada. Una vez obtenidos los ovocitos, tendremos que lavarlos y clasificarlos morfológicamente. A continuación, se depositan en una placa de Petri (Nunc) con wash (HTF-hepes) y aceite mineral llevándose al incubador a 37° C. 6,5% de CO₂.

La clasificación morfológica va a tener la intención de reflejar en los protocolos el estado de maduración ovocitaria. La maduración ovocitaria se conoce como ovocito en MII, lo que quiere decir que el ovocito se presenta en metafase de la segunda división meiótica y ha extruido el primer corpúsculo polar (C.P.) (Dekel, 1996). La manera que se sigue para clasificar a los ovocitos obtenidos en la punción folicular es estudiar a través de la lupa el aspecto que presenta el complejo cúmulo-corona-ovocito (CCO) (Veeck, 1992) Ciertamente es, que este procedimiento tiene un carácter un tanto subjetivo.

La clasificación engloba tres grados:

- Grado 1: ovocitos que presentan una corona expandida y laxa. Suele corresponder

a ovocitos metafase II (MII).

- Grado 2: el cúmulo del ovocito se presenta algo compacto. Suele tratarse de ovocitos metafase I (MI).
- Grado 3: El ovocito presenta un cúmulo muy compacto, que suelen corresponder a ovocitos en estado de vesícula germinal (VG).

C2. Preparación del semen para la fecundación

Antes de llevar a cabo cualquier técnica de *FIV* debemos procesar la muestra seminal mediante la capacitación espermática, gracias a ella incrementamos la concentración de espermatozoides viables, eliminando el plasma seminal y otros restos celulares que pueden ayudar a la disminución en los porcentajes de fecundación, así como la aparición de contaminación en los cultivos embrionarios. Quedándonos de esta manera, con espermatozoides de mayor movilidad y mejor morfología. Los métodos que más se utilizan a la hora de la capacitación espermática son el *swim-up* y el gradiente de densidad.

La técnica de *swim-up* se basa en que sólo los espermatozoides de buena movilidad podrán ascender al sobrenadante (Harris et al., 1981). Se trata de una técnica sencilla. También tenemos la técnica de los **gradientes de densidad**, ésta se basa en obtener aquellos espermatozoides de mejor movilidad al haber superado la dificultad que presentan los gradientes de 90% y 45%. Esta técnica permite una mejor recuperación de espermatozoides móviles que el *swim-up*. Finalmente, aquellas muestras seminales de muy baja calidad se procesan mediante un único **lavado seminal**, llevándose a cabo una única centrifugación para eliminar el plasma seminal. Ya, por último, en aquellos casos de patologías obstructivas o secretoras, se pueden conseguir espermatozoides epididimarios o testiculares mediante la **biopsia testicular**. Esta técnica precisa de ICSI posteriormente, ya que obtendremos escasa cantidad de espermatozoides y habitualmente su movilidad es reducida. Tenemos la posibilidad de criopreservar los espermatozoides en caso de encontrarlos y proceder, posteriormente, a la estimulación ovárica.

C.3. Inseminación ovocitaria: FIV-ICSI.

Existen dos técnicas de inseminación de los ovocitos en el *FIV*: la *FIV* o el *ICSI*.

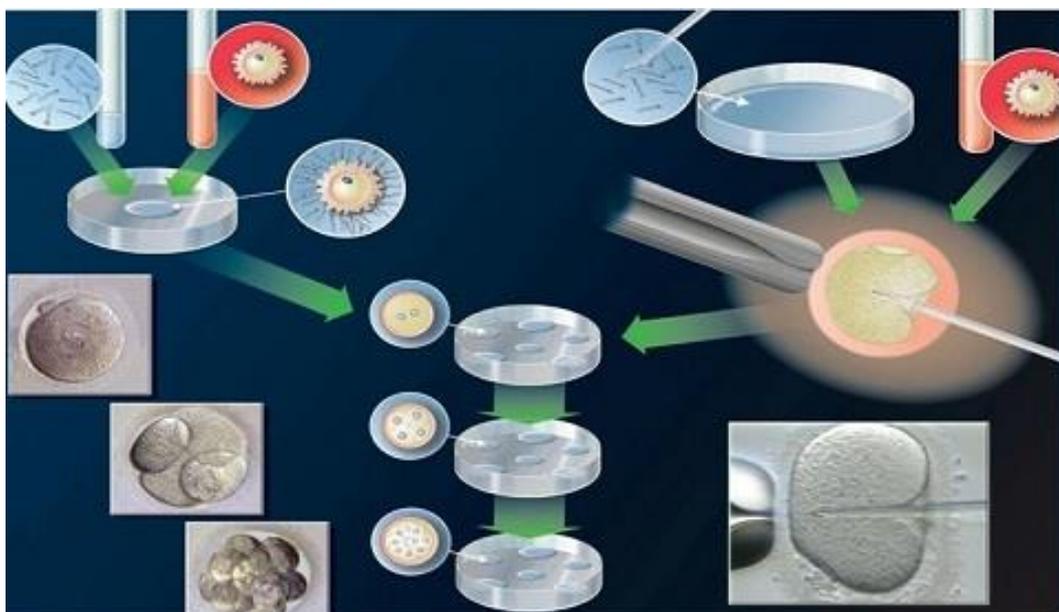
C.3.1. Inseminación convencional (FIV)

Inseminación convencional (*FIV*): es la técnica más sencilla. Consiste en incubar los espermatozoides con el óvulo y que interactúen sin más ayuda. Se suele utilizar una concentración de unos 100.000 espermatozoides/ml de medio de cultivo.

C.3.2. Inyección intracitoplasmática (ICSI)

Inyección intracitoplasmática (*ICSI*): se basa en la inyección, con la ayuda de un micromanipulador, de un espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito maduro. Previamente hemos eliminado las células de la granulosa del ovocito para cerciorarnos de su maduración, así como para llevar a cabo más fácilmente el *ICSI*, pudiendo observar con claridad y nítidamente la membrana y el citoplasma de ese ovocito. Es indispensable inmovilizar al espermatozoide elegido antes de la microinyección, de esta manera evitaremos los movimientos del flagelo dentro del ovocito que podrían conllevar daños en las estructuras internas ovocitarias. (Kasai et al., 1999). Por último, hay que tener en consideración la posición del C.P., ya que hay que saber que el huso meiótico está localizado en una región cercana. (Blake et al., 2000).

Figura 10: Esquema de procesos de una *FIV* (Atlas de reproducción asistida del Dr. Herrero)



C.4. Fecundación

La correcta unión del espermatozoide con el óvulo desencadena la liberación del contenido del acrosoma del espermatozoide, llamada *reacción acrosómica*, fusionándose las membranas de los dos gametos (Evans and Florman, 2002). Este proceso pone en marcha una serie de procesos bioquímicos dando lugar a la extrusión del segundo C.P. y la aparición del pronúcleo masculino y del femenino. La valoración de la correcta fecundación se lleva a cabo entre las 17-19 horas después de la inseminación, valoraremos la fecundación positivamente cuando observamos la existencia de los dos pronúcleos (PN) que ya hemos comentado. En el caso de que hayamos inseminado de forma convencional, FIV, se deberá realizar la separación de la granulosa y liberación del cúmulo para poder llevar a cabo más fácilmente la fecundación.

Figura 11: ovocito correctamente fecundado



C.5. Cultivo secuencial hasta blastocisto

Se trata de una práctica, cada vez más en uso, en la que cultivamos los embriones en el laboratorio hasta el día 5 o 6 de desarrollo. De esta manera se permite a la cohorte embrionaria una *autoselección*. Habrá que tener en consideración el medio de cultivo de los embriones, requiriendo en la mayoría de los casos cambios de medio a lo largo del desarrollo. La glucosa y el piruvato para ser que juegan un papel fundamental en estos primeros estadios. (Conaghan et al., 1993).

Es cierto, que a pesar de las mejoras en las tasas de implantación y ser el resultado de una selección natural en la cohorte embrionaria, implica extender la duración del cultivo *in vitro* lo que aumenta las posibilidades de alteración de la expresión génica y epigenética (Manipalviratn et al., 2009)

De esta manera se tiende e intenta limitar el número de embriones a transferir y por tanto evitar en el mayor número de casos el embarazo múltiple.

C.6. Transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria constituye el último paso en las técnicas de fecundación *in vitro*. En el éxito de ésta última técnica, que es el reflejo de las previamente citadas, participan un alto número de factores, entre los que destacan, edad y peso de la mujer, etiología de la pareja, la calidad seminal y ovocitaria, los embriones transferidos (Matorras et al., 2005), la experiencia de los profesionales, etc...

Los embriones, en la Unidad de Reproducción del Hospital de Cruces, son transferidos mayoritariamente a las 48-72 horas desde la punción folicular. A la hora de elegir los embriones a transferir nos basamos en los aspectos morfológicos, número de células del embrión, la simetría entre ellas y la existencia o no de fragmentos. Adicionalmente, se han estudiado otros factores como la morfología ovocitaria (Balaban and Urman, 2006), el "score pronuclear" (Scott et al., 2000), y la división temprana (Sakkas et al., 2001) los resultados y efectos positivos a la hora de elegir el embrión a transferir siguiendo estos estudios son objeto de debate en nuestros días.

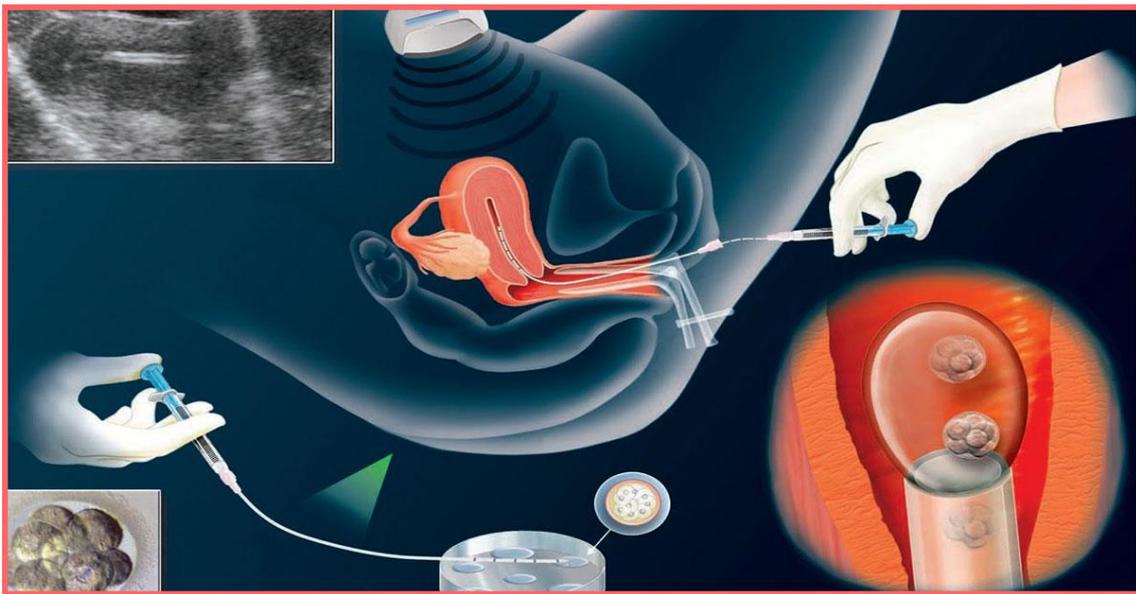
Examinar al embrión siguiendo todos estos parámetros, morfológicos muchos de ellos, tiene como ventaja que se trata de un método sencillo y rápido, pero, por el contrario, es poco fiable al ser muy subjetivo y requiere de una alta formación por parte de los profesionales. Además, aparecen factores externos a la calidad embrionaria, como son factores del útero, endometrio, así como la propia técnica de la transferencia.

La ley española, ley 14/2006 del 26 de mayo, regula el número máximo de embriones a transferir, siendo tres el número que no se puede superar. El número de embriones a transferir dependerá de la edad de la paciente, su historial clínico, la calidad embrionaria, así como la opinión de la paciente, intentando siempre que sea el menor número posible.

La transferencia se realiza ecoguiada con sonda abdominal, depositando los embriones a 1 cm aproximadamente del fondo uterino (Matorras et al., 2002)

Finalmente, a los 14 días de la punción folicular, la paciente se someterá a la determinación de la β -hCG con el fin de conocer si está en el inicio de la gestación.

Figura 12: Transferencia embrionaria (Imagen tomada de Atlas de reproducción asistida del Dr. Herrero, 2010)



C.7. Vitrificación embrionaria

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarápida, que se basa en la deshidratación rápida utilizando un medio hiperosmolar. Se reduce el contenido de agua en la célula y disminuimos de esta manera la posibilidad de formación de hielo intracelular. (Cobo et al., 2005).

Aquellos embriones que el día de la transferencia embrionaria, basándonos en los mismos criterios que hemos seguido para clasificar los embriones a transferir, vemos que son potencialmente viables los vitrificaremos. También podremos dejarlos en el laboratorio hasta día 6 de su desarrollo embrionario y decidir si los vitrificamos o no.

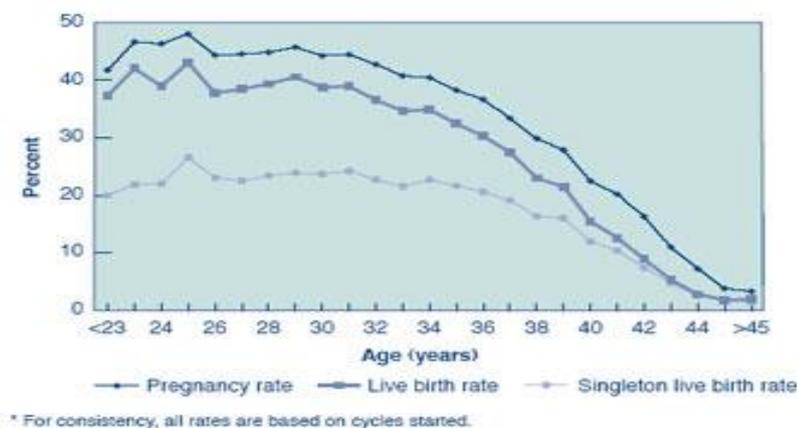
Esta técnica permite preservar la fertilidad en mujeres jóvenes que desean posponer su maternidad, en mujeres con cáncer, etc...

D. RESULTADOS

Desde el nacimiento de los primeros niños obtenidos tras *FIV*, en España ya son unos 10.000 recién nacidos vivos mientras que a nivel mundial ya se superan los cinco millones.

El perfil de la mujer que acude a los centros de fecundación *in vitro* ha ido cambiando a lo largo de todos estos años. La edad media es de casi 37 años, en España se estima que un cuarto de las pacientes que requieren la *FIV* ya supera los 40 años. Por lo general, las mujeres más jóvenes tienen mayor cantidad de óvulos y de mejor calidad, lo que conlleva una mayor tasa de fecundación y de implantación. La tasa de éxito ronda el 35-40% por intento.

Figura 13: Tasa de embarazo y niño nacido vivo de TRA usando ovocitos propios relacionado con la edad de la mujer. Obtenido Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2003 Assisted Reproductive Technology Success Rates



Al aumento en la edad en las mujeres, hay que sumarle el aumento de riesgo y complicaciones que aparecen con el paso de los años (Balasch, 2010). En torno a los 40 años, la tasa de embarazo decae significativamente, a los 44 años esa tasa es prácticamente nula teniendo que recurrir a la donación de ovocitos. La *FIV* con ovocitos provenientes de donantes aumenta sustancialmente el éxito por ciclo, situándose en torno al 70% cuando se recurre a estos casos. En una población bajo unas condiciones de fertilidad probada el éxito reproductivo ronda el 20% por ciclo ovulatorio tras un año de relaciones sexuales sin anticonceptivos, por lo que se calcula que entre el 85-90% de aquellas parejas fértiles concebirán durante el primer año de relaciones sexuales,

mientras que el 90-95% a los dos años (Matorras et al., 2011).

Aún en nuestros días las tasas de éxito son bajas en relación al número de ovocitos obtenidos y de embriones generados. Se ha visto que la tasa de recién nacido vivo (RNV) no es superior al 5% en función al número de ovocitos obtenido (Patrizio and Sakkas, 2009). Incluso estos resultados se mantienen en programas de donación de ovocitos, viéndose un resultado en torno al 7%.

Otro estudio más reciente (Garrido et al., 2011) calculó la tasa acumulada de RNV en función del número de embriones transferidos, en ciclos sucesivos. Concluyendo, de manera lógica se puede pensar, que la probabilidad de conseguir un RNV aumenta según lo hace el número de embriones transferidos en ciclos consecutivos de *FIV*. Esto es, cada embrión que se transfiere tiene una mayor probabilidad de éxito de embarazo que los anteriores, aunque también afirman que existe un porcentaje de ciclos que nunca consigue el RNV.

Queda un largo camino por recorrer, siendo uno de los objetivos principales para los profesionales de la reproducción asistida la transferencia de un único embrión, quizás para ello deberíamos llevar a cabo estimulaciones menos agresivas, que estudios demuestran que curiosamente proporcionan un mayor número de embriones viables (Inge et al., 2005). Así como una mejora en las técnicas y procedimientos a la hora de elegir el mejor embrión.

E. RIESGOS

En la mayoría de los casos las técnicas de reproducción asistida son de bajo riesgo, pero existen ciertos factores que pueden poner en riesgo la salud de la mujer, así como del recién nacido. Algunas de las complicaciones pueden ser controlables si se modula la intensidad de la estimulación ovárica efectuada o si se reduce el número de embriones a transferir. Otras, dependen de factores muy poco controlables. Las complicaciones más frecuentes son:

E.1. Hemorragia postpunción

La frecuencia es variable y debe considerarse un riesgo grave si no se realiza un buen diagnóstico. Puede derivar en una torsión de ovario, infección, hemorragia y

excepcionalmente lesiones viscerales (Acevedo Martin et al., 2003)

E.2. Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO)

Se trata de una complicación que aparece durante la fase lútea del ciclo menstrual y consiste en una respuesta anormalmente elevada del ovario a la estimulación ovárica. (Golan et al., 1989; Forman et al., 1990). Afortunadamente, los casos de SHO graves no suelen ser superiores al 0,5-1% (Smitz et al., 1990). La aparición del síndrome está relacionada con la administración de hCG, el SHO se caracteriza por un incremento en la permeabilidad vascular. Sabemos que la hCG no posee propiedades vasoactivas, por lo que un mediador tiene que ser el responsable, éstos pueden ser el sistema renina-angiotensina del ovario (Pellicer et al., 1988) y el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGF) (Lee et al., 1997) (García Velasco and Pellicer, 2003).

Según el momento de la aparición del SHO se diferencia una forma precoz y una tardía. La primera aparece antes de diez días tras la administración de hCG. La forma tardía aparece después del décimo día tras la administración de hCG.

Los síntomas y signos del SHO son muy variables según sea la gravedad del síndrome.

TABLA 4. CLASIFICACIÓN DEL SHO SEGÚN SU GRAVEDAD (Adaptado de Golan et al., 1989)

CLASIFICACIÓN DEL SHO SEGÚN SU GRAVEDAD			
Grado	Leve	Moderado	Severo
1	Dolor abdominal		
2	Náuseas, vómitos y diarrea. Ovarios 5 – 12cm.		
3		Ascitis en ecografía.	
4			Distress respiratorio
5			Mayor hipovolemia, disminución de la función renal.
6			Cuadro crítico.

La incidencia de los distintos grados del SHO son difíciles de establecer, pero se estima que la forma leve aparece en alrededor del 25% de los ciclos, la moderada en un 5% y la severa, como ya hemos comentado, entre un 0,5 y un 1%. (Golan et al., 1989)

Sabemos que el síndrome no aparecerá a menos que se administre hCG para desencadenar la ovulación por lo que creemos que es más importante dirigir la atención mayormente a la prevención antes que al tratamiento. Las medidas más importantes a la hora de la prevención son:

- Utilizar tratamientos alternativos y personalizados para pacientes de alto riesgo (serán aquellos con ovarios poliquísticos, bajo peso corporal, altos niveles de estradiol, etc...)
- *Coasting*: se basa en suprimir el tratamiento con gonadotropinas cuando existen folículos mayores a 14 mm y un estradiol mayor a 3000 pg/ml. Se mantiene durante 3 días como máximo y viendo que los niveles de estradiol comienzan a descender. (Coasting, 2005)
- Llevar a cabo la punción folicular y aspiración de los folículos de un ovario hasta un máximo de 12 horas tras la administración de HCG.
- Cancelar la transferencia embrionaria, criopreservando los ovocitos o embriones. (D'Angelo y Amso, 2002)
- Administración de albúmina humana en el momento de la punción. Aunque sus efectos son discutidos. Estudios afirman que la albúmina disminuye el SHO (Aboulghar et al., 2002), mientras que otros no observan este efecto. (Bellver et al., 2003).
- Modificar la inducción de la ovulación. En los ciclos con antagonistas de la GnRH es posible sustituir la HCG por un agonista de la GnRH.
- Transferencia de un solo embrión (Orvieto et al., 2005)
- Cancelación del ciclo.

En caso de que el síndrome acabe apareciendo habrá que tratar los síntomas, controlando la diuresis y balance hidroeléctrico. Aplicar anticoagulantes, drenaje de ascitis y reposo hasta el establecimiento espontáneo.

E.3. Embarazo múltiple

En las técnicas de reproducción asistida tanto la calidad ovocitaria como embrionaria juegan uno de los papeles fundamentales en el desarrollo de las mismas. Con el transcurso de los años las tasas de gestación han ido mejorando progresivamente, a la vez que el desarrollo en las técnicas y en los procedimientos. A pesar de estas mejoras se ha seguido, mayoritariamente, transfiriendo más de un embrión lo que ha provocado una amplia proporción de embarazos múltiples.

El embarazo múltiple es una de las principales complicaciones de las técnicas de reproducción asistida, ya que el número de cesáreas, nacimientos prematuros y mortalidad perinatal aumenta considerablemente. Actualmente, la incidencia de gestación múltiple en los embarazos espontáneos es del 1,6% del total de RNV. Tras un tratamiento de FIV, el riesgo de embarazo gemelar aumento hasta un 20%. (Martin y Welch, 1998). En España entre los años 1990 y 2000 se produjo un aumento del 73% de los partos múltiples, esto se debe al crecimiento experimentado por las técnicas de reproducción asistida (Marqueta et al., 2004).

Entre las consecuencias más importantes que conlleva el embarazo múltiple están:

- Aumento de la morbilidad / mortalidad materna.
- Impacto económico, tanto para el estado (Ledwer et al., 2006) como para la pareja o mujer sola.
- Impacto psicológico.

La morbilidad materna está asociada a:

- Enfermedad hipertensiva asociada al embarazo.
- Tromboembolismo,
- Infección en el sistema urinario.
- Anemia.
- Hemorragia.
- Aumento en el número de cesáreas. (Senat et al., 1998)

La morbilidad fetal está asociada a:

- Parto pretermino.
- Bajo peso al nacer.
- Apgar bajo.
- Sepsis.

Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo la tendencia es a transferir el menor número de embriones, evitando así el embarazo múltiple. En las inseminaciones, también se ha reducido el número de folículos a no más de 3 folículos mayores de 17mm.

La tendencia es a reducir al máximo el número de embriones a transferir, intentando que al final sea la transferencia selectiva de un solo embrión (elective single embryo transfer: eSET). Hemos visto una fórmula que nos puede servir a la hora de predecir la posibilidad de embarazo y del riesgo de los diferentes tipos de embarazo múltiple en función de la tasa de implantación y el número de embriones transferidos (Matorras et al., 2005).

Una vez que el embarazo múltiple ya es un hecho, existe la posibilidad de reducir uno de los embriones, a través de una punción del saco por vía abdominal o vaginal. Es una técnica que conlleva un riesgo para el feto restante, así como que conlleva una importante carga ética que tendrán que analizar tanto el profesional como el paciente. La incidencia de abortos es de un 5% aproximadamente y el parto prematuro ocurre con un 75% de veces.

E.4. Embarazo ectópico

Al igual que los embarazos múltiples, en estos últimos años los embarazos ectópicos han aumentado significativamente (Lemus, 2000). Una de las causas podría ser la FIV. Y su frecuencia aparece entre un 4 y 8% (Khalil et al., 2001), triplicando, casi, el porcentaje en la población general.

Se trata de la implantación del embrión fuera de la cavidad endometrial, localizados, en su mayoría, en las trompas. Es una de las causas más frecuentes de muerte relacionada con las gestaciones. Se calcula que el 9% de las muertes maternas durante el primer trimestre de la gestación es debido a este problema.

Muchos autores han señalado la importancia de la transferencia embrionaria en la aparición del embarazo ectópico (Martínez y Trounson., 1986), ya que una transferencia difícil aumentaría las contracciones uterinas.

En las técnicas de reproducción asistida el seguimiento de la β -hCG y el control ecográfico permite un diagnóstico precoz en la mayoría de los casos

E.5. Defectos congénitos

Uno de los fenómenos más evaluados es la aparición de defectos congénitos en la población nacida tras un tratamiento de reproducción asistida. Los resultados no son concluyentes ni coincidentes, pero sí parece existir un mayor número de defectos congénitos en la población de *FIV* comparándola con la población nacida de forma natural (Hansen et al., 2005). Aunque esta afirmación está bajo debate, ya que se han visto que anomalías cromosómicas, así como malformaciones congénitas no están relacionadas con la transferencia de embriones de peor calidad (Mendoza et al., 2015).

Estos defectos podrían estar relacionados con las propias causas de la esterilidad, los efectos secundarios de la medicación, así como los procedimientos de trabajo llevados a cabo en el laboratorio de embriología.

Sería necesario el seguimiento exhaustivo del embarazo, así como del recién nacido.

E.6. Anomalías cromosómicas.

Además de todos estos riesgos, siendo la edad materna avanzada, quizás, el más importante, se ha descrito (Rubio et al., 2010) que existe un importante aumento en el número de anomalías cromosómicas y mosaicismos en embriones procedentes de ciclos estimulados. Concluyendo que la presencia de esos embriones se debe a la intromisión por parte de la estimulación ovárica en la selección natural de los ovocitos y a la exposición de los folículos a ella, así como sugiriendo que protocolos de estimulación ovárica de alta respuesta puede afectar al embrión, por lo que esos protocolos deben individualizarse, intentando buscar la mínima dosis eficaz para un resultado óptimo.

F. CONTROL DE CALIDAD

Por último, y no por ello menos importante, los embriones durante su desarrollo en el laboratorio se ven expuestos a una serie de situaciones que pueden alterar su correcto desarrollo. Éstos son, la temperatura, la luz, el O₂, CO₂, (Cohen et al., 1997) polvo, compuestos volátiles...La introducción de controles de calidad puede mitigar estas situaciones no deseadas. Llevar a cabo un control de calidad en los equipos (incubadores, medios de cultivo, material fungible...) así como una estandarización en las prácticas y técnicas que se desarrollan día a día en el laboratorio.

Una correcta implantación de estos sistemas de control aseguraría la reproducibilidad de los resultados y minimizaría los riesgos.

G. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como ya hemos comentado en este primer capítulo la selección de embriones con mayor potencial de implantación es uno de los principales retos en la Reproducción Asistida. Con la implementación de nuevas técnicas en el laboratorio y la mejora en los medios de cultivo secuenciales, la calidad de los embriones ha ido en aumento y se ha reflejado en menores tasas de embarazos múltiples lo que se ha traducido en la disminución del número de embriones a transferir. Por lo tanto, la selección electiva del “mejor” embrión se ha vuelto crucial. Así, la necesidad de desarrollar nuevos enfoques objetivos para la selección de embriones, es de suma importancia hoy en día. Ya hemos comentado que los métodos clásicos para seleccionar embriones sanos en las técnicas de Reproducción Asistida se basan principalmente en criterios morfológicos, como clivaje, número y tamaño de las blastómeras, grado de fragmentación y la presencia de múltiples núcleos. Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren que los embriones con apariencia morfológica adecuada por sí solas no son suficientes para predecir el éxito de la implantación, y se requiere de implementar más técnicas que nos ayuden a elegir al embrión que tendrá el potencial de implantación y que además nos garantice el éxito reproductivo.

Más allá de los criterios de selección del mejor embrión, la calidad de los ovocitos sigue siendo uno de los retos más difíciles en la actualidad. Muchos embriones morfológicamente normales no logran la implantación o abortan espontáneamente

durante el embarazo. Se están creando nuevas herramientas denominadas “ÓMICAS”; procedimientos que permiten identificar todos los componentes de los sistemas celulares, obteniendo una cantidad enorme de información en un corto espacio de tiempo. Son métodos más sofisticados, con tecnología de alto rendimiento para elegir al embrión o gameto que tenga el mejor potencial de desarrollo o implantación, estas ciencias “ómicas”, comprenden, la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica.

Las dos primeras técnicas están basadas en la identificación de proteínas que favorezcan o perjudiquen la implantación embrionaria. Son, todavía, técnicas invasivas: por el contrario, la metabolómica es una técnica no invasiva basada en el estudio de los metabolitos de muestras biológicas que en nuestro caso sería de los medios de cultivo en los que cultivamos los embriones.

Está claro que la OMICA se ha consolidado como una herramienta aplicable en todo el espectro de las ciencias biológicas y en particular en la Medicina Reproductiva, esto a partir de la evaluación de una sola célula.

Las aplicaciones de estas tecnologías a los programas de reproducción asistida persiguen mejorar los procesos de selección embrionaria, buscando reducir al máximo los riesgos que entrañan estos procedimientos a la paciente, así como mejorar las tasas de gestación.

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es la siguiente: En la estimulación ovárica, para lo ciclos de F/l, la asociación de la LH junto con la FSH parece aumentar las tasas de embarazo. Sin embargo, no se ha determinado la dosis óptima para esas pacientes. Nuestra hipótesis sería que para una misma dosis de FSH, incrementar la dosis de LH podría tener un efecto beneficioso en el resultado de los ciclos de F/l.

OBJETIVOS

A. OBJETIVO PRINCIPAL.

Determinar, dentro de dos grupos con misma dosis de recFSH, si el aumento de la dosis de recLH en uno de ellos incrementa el número de ovocitos obtenidos en mujeres de 35-40 años bajo tratamientos de estimulación ovárica en F/I.

B. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

Evaluación de la influencia de la dosis de recLH en:

- Número de ovocitos inmaduros.
- Número de ovocitos maduros.
- Número de ovocitos inseminados.
- Número de ovocitos fertilizados y tasa de fertilización.
- Calidad embrionaria.
- Número de embriones de buena calidad.
- Número de embriones transferidos.
- Tasa de embarazo (por ciclo iniciado, por punción y por transferencia).
- Tasa de implantación.
- Tasa de recién nacido vivo (por ciclo iniciado, por punción y por transferencia).
- Tasa de complicaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

A. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo y randomizado. Donde la aleatorización fue ciega, mediante el sistema de apertura del sobre de asignación del tratamiento antes de iniciar el tratamiento experimental. El sobre a abrir en cada caso venía indicado por el número de identificación de cada participante al incluirse en el estudio.

Dadas las características del estudio, una vez abierto el sobre correspondiente a la aleatorización, tanto el personal médico como la paciente conocerán el grupo asignado.

B. INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO DE LOS SUJETOS

La información para el consentimiento informado de las participantes se preparó teniendo en cuenta las recomendaciones de las normas de buena práctica clínica (BPC), la normativa local y las sugerencias del investigador.

El consentimiento informado fue condición previa para incluir a una participante en el estudio.

Las referencias asignadas a nuestro estudio fueron las siguientes:

1. Que el estudio fue aprobado por el CEIC de Cruces con el código CEIC E14/30
2. Que el estudio ha sido registrado en el Clinical Trials.gov Identifier con el número NCT02994550

C. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

La población del estudio la constituyeron 514 ciclos de estimulación ovárica de pacientes con una edad de entre 35 y 40 años que acudieron a la Unidad de Reproducción Humana (URH) del Hospital de Cruces (Bizkaia) y que se sometieron a tratamiento de reproducción asistida *in vitro* entre enero del 2009 y diciembre de 2010. Una parte de la población elegida no pudo finalmente incluirse en el estudio debido a que violó ciertos criterios del estudio.

D. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes con un tiempo de infertilidad de más de un año y que cumpliesen

los siguientes criterios:

1. Mujeres pendientes de realización de *FIV*, pertenecientes a la consulta de la U.R.H. del Hospital de Cruces (Bizkaia).
2. Mujeres de edad comprendida entre 35 y 40 años. .
3. FSH basal en el día 3 de ciclo menor a 10mUI/mL.
4. Mujeres que firmaron el consentimiento informado.
5. Índice de masa corporal menor de 30.
6. Presencia de ambos ovarios.
7. Con ciclos menstruales regulares.

E. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No participaron en el estudio las mujeres con alguno de los criterios siguientes:

1. Aquellas pacientes con enfermedades infecciosas de posible transmisión seminal (HB, HC, VIH...).
2. Participación simultánea en otro estudio clínico con un fármaco en investigación.
3. Negativa o incapacidad de cumplir con el protocolo de este estudio.
4. Anormalidades endocrinas (síndrome de ovarios poliquísticos, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hiperprolactinemia).
5. Que exista contraindicación del empleo de gonadotropinas en dosis elevadas.

F. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, las normas de la Buena Práctica Clínica (BPC/GCP- ICH E6) y la normativa internacional y nacional aplicables. El estudio sólo comenzó al haber obtenido la autorización del Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital de Cruces. El estudio se llevó a cabo según las pautas, procedimientos y pruebas que se aplican dentro de la asistencia diaria en la U. R. H. del Hospital de Cruces para un buen control este tipo de tratamiento, por lo que las participantes no estuvieron expuestas a otro riesgo adicional que la administración del fármaco en investigación. La administración subcutánea del fármaco durante al menos seis días apenas se consideró como una ligera molestia. En los estudios de fertilización *in vitro* el resultado de las variables se mide instrumentalmente de modo que eliminan los

posibles sesgos de la valoración subjetiva de resultados.

G. CRITERIOS DE RETIRADA O ABANDONO DEL TRATAMIENTO A LAS PARTICIPANTES.

Las pacientes podían retirarse del estudio por voluntad propia en cualquier momento sin que ello repercutiese en su cuidado médico, por la aparición de efectos adversos, así como por motivos que el médico considere que puede poner en riesgo la salud de la paciente.

Cuando no se completaron todos los datos correspondientes a las variables bajo estudio esas pacientes no llegaron a aleatorizarse. Los datos correspondientes a esas pacientes se analizaron en base a la **intención de tratar**. Por el contrario, aquellas pacientes que cumplieron los criterios de selección pero que por cualquier motivo no llegan a ser incluidas en un grupo de estudio, serán registradas pero excluidas del análisis por intención de tratar (no se evaluarán).

Como es habitual en FIV, la estimulación ovárica controlada se interrumpió y la participante fue retirada del estudio en caso de:

- No lograr la supresión hipofisaria tras 21 días de administración del análogo agonista de la GnRH.
- Falta de respuesta ovárica al tratamiento de estimulación, según el mejor criterio del investigador.
- Respuesta ovárica excesiva al tratamiento de estimulación, indicativa de un riesgo de SHO, según la práctica del centro.
- Respuesta ovárica que justificó la suspensión cautelar del tratamiento (“coasting”), es decir, interrumpir la administración de gonadotropinas y retrasar la administración de HCG por más de 36 horas.
- Presencia de toxicidad de grado 3 o 4 de la escala de la OMS (World Health Organization, 1979)
- Presencia de un acontecimiento adverso que justificó el cese del tratamiento.

H. DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO

Una vez firmando por la paciente el consentimiento informado fueron aleatorizadas a uno de los dos grupos de estudio. A cada paciente se le asignaba un número de identificación que lo llevó durante todo el tratamiento. A continuación, se asignó a cada paciente a uno de los dos grupos de estudio, aleatoriamente y mediante la apertura de sobre. En este aparecerá el grupo correspondiente a esa paciente. No se reasignaron los números de identificación de aquellas pacientes que por diferentes motivos salieron del estudio.

La aleatorización presente en los sobres se llevó a cabo mediante programa informático.

La supresión hipofisaria se realizó mediante protocolo largo con el agonista de la GnRH acetato de leuprolida (Decapeptyl®, Ipsen, Madrid). La dosis inicial diaria de 0.5 mg por vía s.c. se redujo a la mitad, 0.25 mg/día, tras comprobar el reposo ovárico antes de iniciar la estimulación ovárica y se mantuvo hasta el final de la misma. Esta pauta es la habitual en el centro.

G.1. Grupo (300/150):

Aquellos pacientes que recibieron tratamiento con gonadotropinas recombinantes, dos dosis de rec FSH más rec LH (Pergoveris-f®, Merck Serono, Spain) en forma subcutánea y diaria durante al menos seis días. La dosis inicial fue de 300 UI de rec FSH y 150 UI de rec LH, después la dosis se fue ajustando según los criterios del centro en función de la respuesta ovárica observada mediante ecografía ovárica y toma de analítica, valorando el estradiol y la LH.

Cuando se observó un folículo mayor o igual a 18 mm y dos folículos mayores o iguales de 16 mm se cesó la administración de la solución.

G.2. Grupo (300/75):

Aquellas pacientes que recibieron tratamiento con gonadotropinas recombinantes, una dosis de rec FSH más rec LH (Pergoveris-f®, Merck Serono, Spain) junto con dos dosis de rec FSH (Gonal-f®, Merck Serono, Spain) en forma subcutánea y diaria durante al menos seis días. La dosis inicial fue de 300 IU de rec FSH y 75 UI de rec LH, después la dosis se fue ajustando según los criterios del centro en función de la

respuesta ovárica observada mediante ecografía ovárica y toma de analítica, valorando el estradiol y la LH.

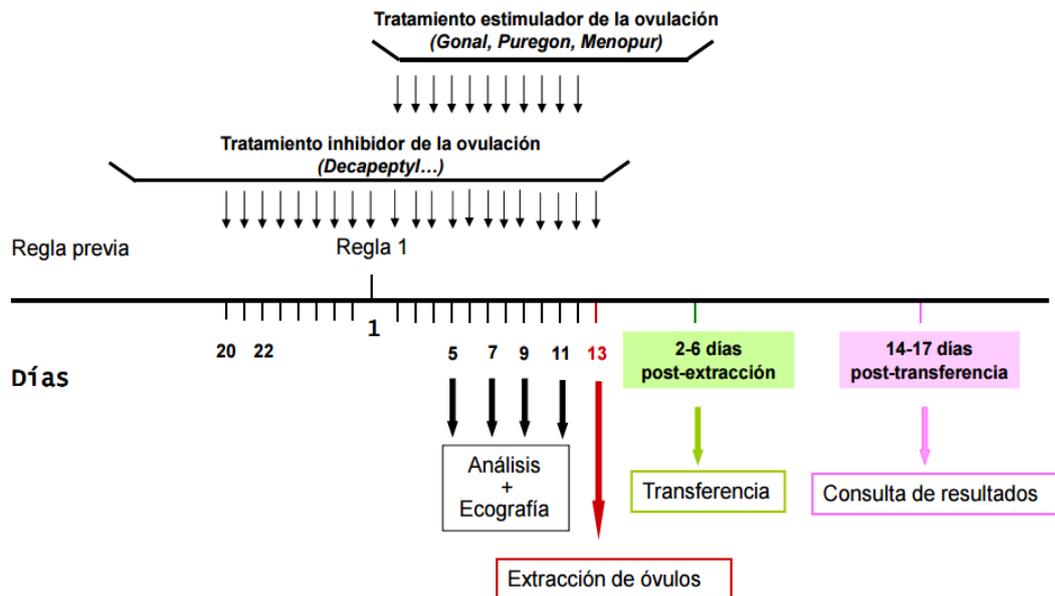
Cuando se observó un folículo mayor o igual a 18 mm y dos folículos mayores o iguales de 16 mm se cesó la administración de la solución.

Tras lograr un desarrollo folicular adecuado se administró la rec hCG en forma subcutánea en una sola aplicación, para completar la maduración folicular y desencadenar la ovulación. Seguidamente, 36 horas después, se procedió a recuperar los ovocitos, tras lo que se inició el apoyo de la fase lútea con progesterona y se inició el proceso de *FIV* con la inseminación de los ovocitos, selección de embriones y transferencia de los mejores. Finalmente se determinó la β -HCG y cuando fue positiva se realizó la ecografía para objetivar la presencia de saco embrionario y las participantes embarazadas pasaron a seguimiento obstétrico.

Una vez concluido el embarazo, se contactó con las pacientes para recabar información sobre el desenlace del mismo y los correspondientes datos perinatales.

El ciclo se cancelaba cuando había menos de tres folículos después de 10 a 12 días de tratamiento con gonadotropina. También se cancelaban los ciclos por alta respuesta, cuando el número de folículos excedía de 20 o el estradiol superaba los 5000 pg/ml previos a la administración de la hCG. Por último, errores a la hora de administrarse el tratamiento o por ovulaciones espontáneas también eran motivo de cancelación del ciclo.

Figura 14: Diseño global del estudio.



I. TRATAMIENTOS PREVIOS

Las candidatas que presentaron alguna enfermedad importante se excluyeron del estudio y también se excluyeron tratamientos previos. Como tratamientos concomitantes se excluyeron expresamente otras hormonas distintas que las del estudio, los fármacos antiinflamatorios en bloque y aquellos fármacos con efecto sobre la ovulación, como los neurolépticos. De forma general se excluyó cualquier fármaco contraindicado en caso de embarazo. La duración del tratamiento dentro del estudio, salvo en caso de embarazo, fue inferior a un mes, por lo que no resultó gravoso para las participantes la exclusión de estos tratamientos concomitantes.

J. EJECUCIÓN DEL TRATAMIENTO.

El compromiso e implicación de las participantes es muy alto en reproducción asistida. El tratamiento experimental duraba una semana, durante la cual se realizaron tres controles al menos. Por eso, el cumplimiento terapéutico se verificó preguntando a la participante en cada visita, con independencia de la constancia de los viales vacíos y los devuel-

tos sin usar o de la tarjeta terapéutica que se proporcionó a las participantes. El documento original para el cumplimiento terapéutico fueron las anotaciones al respecto que el investigador introdujo en la historia de la participante en cada visita.

K. SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO

Número de ciclos cancelados por riesgo de SHO: El número de ciclos cancelados por este riesgo, a partir del día de introducción del fármaco en estudio, fue el parámetro para valorar la seguridad.

Incidencia del SHO: Los casos con síndrome de hiperestimulación, con independencia de que el ciclo se hubiese cancelado o no, representaron el parámetro a tener en cuenta. Un SHO, como ya hemos definido anteriormente, puede ser leve, moderado o grave y la gravedad fue también parámetro de valoración para la seguridad.

Sucesos inesperados: Todos aquellos sucesos que no entraban dentro de los acontecimientos esperados en el estudio fueron evaluados dependiendo de su gravedad para poder valorar la seguridad en el transcurso del estudio.

Tolerabilidad: Se estudiaron y analizaron los signos y síntomas que las pacientes bajo estudio refirieron a los investigadores a la hora de administrarse las distintas sustancias.

Salvo la tolerabilidad local, los parámetros de seguridad se recogieron en ambos grupos del estudio con fines de comparación.

L. VARIABLES DE ESTUDIO.

Las fuentes de información del estudio fueron:

1. Variables de identificación.
2. Datos de la historia clínica de la mujer bajo tratamiento.
3. Protocolo donde se plasman todos los datos del desarrollo del ciclo de FIV/ICSI (F/I).

L. 1. Variables de identificación

A cada paciente se le asignó un código, recogiendo la fecha de inicio del tratamiento F/I.

L.2. Datos recogidos en la historia de la paciente.

Edad, peso, talla, índice de masa corporal (IMC), FSH basal, Estradiol y años que la pareja acumulaba intentando tener descendencia. Y el tipo de infertilidad, primaria o secundaria. Definiendo primaria cuando la paciente nunca había conseguido una gestación; mientras que definimos esterilidad secundaria a aquellas que habiendo obtenido una gestación por métodos naturales ahora no son capaces de quedarse embarazados.

Las causas de esterilidad se definieron como: factor tubárico, esterilidad de origen masculino, endometriosis y fracaso de inseminación artificial conyugal (IAC).

Por último, también se recogió el número de ciclos previos de FIV de la paciente.

L.3. Datos del ciclo FIV/ICSI.

L.3.1. Procesamiento de semen

Para empezar, el día que se llevaba a cabo la punción folicular el varón, una vez firmado el Consentimiento Informado correspondiente, obtuvo una muestra de semen en frasco estéril tras un periodo de abstinencia de 3 a 5 días. Se anotó hora de recogida, posibles pérdidas y tiempo de abstinencia.

Se llevó a cabo el seminograma siguiendo las indicaciones de la OMS (WHO, 1999). Ya en el laboratorio la muestra se introdujo en el incubador a 37° C y 6,5% de CO₂ hasta el momento del procesamiento, que no era superior a 15 minutos, una vez estuviese el semen licuado.

La elección de la técnica adecuada para la preparación del semen en un tratamiento de reproducción asistida viene dictada por la naturaleza de la propia muestra. En la mayoría de los casos la técnica elegida en nuestra Unidad fue el “*swim up*”. Añadíamos medio de cultivo Fertilization médium al semen en proporción 1:1 y centrifigábamos 10 minutos a 2000 revoluciones por minuto (r.p.m.). Pasado este tiempo se decantaba el tubo eliminando así el sobrenadante, dejando únicamente el sedimento formado. A continuación, se añadía resbalando por la pared Fertilization sin deshacer el sedimento. Dejábamos el tubo en el incubador durante unos 40 minutos a 37, 5°C y 6,5% de CO₂, con

una inclinación aproximada de 45° para facilitar el ascenso de los espermatozoides. Por último, recuperábamos el sobrenadante, unos 250µl, en un tubo Falcon (Becton Dickinson, Reino Unido) de 5 ml de la superficie, y allí estaban los espermatozoides móviles.

L.3.2. Punción folicular

Se realizó la punción folicular guiada por ecografía vaginal entre 35-36 horas después de la administración del desencadenante de la ovulación, anticipándonos al proceso ovulatorio. La punción se realizó bajo una suave anestesia, general o local con sedación, de manera general, a la paciente y con una aguja de punción ovárica de 18G (Kitazato Medical, Tokio, Japón) se puncionaron los folículos aspirando su contenido en tubos específicos para la recogida de líquido folicular (Falcon 2057, Becton Dickinson, Reino Unido) con un sistema de vacío a 120 mm Hg. El líquido folicular, ya en el laboratorio contiguo al quirófano, se estudió, a través de la lupa de aumento (8-10X) calefactada para detectar la presencia de ovocitos. Los ovocitos recuperados se lavaron en HEPES (Global, Canadá), para posteriormente ser trasladados a una placa con FERT (Global, Canadá) y aceite REPROLINE y depositados en el incubador a 37°C y 6,5% CO₂ hasta el momento de la decumulación en una proporción 1:1 con hialuronidasa y medio de cultivo.

L.3.3. Clasificación de la madurez ovocitaria

De acuerdo con la clasificación descrita por Veeck (Veeck, 1998) clasificamos los ovocitos según:

Ovocito en metafase II: ovocito maduro o preovulatorio. Presenta C.P. Tiene aspecto redondeado, ooplasma claro y granulación homogénea. Las células del cúmulo están expandidas y filantes y la corona es radial.

Ovocito en metafase I: es un ovocito inmaduro. No tiene C.P. Su aspecto es redondeado, con citoplasma claro y granulación homogénea. Las células del cúmulo y la corona están menos expandidas y no son filantes.

Ovocito en vesícula germinal: es un ovocito inmaduro. No tiene C.P. Presenta vesícula germinal con nucleolos refráctiles. Tiene aspecto irregular oscuro en su zona central y ooplasma granular. Las células del cúmulo y corona están compactadas.

El número de estos ovocitos en metafase II respecto del total de ovocitos inseminados o puestos a inseminar representa la tasa de fertilización.

L.3.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La fecundación mediante esta técnica requiere la decumulación de los ovocitos, es decir, la eliminación de las células de la corona y el cúmulo que lo rodean. Esta estrategia permite no sólo la inyección precisa de los ovocitos sino también la valoración de su grado de madurez, hecho de crítica importancia para la realización del ICSI. La decumulación se llevó a cabo combinando procedimientos enzimáticos y mecánicos; para decumular se introdujo el complejo cúmulo-corona-ovocito en una solución con hialuronidasa en proporción 1:1 durante 20-30 segundos aspirando varias veces el complejo a través de la pipeta. Se preparó la placa de microinyección que constaba de microgotas individuales en las que se coloca a los ovocitos; a continuación, se añadían varias gotas con una suspensión de PVP (polivinil-polirridona) y finalmente, entre 1-3 μ l del capacitado espermático. El carácter viscoso del PVP ralentiza la movilidad de los espermatozoides, facilitando su manipulación y en consecuencia su captura; también permite un mejor control del fluido en la aguja de inyección y previene que los propios espermatozoides se queden adheridos a la pipeta. Para la microinyección, se trabajó con un microscopio invertido con óptica Hoffman (Olympus) con pletina calefactada y un equipo de micromanipulación. Con la pipeta de sujeción, se mantiene fijo al ovocito mientras que con la pipeta de inyección se aspiran espermatozoides morfológicamente normales que se inyectan en el ovocito teniendo en cuenta la posición del C.P. para evitar dañar el huso meiótico.

L.3.5. Valoración de la fecundación

Consideramos que el ovocito estaba correctamente fecundado si a las 17-20 horas post-inseminación presentaba 2 PN en el citoplasma del ovocito y se visualizaban 2 corpúsculos polares en el espacio perivitelino. Este procedimiento se llevó a cabo bajo microscopio invertido (40X). Una vez clasificados los ovocitos correctamente fecundados, se lavaron en gotas de la placa, y ésta se devolverá al incubador en las condiciones ya mencionadas de temperatura y humedad.

L.3.6. Clasificación de los embriones

Se evaluó la calidad de cada embrión en división en función del número y características de cada una de sus células, el tamaño de las mismas y la simetría entre ellas. Se observó, así mismo, la presencia de fragmentos. Según éstas características se catalogó a los embriones según la escala de calidad de la Asociación para el estudio de la biología de la reproducción (ASEBIR). En el esquema de gradación de ASEBIR, (ASEBIR, 2015) se emplean 4 categorías divididas en función del potencial implantatorio esperado:

Tabla 5: Cuadernos de Embriología Clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Ovocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. ASEBIR. 3ªEdición. 2015.

Grado	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinudeación	Otros
A	D+2	4	≤10%	estado-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
B	D+2	5	>10-25%	4→7 células NO estadio-específico en D+3	NO	≤50% células con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
C	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células NO estadio-específico	1 cél. bn D+2, o bien 1-2cél. bn D+3 y el resto como Grado A ⁽¹⁾	≤50% células con vacuolas grandes
	D+3	6, 11, 12 2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10				
D	D+2	3 (NO estadio-específico), > 6	>35%	3 células No estadio-específico en D+2	Cualquier otro tipo de multinudeación	>50% células con Vacuolas pequeñas, o bien Grave alteración citoplasm. ⁽²⁾
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				

L.3.7. Dosis total acumulada de recFSH y recLH

Se sumaron todas las dosis de recFSH y recLH administradas durante los días de estimulación y el acumulado resultante se expresó en UI absolutas administradas a cada participante en el ciclo del estudio.

L.3.8. Embriones transferidos y tasa de implantación

Transferíamos de uno a tres embriones, siempre eligiendo los de mejor calidad posible. La transferencia selectiva de sólo 2 embriones en casos de buen pronóstico, en los que se dispone de un elevado número de embriones de buena calidad, puede ser útil para reducir la tasa de embarazo triple en FIV sin que afecte a la tasa final de embarazo. El número de sacos embrionarios resultantes, sobre el total de embriones transferidos define la tasa de implantación. Esta tasa de implantación se calculó en conjunto en cada grupo de tratamiento como parámetro de valoración para la eficacia.

L.3.9. Número de embarazos según criterio bioquímico

Llevamos a cabo la prueba de la β -hCG pasados 15-18 tras la administración de la hCG. El número de pruebas de embarazo positivas también se tuvo en cuenta para valorar la eficacia.

L.3.10. Número de embarazos clínicos

Llamamos embarazo clínico a la observación ecográfica de un saco embrionario pasados 35-45 días desde la administración de la hCG. Por embarazo clínico se entendió mujer embarazada, con independencia de que el embarazo fuera único, gemelar o triple.

L.3.11. Evaluación del embarazo

Se recogieron datos sobre la evolución del embarazo hasta el parto, como información complementaria. Se anotaron la presencia de abortos, embarazos ectópicos, partos pre-términos, embarazo y parto múltiple y morbimortalidad perinatal.

M. VALIDEZ DE LAS DETERMINACIONES

Las pruebas y determinaciones que se realizaron fueron adecuadas, inmediatas y objetivas para cuantificar la posible eficacia del tratamiento en el desarrollo de los folículos y ovocitos, así como el último objetivo perseguido, el embarazo. La cuantificación de los parámetros fue instrumental en la mayoría de los variables y aquellas que dependieron de la observación del investigador, se hicieron frente a unas escalas o patrones estándar con criterios bien predefinidos de antemano. La secuencia e interrelación mutua de las variables de valoración, garantizó la consistencia interna de los

resultados.

El número de variables consideradas fue amplio y no se omitió ninguna variable de importancia. Las unidades de medida de todas las variables son las estándar y permiten la comparación directa con los resultados de cualquiera de los estudios clínicos en esta área de la salud.

N. VARIABLE PRINCIPAL PARA LA EFICACIA.

La tasa de embarazo tras la estimulación ovárica fue la variable principal para valorar la eficacia. Tal parámetro fue valorados directamente por la parte del equipo de investigación perteneciente al Laboratorio de FIV.

O. GARANTÍA DE CALIDAD DE LOS DATOS

Durante el estudio se emplearon los mismos equipos técnicos y humanos que se emplean para la atención hospitalaria diaria de las mujeres que siguen tratamiento de *FIV*. Los controles de calidad periódicos del centro sobre los ecógrafos y otro utillaje, laboratorio de FIV, así como el laboratorio de hormonas se consideraron suficientes. La recepción, control, dispensación de la medicación del estudio se verificaron directamente en el Servicio de Farmacia y se aceptaron los formularios que dicho servicio tenía para el control y arqueo de las muestras del estudio clínico.

P. ESTUDIO DE COSTES

Para el análisis de costes, se tomaron como referencia los precios del Pergoveris y del Gonal en el mercado español (año 2017). Según esta referencia un vial de Pergoveris tiene el precio de 120 euros, mientras que un vial de Gonal cuesta 38, 11 euros.

Q. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de los datos de los grupos de estudio, mediante el cálculo de la media, desviación estándar, mínimo, máximo y número de casos para las variables cuantitativas número de ovocitos recuperados, número de embriones transferidos...y para las variables cualitativas se llevó a cabo la distribución de frecuencias absolutas y relativas. En el caso de las variables dicotómicas (proporción de pacientes embarazadas), las pacientes que no pudieran ser evaluadas debido a que no se haya inseminado ningún

ovocito, no se haya transferido embrión alguno, etc. se consideraban como pacientes en las que el tratamiento no fue eficaz. En el caso de las variables expresadas en forma de tasa o cociente (tasa de fertilización, tasa de implantación etc.), sólo se tendrían en cuenta las pacientes para las cuales se disponía del correspondiente numerador y denominador necesarios para calcular la tasa o cociente.

Para la comparación de medias entre grupos para comprobar la homogeneidad de varianzas se recurrió al test de Levene, si éste resultaba no significativo se calculaba la t de Student clásica o prueba de Mann Whitney.

Los valores medios de cada variable se debían analizar entre los dos grupos de tratamiento una vez que se hubiese comprobado que seguían una distribución normal. Si no era así, la prueba elegida era la U de Mann-Whitney

Se consideraba significativa una $p < 0,05$, las pruebas estadísticas fueron bilaterales y el análisis principal se realizó con los pacientes evaluables.

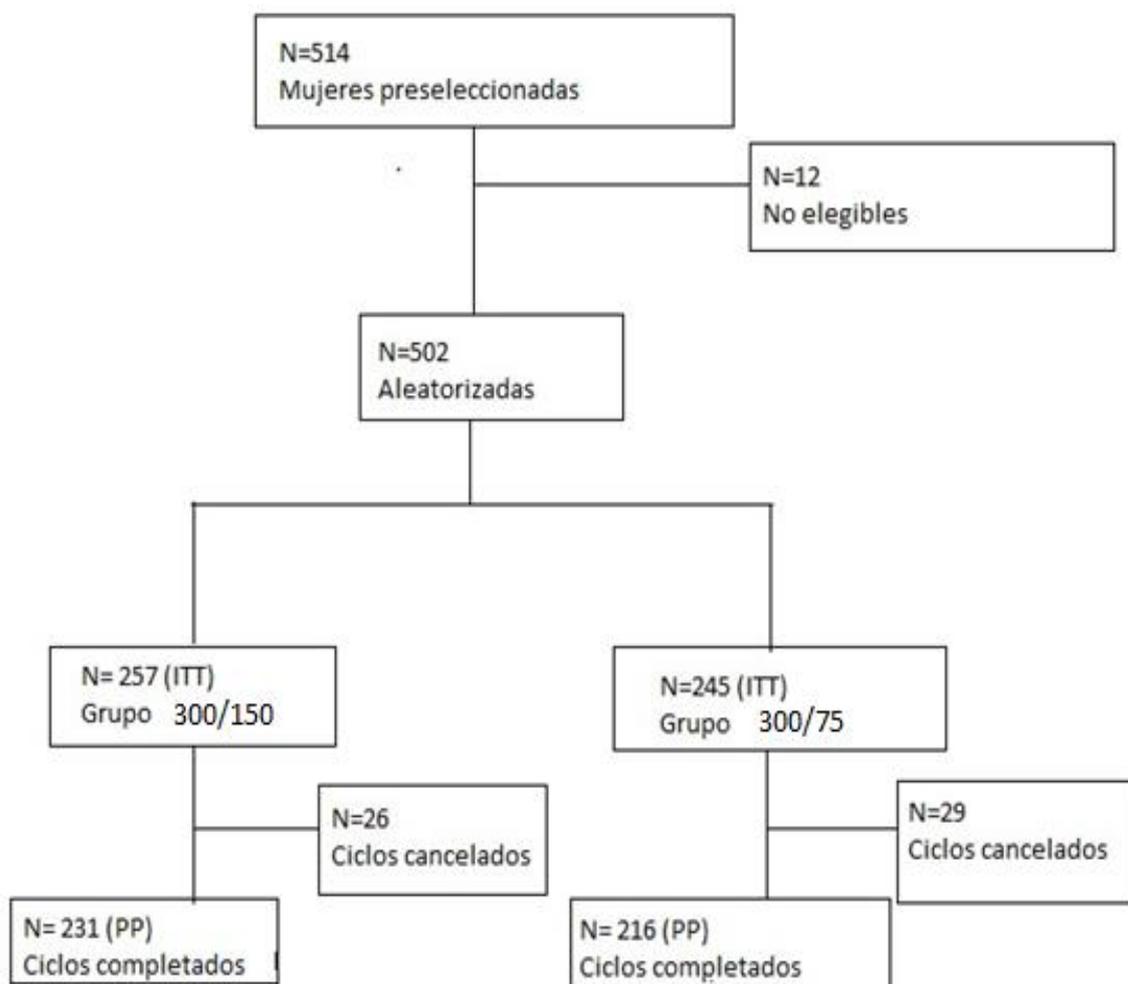
RESULTADOS

RESULTADOS

A. SUJETOS BAJO ESTUDIO

Un total de 514 mujeres fueron preseleccionadas en nuestro estudio cumpliendo los criterios de inclusión. De ellas, 502 fueron aleatorizadas dentro del estudio intención por tratar (ITT), para finalmente estudiar 447 casos que cumplían el protocolo de estimulación (PP).

Figura 15: Distribución de los pacientes a través del estudio.



Nuestra intención fue mantener constante la dosis de gonadotropinas tal y como lo describimos en nuestro protocolo. Sin embargo, fue necesario incumplir ese protocolo en 55 casos debido a la respuesta individual de cada paciente con el fin de ajustar la medicación lo mejor posible para conseguir los mejores resultados en su ciclo “*in-vitro*”.

A continuación se muestran los 12 casos seleccionados inadecuadamente, así como los 55 con incumplimiento mayor de protocolo

Los casos de incumplimiento mayor de protocolo se evaluaron, tanto para seguridad como para eficacia, por ITT, pero no por PP. Su distribución fue uniforme a lo largo del estudio. Por el contrario, aquellos casos *no elegibles* no se estudiaron ni se evaluaron. En conjunto, los casos inadecuadamente seleccionados y aquellos con incumpliendo grave del protocolo fueron menos del 10% del total de casos seleccionados y se distribuyeron uniformemente a lo largo del estudio, sin que se detectase un momento o periodo con mayor incidencia de casos no evaluables.

TABLA 6. DE FALLO DE SELECCIÓN (n=12)

PACIENTES NO ELEGIBLES		
MOTIVO	Grupo 300/150	Grupo 300/75
No llevó a cabo el tratamiento	2	3
No firmó el consentimiento informado (C.I.)	2	1
Excluida durante la selección	2	2
	N= 6	N=6

TABLA 7. INCLUMPLIMIENTO MAYOR DE PROTOCOLO (ciclos cancelados) (n=55)

CICLO EXCLUIDOS POR VIOLACIÓN DE PROTOCOLO		
Grupo 300/150	Grupo 300/75	Motivo
15	18	Incumplimiento grave del tratamiento por mala práctica en el uso de la recFSH. Excluida por PP
5	6	Fallo de aleatorización, le correspondía el grupo 300/150 y se trató con el 300/75.
4	3	Le correspondió tratamiento del grupo 300/150, pero no se pudo constatar con claridad que se administrara dicha medicación. Incluida ITT y excluida PP.
2	2	Error de aleatorización, le correspondió el grupo 300/75 y se trató con el del 300/150.
n=26	n=29	

*Todas estas pacientes se han evaluado por ITT pero no PP.

B. ANÁLISIS DE LOS SUJETOS BAJO ESTUDIO.

B.1. Serie de datos bajo análisis.

El análisis primordial se llevó a cabo a aquellos pacientes que completaron el estudio tal y como se definió. Como se ha comentado previamente el análisis del grupo de estudio se realizó en la población por ITT y en la población PP, cuya definición es la siguiente.

Serie de datos por intención de tratar (ITT): El análisis principal de eficacia se ha realizado en la serie de datos ITT, que incluye 502 participantes aleatorizadas y que, al menos, recibieron una dosis del producto de estudio.

Serie de datos por protocolo (PP): El análisis de apoyo de eficacia se ha realizado en la serie de datos PP, que engloba 447, tras la exclusión de 55 en los que no se cumplió el protocolo tal y como estaba fijado, siendo casos no-evaluables.

C. ANÁLISIS PRINCIPAL POR PROTOCOLO (PP)

C.1. Descripción de la muestra

La población de estudio estuvo compuesta por mujeres de 35 a 40 años de edad, sin sobrepeso, con una duración promedio de infertilidad de, mínimo, un año y nivel de FSH basal en la zona media o baja de la normalidad. No se vieron diferencias significativas en el nivel de estradiol entre ambos grupos. En los parámetros previamente comentados no vimos diferencias significativas, lo cual nos indicó que la respuesta al tratamiento por parte de las pacientes debería ser similar.

TABLA 8. Descripción de la muestra:

	Grupo 300/150 (n=231) Media ± D.E.	Grupo 300/75 (n= 216) Media ± D.E.	P
Edad	37,53±1,23	37,55±1,22	n.s.
Peso	62,66±11,11	64,24±11,13	n.s.
Talla	162,44±9,16	162,82±6,16	n.s.
IMC	23,62±2,6	24,39±2,9	n.s.
FSH Basal	7,87±2,36	8,45±2,15	n.s.
Estradiol	2300±1179,45	2110±1161,24	n.s.
Años de infertilidad	5,08±2,15	4,98±1,91	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

C.2. Características de la infertilidad.

No hubo diferencias en cuanto al tipo de infertilidad así como en la causa del tratamiento de fertilidad ni en los ciclos de reproducción asistida previos entre ambos grupos. Se vieron un número mucho más elevado de pacientes que padecían una infertilidad primaria en comparación que la infertilidad secundaria.

Tabla 9. Características de la infertilidad:

		Grupo 300/150 (n=231) N (%)	Grupo 300/75 (n= 216) N (%)
Tipo de infertilidad	-Primaria	154 (66,66%)	144 (66,6%)
	-Secundaria	77 (33,33%)	72 (33,3%)
Etiología de infertilidad	-Tubárica	38 (16,45%)	40 (18,50%)
	-Masculina	94 (40,69%)	91 (42,12%)
	-Endometriosis	24 (10,39%)	21 (9,72%)
	-Fracaso IAC	75 (32,46%)	64 (29,63%)
Ciclos de TRA previos	-1	123 (53,24%)	119 (55,09%)
	-2	72 (31,16%)	63 (29,16%)
	-3	33 (14,28%)	30 (13,8%)
	-4	3 (1,3%)	4 (1,8%)

N (%): número de casos (porcentaje)

C.3. Características del seminograma:

La calidad media del seminograma de las correspondientes parejas fue similar en ambos grupos (TABLA 10). En este estudio, la inseminación, en la gran mayoría de los casos, se realizó mediante ICSI, por lo que la calidad de los seminogramas tuvo una importancia menor.

Tabla 10. Seminograma del varón:

	Grupo 300/150 (n=231) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 216) Media± D.E.	P
Volumen	2,8±1,8	3,1±2,1	n.s.
Densidad (millones/ml)	49,3±25,8	51,8±27,3	n.s.
Formas móviles (%A+B)	27,3±16,8	25,9±18,4	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

D. ANÁLISIS PRINCIPAL POR INTENCIÓN DE TRATAR (ITT)

D.1. Descripción de la muestra:

La edad de los pacientes, su índice de masa corporal y el nivel plasmático de FSH, que son las variables que pueden afectar a la respuesta al tratamiento fueron similares en ambos grupos del estudio, reflejando la comparabilidad basal de ambos grupos del estudio.

Tabla 11. Descripción de la muestra

	Grupo 300/150 (n=257) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 245) Media± D.E.	P
Edad	37,39±1,23	37,33±1,42	n.s.
Peso	62,87±10,17	64,07±9,83	n.s.
Talla	161,95±12,52	163,13±5,97	n.s.
IMC	24,21±2,6	24,12±2,9	n.s.
FSH basal	7,69±2,22	8,14±3,15	n.s.
Estradiol	2362±1588,74	2143±1146,54	n.s.
Años infertilidad	4,99±2,11	4,88±1,8	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

D.2. Características de la infertilidad:

Es destacable al estudiar la tabla 12 que el número de casos de infertilidad primaria es bastante mayor que la secundaria, que el número de primeros ciclos abunda sobre pacientes con repetición de ciclos; así como la importancia de la infertilidad masculina en la esterilidad de la pareja.

Tabla 12. Características de la infertilidad:

		Grupo 300/150 (n=257) N (%)	Grupo 300/75 (n= 245) N (%)
Tipo de infertilidad	-Primaria	174 (67,7%)	168 (68,57%)
	-Secundaria	83 (32,3%)	77 (31,43%)
Etiología de infertilidad	-Tubárica	45 (17,50%)	48 (19,59%)
	-Masculina	101 (39,29%)	100 (40,81%)
	-Endometriosis	29 (11,28%)	28 (11,42%)
	-Fracaso IAC	82 (31,9%)	69 (28,16%)
Ciclos de TRA previos	-1	134 (52,14%)	125 (49,21%)
	-2	80 (31,12%)	73 (29,79%)
	-3	38 (14,78%)	40 (16,32%)
	-4	5 (1,9%)	7 (2,8%)

N (%): número de casos (porcentaje)

D.3. Características del seminograma

Siguiendo la misma tónica hasta el momento y como ya hemos citado con anterioridad no vimos ninguna diferencia significativa a la hora de analizar el seminograma del varón en lo que respecta a aquellos que pertenecían al grupo de intención por tratar.

Tabla 13. Seminograma del varón:

	Grupo 300/150 (n=257) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 245) Media± D.E.	p
Volumen	2,93±2,2	3,09±1,7	n.s.
Densidad (millones/ml)	50,1,3±27,8	51,1±24,3	n.s.
Formas móviles (%A+B)	26,3±19,8	24,7±19,8	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

E. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

E.1. Análisis por protocolo (PP)

En la dosis total de gonadotropinas vemos que hay diferencias significativas en la dosis total de LH. Este resultado se explica viendo el protocolo de estimulación entre los dos grupos, ya que como sabemos el grupo B (300/75) recibe la mitad de dosis de LH que el grupo A (300/150). No vemos diferencias, lógicamente, en el número de días que dura la estimulación ovárica.

Tabla 14. Dosis total de gonadotropinas:

	Grupo 300/150 (n=231) Media± D.E.	Grupo B 300/75 (n= 216) Media± D.E.	P
Dosis total de FSH(UI)	3170,89±794,18	3350,68±906,507	0,03*
Dosis total de LH (UI)	1576,61±404,28	807,72±135,35	0,00*
Días de estimulación	11,16±0,13	11,03±0,13	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar

E.2. Análisis por intención por tratar (ITT)

En la dosis total de gonadotropinas vemos que hay diferencias en la dosis total de LH. Este resultado se explica viendo el protocolo de estimulación entre los dos grupos, ya que como ya sabemos el grupo de 300/75 recibe la mitad de dosis de LH que el grupo A (300/150). No vemos diferencias, lógicamente, en el número de días que dura la estimulación ovárica.

Tabla 15. Dosis total de gonadotropinas:

	Grupo 300/150 (n=257) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 245) Media± D.E.	P
Dosis total de FSH(UI)	3174,68±764,25	3350,90±840,91	0,03*
Dosis total de LH (UI)	1582,91±396,74	818,46±143,13	0,00*
Días de estimulación	11,02±0,14	10,98±0,12	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

F. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DEL LABORATORIO:

No hubo diferencias, tanto en el grupo PP, como en el ITT, en cuanto a la media del número de ovocitos obtenidos tras la punción folicular, en el número de ovocitos inseminados y fecundados. Existió una homogeneidad en el día de la transferencia

embrionaria. No vimos diferencias significativas en el número de embriones que se transfirieron en cada tipo de tratamiento ni en el número de embriones criopreservados

F.1. Variables del laboratorio

No vimos diferencias significativas a la hora de analizar los parámetros relacionados con el laboratorio. Los ovocitos recuperados en punción, los maduros, los correctamente fecundados, así como los transferidos y criopreservados fueron muy similares al compararlos en ambos grupos, así como dentro de aquellas pacientes tratadas estrictamente por cumplimiento de protocolo (PP) (Tabla 16) y de las del grupo de intención por tratar (ITT) (Tabla 17). El día de la transferencia embrionaria y la transferencia selectiva de 2 embriones también coincidió.

F.1.1. Variables del laboratorio por PP

Tabla 16. Variables del laboratorio por PP:

	Grupo 300/150 (n=231) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 216) Media± D.E.	p
Nº de ovocitos por punción	9,06±5,53	8,61±5,11	n.s.
Nº de ovocitos en metafase II	7,18±4,86	6,72±4,72	n.s.
Eficacia ovocitaria	0,79	0,78	n.s.
Nº de ovocitos microinyectados	7,18±4,86	6,72±4,74	n.s.
Nº de ovocitos fecundados (2PN)	3,93±3,2	3,56±2,72	n.s.
Día de la Transferencia embrionaria	2,27±1,05	2,26±1,03	n.s.
Nº de embriones transferidos	1,94±1,1	1,92±1,3	n.s.
Nº de embriones criopreservados	0.21±0,762	0,15±0,71	n.s.
Transferencia selectiva de 2 embriones	15	16	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

F.1.2. Variables del laboratorio por ITT

Tabla 17. Variables del laboratorio tratados por ITT

	Grupo 300/150 (n=257) Media ± D.E.	Grupo 300/75 (n= 245) Media ± D.E.	P
Nº de ovocitos por punción	9,12±5,38	8,71±4,74	n.s.
Nº de ovocitos en metafase II	7,23±4,63	6,91±4,63	n.s.
Eficacia ovocitaria	0,79	0,79	n.s.
Nº de ovocitos microinyectados	7,23±4,63	6,91±4,63	n.s.
Nº de ovocitos fecundados (2PN)	3,98±3,1	3,65±2,28	n.s.
Día de la Transferencia embrionaria	2,31±1,15	2,18±1,08	n.s.
Nº de embriones transferidos	1,90±1,1	1,91±1,1	n.s.
Nº de embriones criopreservados	0.23±0,74	0,16±0,64	n.s.
Transferencia selectiva de 2 embriones	19	17	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

F.2. Tasa de fecundación

La tasa media de fertilización fue similar en ambos grupos de estudio, esto puede deberse a que la calidad ovocitaria en ambos grupos, así como las técnicas llevadas a cabo para su fertilización fueron similares.

F.2.1 Tasa de fecundación por PP

Tabla 18: Tasa de fecundación por PP

	Grupo 300/150 (n=231) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 216) Media± D.E.	P
Tasa Fecundación (%)	54.73±23,65	52.97±22,05	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar

F.2.2. Tasa de fecundación por ITT

Tabla 19: Tasa de fecundación por ITT:

	Grupo 300/150 (n=257) Media± D.E.	Grupo 300/75 (n= 245) Media± D.E.	P
Tasa Fecundación (%)	55.04±24,33	52.82±24,69	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

F.3. Calidad embrionaria

Las características de los embriones según su calidad y siguiendo las directrices de ASEBIR muestra un mayor número de embriones transferidos de calidad A y B, sin ser significativo la calidad embrionaria transferida entre los grupos de estudio. En la mayoría de las transferencias llevamos a cabo la elección de dos embriones de calidad óptima (A y B) siguiendo la clasificación de ASEBIR. Por lo que las transferencias, en su mayoría, son de calidad alta. Se muestran las tablas de los grupos tratadas por protocolo así como las de intención por tratar.

F.3.1 Calidad embrionaria por PP

Tabla 20. Calidad embrionaria por PP:

	Grupo 300/150 (n=231) Media ± D.E.	Grupo 300/75 (n= 216) Media ± D.E.	P
Embrión calidad A	1,1±1,0	1,2±1,1	n.s.
Embrión calidad B	1,1±1,3	1,1±1,4	n.s.
Embrión calidad C	0,6±0,7	0,8±0,9	n.s.
Embrión calidad D	0,4±0,4	0,3±0,5	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

F.3.2. Calidad embrionaria por ITT

Tabla 21. Calidad embrionaria por ITT:

	Grupo 300/150 (n=257) Media ± D.E.	Grupo 300/75 (n= 245) Media ± D.E.	P
Embrión calidad A	1,2±1,0	1,2±1,1	n.s.
Embrión calidad B	1,1±1,2	1,0±1,3	n.s.
Embrión calidad C	0,5±0,5	0,8±0,9	n.s.
Embrión calidad D	0,3±0,4	0,3±0,5	n.s.

n: número de casos.

Media ± D.E.: media aritmética ± desviación estándar.

F.4. Tasa de implantación:

F.4.1. Tasa de implantación por PP:

Se transfirieron un total de 860 embriones, 446 embriones en el grupo 300/150 por 414 en el grupo 300/75, en el grupo 300/150 se implantaron 67 embriones mientras que en el grupo 300/75, 62. Vemos que la tasa de implantación es de 15,02% en el grupo 300/150 y de 14,97% en el grupo 300/75.

Tabla 22: Tasa de implantación por PP

PP	Grupo 300/150	Grupo 300/75
Embriones transferidos	446	414
Embriones implantados	67	62
Tasa de implantación	15,02%	14,97%

F.4.2. Tasa de implantación por ITT:

Se transfirieron un total de 955 embriones, 488 embriones en el grupo 300/150 mientras que en el grupo 300/75 fueron 467. Vimos que en el grupo 300/150 se implantaron 73 embriones por lo que su tasa de implantación fue de 14,95% mientras que en el grupo 300/75 los embriones implantados fueron 69 con una tasa de implantación prácticamente igual a la del grupo 300/150, 15,63%

Tabla 23: Tasa de implantación por ITT

ITT	Grupo 300/150	Grupo 300/75
Embriones transferidos	488	467
Embriones implantados	73	69
Tasa de implantación	14,95%	15,63%

F.5. Tasa de gestación

F.5.1. Tasa de embarazo por PP:

La tasa de gestación en el grupo de pacientes tratadas por protocolo fue de 27,2% en el grupo 300/150 y de 28,9% en el grupo 300/75 por punción, y de 29% en el grupo 300/150 y 31,60% en el grupo 300/75 por transferencia. Por ciclo iniciado, la tasa ascendió a 29% en el grupo 300/150 y a 28,7% en el grupo 300/75. La tasa de RNV por punción en el grupo 300/150 fue de 22,52%, mientras que en el grupo 300/75 fue de 24,63%. Por transferencia, se vio que era 25,04% en el grupo 300/150 y de 27,12% en el 300/75.

Tabla 24: Resultados de las gestaciones por PP:

PP	Grupo 300/150 N (%)	Grupo 300/75 N (%)	P
Gestación por ciclo iniciado	29%(67/231)	28,7%(62/216)	n.s.
Gestación por punción	27,20%	28,9%	n.s.
Gestantes por transferencia	29%	31,6%	n.s.
RNV	56	54	
RNV por punción	22,52%	24,63%	n.s.
RNV por transferencia	25,04%	27,12%	n.s.

(%): porcentaje

F.5.2. Tasa de embarazo por ITT

El porcentaje de embarazo por ciclo iniciado fue de 28,01% en el grupo 300/150 y de 28,16% en el grupo 300/75. La tasa de gestación en el grupo de pacientes tratadas por intención por tratar fue de 26,17% en el grupo 300/150 y de 26,88% en el grupo 300/75 por punción, y de 28,4% en el grupo 300/150 y 28,16% en el grupo 300/75 por transferencia. La tasa de RNV por punción en el grupo 300/150 fue de 20,89%, mientras que en el grupo 300/75 fue de 22,12%. Por transferencia, se vio que era 22,87% en el grupo 300/150 y de 24,07% en el 300/75.

Tabla 25: Resultado de las gestaciones por ITT

ITT	Grupo 300/150 (%)	Grupo 300/75 (%)	P
Gestación por ciclo iniciado	28,01% (72/257)	28,16%(69/245)	n.s,
Gestación por punción	26,17%	26,88%	n.s
Gestantes por transferencia	28,16%	28,4%	n.s.
RNV	58	59	
RNV por punción	20,89%	22,12%	n.s.
RNV por transferencia	22,87%	24,07%	n.s

(%): porcentaje

G. EVOLUCIÓN DEL EMBARAZO

G.1. Evolución del embarazo por PP

La mayoría de los embarazos fueron únicos de forma similar en ambos grupos del estudio. El número de embarazos triples fue de 1 en el grupo 300/150. Considerando ambos grupos, el embarazo múltiple se dio en alrededor de un 30% de los casos. El número de abortos fue similar en ambos grupos.

Tabla 26: Tabla de la evolución del embarazo por PP:

	Grupo 300/150 (n=231) N (%)	Grupo 300/75 (n= 216) N (%)	P
Embarazo único	44 (19,04%)	41 (18,98%)	n.s.
Embarazo doble	11 (4,76%)	13 (6,02%)	n.s.
Embarazo triple	1 (0,43%)	0 (0%)	n.s.
Aborto	9 (3,89%)	7 (3,24%)	n.s.
Embarazo ectópico	2 (0,86%)	1 (0,46%)	n.s.
Total	67	62	

N (%): número de casos (porcentaje)

G.2 Evolución del embarazo por ITT

En el grupo de las pacientes con intención por tratar, afortunadamente, no se dio ningún embarazo triple, favoreciendo así la ausencia de riesgo para las pacientes. Se mantuvo alrededor de un 30% el porcentaje de embarazo múltiple y un porcentaje similar en el número de abortos de cada grupo.

Tabla 27: Tabla de la evolución del embarazo por ITT:

	Grupo n=257 N (%)	Grupo n= 245 N (%)	P
Embarazo único	47 (18,28%)	44 (17,96%)	n.s.
Embarazo doble	11 (4,28%)	15 (6,12%)	n.s.
Embarazo triple	0 (0%)	0 (0%)	n.s.
Aborto	12 (4,61%)	9 (3,67%)	n.s.
Embarazo ectópico	2 (0,78%)	1 (0,41%)	n.s.
Total	72	69	

N (%): número de casos (porcentaje)

H. GASTO EN MEDICAMENTOS:

Partiendo de los precios que encontramos en el mercado, un vial (monodosis 150UI de rec FSH/75UI de rec LH) de Pergoveris cuesta 120 euros, mientras que un vial (monodosis de 75 UI) de Gonal cuesta 31,47 euros.

Como ya hemos definido, en nuestro grupo 300/150 usamos 2 Pergoveris (300 UI de FSH + 150 UI de LH) mientras que en el grupo B usamos 1 Pergoveris (150 UI de FSH + 75 UI de LH) más 2 Gonales (150 UI de FSH). Por lo que la proporción es de 2/1 contra 4/1 de FSH/LH.

Grupo 300/150 (120 euros x 2) x 11,02 días = 2644,08 euros de gasto por parte del grupo 300/150 en lo que tarda el ciclo.

Grupo 300/75 $(120 \text{ euros} + 31,47 \times 2) \times 10,98 \text{ días} = 2008,7 \text{ euros}$ de gasto por parte del grupo 300/75 en lo que tarda el ciclo.

La diferencia entre ambos grupos es de 635,38 euros $(2644,08 - 2008,7)$.

A continuación, buscamos la relación entre el gasto económico y el éxito del embarazo en cada grupo bajo estudio. La conclusión es que en el grupo con menos gasto económico, grupo 300/75, presenta un mayor porcentaje de éxito de embarazo. Vemos que en el grupo 300/150 el gasto medio durante los 11,02 días que dura el ciclo es de 2644,08 euros con un porcentaje de éxito de embarazo del 28,01% mientras que en el grupo 300/75 el gasto es de 2008,7 euros con un porcentaje de éxito de embarazo del 28,16% durante los 10,98 días de estimulación.

Desde otro punto de vista, el coste por embarazo del grupo 300/150 es de 4.236 euros más caro que el tratamiento en el grupo 300/75. Por tanto, desde el punto de vista del coste / beneficio la opción a recomendar sería la del grupo 300/75.

Tabla 28: Gasto de medicamentos.

ITT	Grupo 300/150	Grupo 300/75
Días de estimulación	11,02	10,98
Coste de dosis diaria	$(120\text{€} \times 2)$	$(120\text{€}) + (31,47\text{€} \times 2)$
Coste de ciclo de estimulación	2644,8€	2008,68€
Diferencia de coste por ciclo	+636.12€	
Tasa de embarazo ciclo/iniciado	28,01%	28,16%
Diferencia en tasa de embarazo/ciclo iniciado		+0,15%
Ahorro por embarazo		+4236 €

I. COMPLICACIONES

Durante el tiempo de administración de los fármacos, recLH y recFSH, al menos se realizaron dos visitas de control en las que se verificó la seguridad clínica y tolerabilidad local del tratamiento. Durante el estudio sólo se objetivaron dos acontecimientos adversos graves: un síndrome de hiperestimulación ovárica y un episodio de inflamación pélvica. Ningún otro acontecimiento adverso clínico, analítico o signo de irritación en el punto de administración del producto experimental se detectaron durante el estudio. La descripción de los dos acontecimientos graves mencionados es la siguiente:

1) Participante de 36 años que ingresó por presentar un síndrome de hiperestimulación ovárica. La participante alcanzó un nivel plasmático de estradiol era de 3.754 g/ml. Permaneció en el hospital 25 días requiriendo la administración de albúmina por vía intravenosa, furosemida y anticoagulantes (Enoxaparina 40mg/0.4ml iv). Preciso la realización de una paracentesis para evacuación de líquido.

2) Participante de 35 años que presentó un episodio de inflamación pélvica. La historia clínica de la paciente era anodina y no estaba tomando medicación concomitante alguna en el momento del acontecimiento adverso. La inflamación pélvica, post-aspirado folicular, se presentó junto con dolor abdominal, fiebre y leucocitosis. Requirió hospitalización y tratamiento con amoxiclavulánico y gentamicina intravenosa y después pasó a amoxiclavulánico y clindamicina por vía oral. El cuadro cesó sin secuelas.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La cuestión de qué gonadotropina utilizar a la hora de llevar a cabo con éxito la estimulación ovárica en mujeres sometidas a tratamiento de reproducción asistida sigue siendo cuestión de debate en términos de eficacia y seguridad. Muchos estudios, tanto retrospectivos (Daya et al., 1995; Agrawal et al., 2000) como prospectivos (Westergaard et al., 1996; Jansen et al., 1998) se ha llevado a cabo sin llegar a una conclusión clara.

En los protocolos de estimulación ovárica se han utilizado, a lo largo del tiempo, tanto la FSH como la LH para intentar imitar la foliculogénesis ovárica natural lo más parecido posible. El debate comienza a la hora de elegir qué concentraciones de esas dos hormonas recombinantes utilizar y durante cuánto tiempo.

Es sabido que la FSH induce el desarrollo de los folículos de cualquier tamaño, los receptores de FSH están presentes en las células de la granulosa de cualquier folículo, mientras que no están presentes en todas las células de la teca (Yamoto et al., 1992). Los receptores de la LH, por su parte, están expresados tanto en las células de la teca como en las células de la granulosa de los folículos antrales ya desarrollados (>10 milímetros de diámetro) (Shima et al., 1987). Así pues, además de reducir la síntesis de andrógenos por las células de la teca, la actividad de la LH es capaz de estimular folículos de tamaño importante (The European Recombinant Human LH Study Group, 1998). La actividad de la LH puede ser la de inducir, gracias a los andrógenos, la atresia de folículos pequeños mientras que mantienen los folículos de mayor tamaño que hayan expresado en sus células de la granulosa los receptores de la LH (Sullivan, 1999), así como durante las primeras fases del ciclo ovárico estimula la síntesis de andrógenos en las células de la teca que conllevará la producción de estrógenos, potenciando la acción de la FSH sobre las células de la granulosa (Weil S et al., 1999). De la mano de este estudio, Filicori et al. en 2002 publican un estudio en el que manteniendo la dosis fija de FSH a 150 UI/día y variando la dosis de LH rec observaron que al aumentar la dosis de LH rec el número de folículos pequeños decrece. Otros estudios confirman esta teoría como son los de Hompes et al., en 2008 y Andersen et al., en 2006. Vieron que a la vez que existe una clara disminución de los folículos pequeños existe una mejoría en la calidad de los folículos de mayor tamaño en presencia de la LH rec. En nuestro estudio, en el que también se fija la

dosis de FSH rec para comparar distintas dosis de LH rec no vemos diferencias significativas entre ambos grupos pudiendo pensar que una dosis de 75 UI/día sería suficiente a la hora de llevar a cabo la estimulación ovárica en mujeres arias. Otro estudio que avala que la suplementación con LH rec mejora los ciclos de estimulación ovárica visto desde otro foco es el de Ruvolo et al., 2007 en el que concluyen que la suplementación con LH rec mejora los ciclos ya que observan que disminuye la concentración de células apoptóticas de los cúmulos oóforos en comparación con los ciclos tratados únicamente con FSH rec, esto puede favorecer la calidad ovocitaria ya que los cúmulos ooforos desarrollan distintas funciones como son la protección del ovocito, la coordinación del desarrollo folicular y la maduración del ovocito. En este último caso, está relacionado con la regulación del transporte de aminoácidos, la síntesis de esteroides y la transcripción génica del ovocito. (Fauser et al., 2011). Se comprobó que la reducción las células apoptóticas de los cúmulos en el grupo suplementado con la LH rec podría ser el resultado de niveles más bajos de factor de crecimiento folicular vascular endotelial (VEGF), marcador relacionado con la madurez y la calidad ovocitaria que se produce por células de la granulosa y las de la teca en respuesta a la FSH, LH, hCG y los factores de proliferación y apoptosis (Pezzuto et al., 2010). Estos estudios resaltan el papel primordial que puede tener la LH.

Es cierto que la FSH puede ser suficiente para obtener un crecimiento folicular adecuado en ciclos de estimulación ovárica. Sin embargo, durante este proceso la LH endógena puede ser suprimida tan profundamente por el eje hipofisario que “algo” de actividad LH es útil para conseguir un adecuado éxito esteroidogénico así como el del desarrollo óptimo en la capacidad de los folículos de ovular cuando se exponen a hCG (Couzinet et al., 1988; Schoot et al., 1994, Humaidan et al., 2004). La acción combinada, de las dos gonadotropinas en las células de la granulosa y en las células de la teca se ve expresada en la teoría de las “2 células – 2 gonadotropinas” (Hillier, 1994), en ella como ya hemos mencionado con anterioridad, afirma que se necesita la combinación tanto de la FSH como de la LH para producir niveles adecuados de estrógenos (estradiol). Éstos son los encargados de estimular la proliferación del endometrio así como la formación de vasos sanguíneos que cumplen un rol crítico en la implantación. Por todo esto, una mínima exposición a la LHrec es necesaria para el óptimo desarrollo folicular (“umbral de la LH”).

Muchos estudios comienzan la suplementación de la LH a partir del día 6 de estimulación ovárica controlada, ya que Hillier (Hillier, 2001) concluye que la LH juega un papel fundamental en la maduración ovocitaria durante los últimos estadios del ciclo ovárico. Behre et al., en 2015 llevan a cabo un estudio en el que tratan de analizar cuándo es mejor introducir la LH rec en el ciclo de estimulación ovárica. Se trata de un estudio parecido al nuestro desde el punto de vista que el grupo poblacional va de 36 a 40 años, y usan agonistas (éstos, en las últimas décadas se han empleado en los protocolos de estimulación ovárica en combinación con las gonadotropinas para prevenir un pico prematuro de LH). Divide la población en dos grupos, uno con FSH rec más LH rec (2:1) desde el día 1 y el otro FSH rec del día 1 al día 5 y a partir del día 6, FSH rec más LHrec (2:1). Ven pequeñas diferencias no significativas a favor del primer grupo a la hora de analizar los porcentajes de embarazo, pudiendo favorecer la calidad ovocitaria y receptividad uterina. Esto junto con otros estudios como los de Howles et al., 1986 y los de Stranger y Yovich, 1985 donde sugieren que altos niveles de LH rec puede conllevar la atresia folicular y abortos espontáneos, avalan nuestra teoría de que introducir la LH rec desde el comienzo del ciclo así como la concentración de 75UI/ml de LH rec es suficiente. Por todos esto se acuñó el término de ventana terapéutica para la LH que conllevará la óptima producción de estradiol provocando el éxito del ciclo FIV (Kumar and Sait, 2011)

Se ha descrito que niveles de LH sérico mayores o iguales a 1,2UI/l son necesarios para ayudar junto con la FSH a un óptimo desarrollo folicular (Loumaye and O'Dea, 2002), siempre y cuando la secreción endógena de la LH esté ausente. En 1998 la European Recombinant Human LH Study Group afirmó que una inyección diaria de LHrec de 75UI era suficiente. Lo que, como ya hemos mencionado antes, nuestro estudio también concluye.

Se sugirió (Hillier, 1994) que el desarrollo de los folículos tiene unos requerimientos finitos a la exposición de la LH, por encima de los cuales la maduración normal cesa y por lo tanto afecta negativamente el proceso reproductivo (Shoham, 2002). Este último artículo acaba concluyendo que la suplementación exógena con FSH rec y LH rec es fundamental en la estimulación ovárica de pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico. Observaron que la administración de 75UI/día de LH rec era suficiente para provocar la producción gonadal de estrógenos apoyando así la teoría del umbral de LH.

Figura 16: Ventana terapéutica de la LH. (Cuadernos de medicina reproductiva, 2014).



Este concepto se denominó “techo de la LH”, definido como un límite superior en la estimulación. Nosotros no vemos que por encima de 75UI mejoren los parámetros bajo estudio, pero tampoco empeoran los mismos a una dosis de 150UI. Al hilo de esta cuestión Loumaye et al., en 2003 llevaron a cabo un estudio con pacientes anovuladoras con un rango de edad de 18 a 39 años, creando dos grupos. El primero tratado con FSH más LH, cuando un folículo adquiría un diámetro de 10 a 13 mm subdividían el grupo en tres; el primero seguían con FSH más LH, el segundo FSH y el tercero con LH. La dosis de LH fue de 225 y la de FSH se fijaba en función de los requerimientos del ciclo. En el segundo grupo tratadas con FSH y cuando adquirían un folículo de entre 8 y 13 milímetros les subdividían en tres grupos; el primero con LH (225UI/día), el segundo con LH (450UI/día) y el tercero con placebo. Todo esto durante al menos de 7 días. En ambos estudios la evaluación folicular fue similar y estable en respuesta a la LHrec. Vieron que la actividad de la LH rec sin la FSH rec es perjudicial para la calidad de los ovocitos, por lo que, como hemos comentado anteriormente y siguiendo la teoría de “2 células – 2 gonadotropinas”, lo ideal es un balance entre ambas hormonas. Concluyen que existe un beneficio potencial a la hora de usar la LH rec en protocolos de estimulación ovárica en búsqueda de promover la mono-ovulación, así como proporciona una evidencia clínica de la existencia de un techo de LH, que, cuando se sobrepasa, da como resultado un serie

de efectos que van desde la detención completa del crecimiento folicular al deterioro de la capacidad de luteinizante.

De acuerdo con los conceptos actuales en la foliculogénesis, la LH juega un papel esencial en las etapas finales de la maduración folicular (Hillier, 2001, Zeleznik, 2001). Una vez que en la fase folicular se ha logrado un desarrollo apropiado en respuesta al tratamiento con FSH rec, las células de la granulosa se hacen receptivos a la estimulación con LH, y ésta se vuelve capaz de ejercer sus acciones tanto en las células de la teca como en las de la granulosa. De hecho, concentraciones no saturantes de FSH y LH, provoca una respuesta sinérgica. Por otra parte, se ha postulado que el folículo maduro reduce su dependencia a la FSH mediante la adquisición de receptores de LH (Hillier, 2001, Zeleznik, 2001). Por lo tanto, la LH rec puede desempeñar un papel esencial en la determinación de la madurez de los ovocitos y su potencial desarrollo en los ciclos de *FIV*.

A. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El objetivo de este estudio prospectivo, randomizado, controlado fue determinar la influencia de dos protocolos distintos de estimulación ovárica, recFSH/recLH (2/1 *versus* 4/1), en mujeres de edades comprendidas entre 35- 39 años sometidas a ICSI. No habíamos encontrado en la bibliografía estudios que hubiesen analizado grupos poblaciones con nuestra proporción en la concentración de hormonas. Su finalidad fue la de observar si existen diferencias entre ambos grupos en cuanto a los parámetros hormonales, número y calidad de ovocitos y embriones, así como tasas de implantación, gestación y RNV. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos poblaciones.

B. ACTIVIDAD LH

La LH es la encargada de inducir la síntesis de andrógenos por parte de las células de la teca, además es capaz de estimular el crecimiento de folículos de gran tamaño en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico (Fillicori et al., 1999) jugando un papel relevante en estimulaciones ováricas de pacientes bajo tratamiento de reproducción asistida (Sullivan, 1999). El efecto de la actividad LH en folículos de menor tamaño puede ser el de provocar la atresia folicular, pudiéndose ser debido a un aumento en los niveles

de andrógenos intrafoliculares.

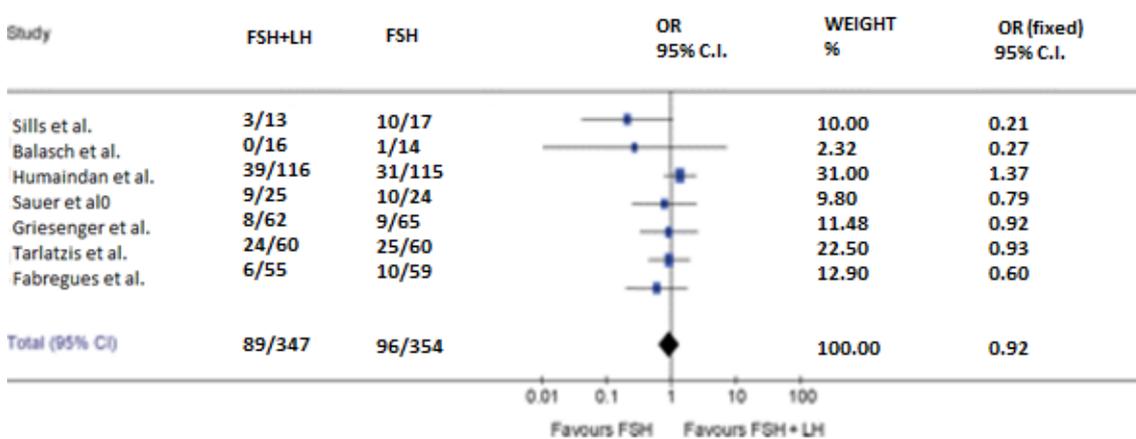
El efecto de la LH a la hora de añadirla en los protocolos de estimulación ovárica ha sido ampliamente debatido en las últimas décadas. Parece obvio poder afirmar que los eventos que ocurren durante la foliculogénesis, especialmente las fluctuaciones en las concentraciones de FSH y LH, tienen un impacto significativo en los posibles cambios funcionales del ovocito así como en su posible capacidad de éxito. Es bien conocido que la FSH y la LH juegan papeles por separado pero complementarios, provocando, a través de esta sinergia, acciones positivas en la estimulación folicular, viéndose reflejada en el crecimiento folicular y ovulación (Shoham, 2002). Una revisión Cochran sugiere que la adición de la LH en protocolos de hiperestimulación ovárica controlada junto con la FSH rec aumenta los porcentajes de embarazo en mujeres con baja respuesta ovárica (Mochtar et al 2007), esta revisión se vio confirmada con un ensayo randomizado con pacientes de baja respuesta en las que aquellas mujeres tratadas con FSH rec más LH rec presentaban un 33% de tasa de embarazo comparado con un 25% en mujeres tratadas solamente con FSH rec dentro del grupo de mujeres por intención por tratar, así como se ve dentro del grupo poblaciones de 36 a 39 años que la adición de LH rec suponía un incremento significativo en la tasa de implantación (18,9% con FSH rec frente a 26,7% suplementada con LH rec). El mecanismo de acción mediante el cual la LH puede mejorar los resultados en estas poblaciones podrá deberse a la restauración del microambiente folicular por un lado, lo cual daría lugar a una mejor calidad ovocitaria y embrionaria, y a una mejor receptividad endometrial, asociada a unos niveles más bajos de progesterona al final de la estimulación. En el otro grupo poblacional analizado en este estudio, pacientes menores de 36 años, no aumentó la tasa de implantación ni de gestación. Se asemeja a nuestro estudio en que la incorporación de la LH rec es desde el comienzo de la estimulación, buscando por esta vía maximizar la producción de andrógenos por parte del ovario, aunque utilizan un protocolo de antagonistas de la GnRH, por todo esto Bosch sí que concluye que en grupos de mayor edad (36 a 39 años, similar al nuestro) podría ser beneficioso la administración de LH rec comparándolo con pacientes menores de 36 (Bosch et al., 2011). Esto puede deberse al hecho de que los niveles androgénicos séricos disminuyen profundamente con la edad. La administración de la LH rec aumenta la producción de andrógenos seguida de una aromatización de los estrógenos, por lo que al

introducir la LH se restaura el medio folicular endometrial pudiendo, así, mejorar el éxito del ciclo. Sin embargo, y en contraposición a todo esto, numerosos estudios han demostrado el éxito en tratamientos de reproducción asistida con el único uso de la FSH rec (Tarlantzis et al., 2006, Balasch et al 2003, Sills et al., 1999).

C. POBLACIONES ANALIZADAS

Dentro de poblaciones estudiadas en general, sin sesgos de edad, 5 meta análisis, que incluyen 76 estudios, intentan analizar el efecto de la LH en pacientes tratados con FSH. El meta análisis llevado a cabo por Kolibianakis et al., en 2007 estudió ese efecto de la LH rec sobre el porcentaje de éxito de conseguir un RNV. De un comienzo de 74 estudios, la cuestión bajo el estudio se vio en 7 de ellos. El autor quiere analizar si la adición de la LH rec en ciclos con análogos de GnRH y FSH puede estar asociada a la probabilidad del obtener un RNV. No se puede descartar, lógicamente, que la suplementación en la fase folicular de la LH rec puede tener efectos positivos en los porcentajes de embarazo, independientemente de cualquier efecto de los niveles endógenos de la LH endógena. Este meta análisis concluye, a través de los siete estudios que la suplementación de la LH rec no aumenta la tasa de RNV.

Tabla 29: Odds Ratio de los meta análisis



Como podemos observar en la Tabla 29, La odds ratio (OR) para el recién nacido fue de 0,92 (95% IC: 0,65 a 1,31, p=0,65 de heterogeneidad: p=0,39), en modelo de efectos fijos, lo que parece poder concluir que la probabilidad de obtener el RNV no está relacionada

con la suplementación de la LH rec en los ciclos de pacientes tratados con análogos de la GnRH y FSH rec.

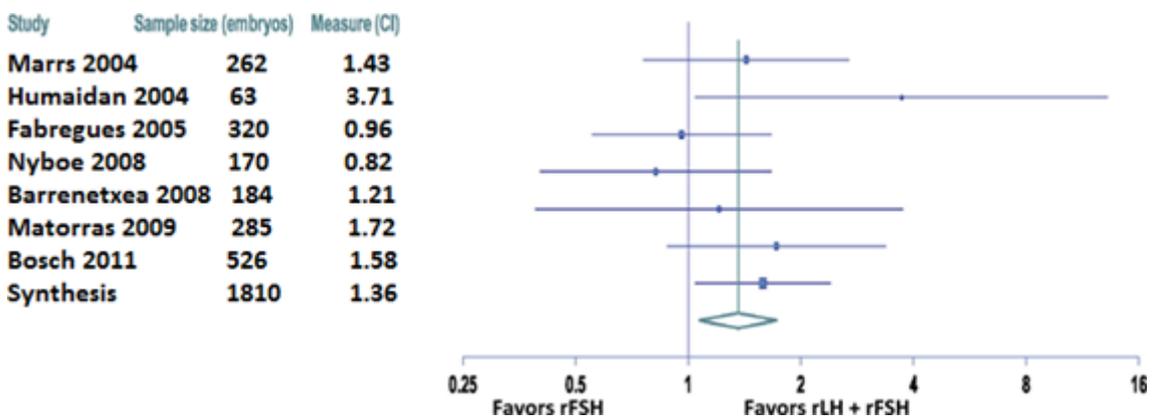
También concluye que la necesidad de continuar con más estudios de este tipo es necesario, así como no ven ninguna tendencia en el efecto de la suplementación de la LH rec en función de la dosis añadida, y que no depende de si añades 75 o 150 UI de LH rec.

Otro de los meta análisis que estudia el efecto de la suplementación de la LH rec en protocolos de GnRH agonistas con FSH rec es el de Oliveira et al., en 2007. Sus resultados, a través de cuatro estudios, analizan la suplementación con LH rec a la FSH rec en protocolos de estimulación ovárica con agonistas de la GnRH. Concluyeron que no se vieron diferencias en el número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos maduros, porcentaje de embarazo por ovocito obtenido, así como porcentaje de implantación y de aborto, pero sí que vieron dentro del grupo de pacientes suplementadas con LH rec que se necesitaron menos días de estimulación, administrar menor cantidad de FSH rec así como unos niveles mayores de estradiol sérico. Se ha podido ver que la disminución de los valores de estradiol sérico puede estar relacionado con un fallo en la esteroidogénesis ovárica en protocolos con análogos de GnRH (Davis and Rosenwaks, 1992). Puede ser que la LH a través de la secreción de estradiol vía ovárica tenga efectos directos en el endometrio. (Tesarik y Mendoza, 2002)

El tercer estudio, en 2012 Hill et al., llevan a cabo otro meta análisis dentro de nuestro mismo grupo poblacional, mujeres de 35 a 40 años. Intentan dilucidar, de nuevo, si la LH dentro de esas pacientes es beneficioso o no. Ven que es importante que si se añade LH rec en pacientes con valores de LH elevados puede provocar la supresión de las células de la granulosa y provocarles la atresia folicular. Está demostrado que solamente es necesario que estén ocupados el 1% de los receptores de la LH para conseguir una adecuada estimulación ovárica en ciclos de reproducción asistida (Chappel y Howles, 1991). Muchos otros estudios y meta análisis han estudiado la respuesta de las poblaciones bajo tratamiento *FIV* a la suplementación con LH rec, pero muchos de ellos, y de los que hemos estudiado, la población era muy pequeña, o de otras edades. Sin embargo, este meta análisis coincide totalmente con el nuestro en ese aspecto. De 147 estudios que comenzaron a analizar, finalmente se quedaron con siete artículos

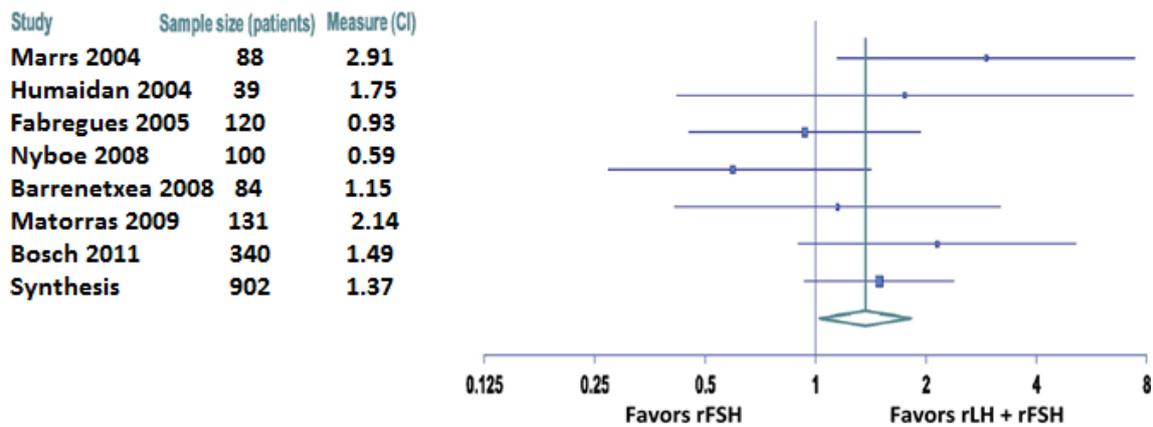
completos. Concluyen que estas mujeres tienen mejores tasas de implantación y de embarazo clínico en el grupo de FSH rec más LH rec que las de solamente FSH rec. Es verdad que a la hora de evaluar el rendimiento ovocitario ven que en los dos grupos es similar (la LH está tiene una mala relación con folículos pequeños mientras que la FSH tiene una buena relación con esos folículos). Lo que parece que mejora la implantación y el embarazo clínico es la competencia ovocitaria y la receptividad endometrial. Datos estos últimos que se confirman con el estudio de Ruvolo et al., en el que afirman que aquellos ciclos suplementados con LH rec muestran menores niveles de células del cúmulo apoptótica, lo que puede demostrar la mejor competencia ovocitaria en ciclos de LH rec. Por último, otra de las posibles ventajas que se plantean a la hora de administrar la LH rec en mujeres añosas es que parece que restaura el entorno del folículo en desarrollo (Bosch et al., 2011), evitando un aumento prematuro de la progesterona que podría estar relacionado con un efecto negativo en el endometrio (Fanchin et al., 1997).

Tabla 30: Tasa de implantación



En esta figura podemos ver el aumento en la tasa de implantación en el grupo de la LH rec (OR 1.36, 95% CI 1,05 a 1,78)

Tabla 31: Embarazo clínico



En esta otra figura podemos observar el aumento del embarazo clínico en el grupo de la LH rec (OR 1.37, 95% CI 1.03–1.83)

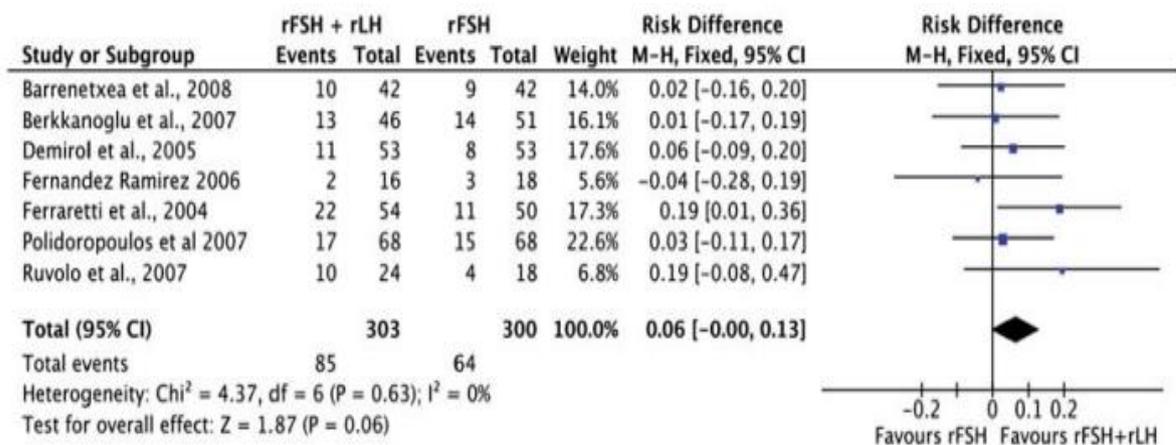
Recientemente, en 2014, Lehert et al., llevan a cabo otro meta análisis que tiene gran importancia debido al hecho de la gran cantidad de casos que agrupa. Analizaron datos de estudios desde 1990 a 2011. Se llegaron a identificar 2.359 estudios, hasta quedarse con 40 de ellos, con 6.443 pacientes. Los pacientes estudiadas van de desde los 18 hasta los 45 años. Tras llevar a cabo los análisis estadísticos concluyen que en la población total bajo estudio no hay diferencias significativas entre el grupo de FSH rec versus FSH rec más LH rec. Sin embargo, dentro del subgrupo de las bajas respondedoras (BR) ven que hay diferencias significativas en cuanto a los ovocitos obtenidos así como en las tasas de embarazo clínico, aumentando esta hasta un 30% en el grupo de las pacientes suplementadas con LHrec. Este subgrupo de BR supuso el estudio de 14 artículos que englobaban 1.179 pacientes mayores de 35 años. Podemos, de nuevo, afirmar que quizás la suplementación de LH rec en pacientes añosas, como es nuestro estudio, es beneficioso para dicho grupo poblacional, lo cual es ya una evidencia.

La mayor obtención de ovocitos en la punción folicular en pacientes añosas que son BR y en las que se esperaba obtener un número bajo de ovocitos puede tener un efecto significativo en el éxito reproductivo. Esto se argumenta en una revisión en la que la probabilidad de embarazo se ve reducida en mujeres con baja respuesta ovárica cuando se obtienen menos ovocitos (con 1 ovocito la tasa de embarazo va de 0 a 7% mientras

que con 4 ovocitos va de 11,5 a 18,6%) (Oudendijk et al., 2012).

Es importante resaltar un meta análisis publicado por Bosdou et al., en 2012. Su propósito es evaluar el papel de los andrógenos sobre las probabilidades que existen en conseguir un embarazo dentro del grupo de pacientes BR. Partiendo de 2.126 estudios, finalmente se analizaron 13 artículos publicados entre 2004 y 2011. Se estudiaron distintas vías por las que aumentar las concentraciones de andrógenos, siendo una de ellas, la suplementación con LH rec, la que a nosotros nos interesa. Vieron que aumentaba un 6%, no significativo, el porcentaje de embarazo clínico en aquellas pacientes que recibían LH rec de las que no. Se utilizaron tres dosis distintas de LH rec creando tres sub grupos: 75UI, de 75 a 150UI y 150 UI, entre ellos tres no se vieron diferencias. Lo que respalda nuestra teoría que con 75UI de LH rec es suficiente para llevar a cabo una completa estimulación ovárica en ciclos de fecundación *in-vitro* dentro de nuestro grupo de edad.

Tabla 32: Odds ratio (RNV)



En esta tabla podemos ver como sólo en un estudio, Ferraretti et al., en 2004 se ve un beneficio a la hora de la suplementación de la LH desde el punto de vista de obtener el RNV. Desde el punto de vista de tasas de embarazo no se ven diferencias significativas entre aquellos que han recibido la LH rec y de los que no, aunque como ya hemos mencionado sí que hay una ligera tendencia no significativa en términos de tasas de embarazo clínico en aquellas pacientes a la que se suplementó LH rec.

Es importante recalcar que dentro de los artículos analizados en estos cinco meta análisis no encontramos ningún estudio con las mismas características que el nuestro. No vemos que exista una comparación de 2:1 contra 4:1 durante los seis primeros días de estimulación y con un número de pacientes tan significativo, como es nuestro caso. De ahí la importancia y a necesidad de nuestro estudio.

El aumento en la producción endógena de andrógenos intraováricos (a través de la adición de la actividad de LH en las formas de la LH rec o hCG), la disminución de la conversión de andrógenos a estrógenos (por medio de la adición de inhibidores de la aromatasas), la administración de andrógenos exógenos (tales como la testosterona transdérmica), son las estrategias que tienen como objetivo aumentar las concentraciones ováricas de andrógenos. Por esto, los andrógenos ováricos promueven la sensibilidad a la LH de los folículos en crecimiento (Hillier y De Zwart, 1981; Vendola et al., 1998), con lo que podría aumentar el rendimiento de los ovocitos y la maduración de ellos después de la estimulación ovárica y, por tanto, mejorar las tasas de embarazo.

De acuerdo con los conceptos actuales de la foliculogénesis, la LH juega un papel esencial en las etapas finales de la maduración folicular (Hillier, 2001, Zeleznik, 2001). Una vez que una etapa del desarrollo folicular se ha completado con éxito en respuesta al tratamiento con FSH, las células de la granulosa se convierten en receptoras a la estimulación de la LH y ésta se vuelve capaz de ejercer sus acciones en las células de la teca y las células de la granulosa. De hecho, a concentraciones no saturantes de FSH y LH, la respuesta es aditiva. Además, está escrito que la maduración folicular reduce su dependencia en FSH por la adquisición de receptores de la LH (Hillier, 2001) (Zeleznik, 2001) Por lo tanto, la LH puede desempeñar un papel esencial en la determinación de la madurez de los ovocitos y el potencial de desarrollo en los ciclos de FIV. Sin embargo, la exposición del folículo en desarrollo a concentraciones inadecuadamente altas de LH puede interferir en la maduración folicular y ovocitaria, pudiendo afectar de manera adversa al proceso reproductivo (Hillier, 1994, Shoham, 2002.) En relación a esto, Oliveira también concluye en su meta análisis que se puede observar una reducción en la cantidad total de FSH rec en el grupo en el que se ha suplementado con LH rec evidencia que la FSH y la LH actúan sinérgicamente en las últimas fases del ciclo folicular. (Oliveira et al., 2007). Finalmente, afirma con que se necesitan más ensayos controlados y aleatorizados antes de dar

recomendaciones basadas en la suplementación exógena de LH rec en protocolos de estimulación con FSH rec y análogos de la GnRH. Es importante resaltar que en los 4 estudios en los que se basa este meta análisis de Oliveira (Marrs et al., 2004, Humaidan et al., 2004, Lisi et al., 2002 y Tarlatzis et al., 2006) en los cuatro la adición de la LH rec no se llevó a cabo desde el comienzo de la estimulación, lo cual se aleja de nuestro estudio donde el comienzo de la LH rec es desde el comienzo de la estimulación ovárica controlada.

Nuestro estudio se basó en paciente de edad avanzada, entre 35 y 39 años. Se ha descrito que en pacientes bajo este rango de edad la suplementación con LH rec aumenta las tasas de implantación y gestación (Hill et al., 2012), cierto es que en este estudio no se ve una mejora en los ovocitos directamente, en todos los estudios de este meta análisis no se vio mejora en el rendimiento de los ovocitos.

En el estudio de Marss et al., del 2004, lleva a cabo un análisis en pacientes mayores de 35 años, grupo poblacional como ya es sabido igual que el nuestro. En él, afirma que las pacientes que han sido suplementadas con LH rec presentaron una mayor tasa de implantación (21,7%) de las no suplementadas (15,7%). Es verdad que el número de pacientes de este estudio fue bajo (48 con FSH rec más LH rec contra 40 con FSH rec), pero sí que se puede ver una ligera mejoría en aquellas pacientes de edad más avanzada tratadas con LH rec.

Es realmente importante y posee una influencia vital en el desenlace del ciclo la reserva ovárica de cada paciente. Se define a mujeres baja respondedoras a aquellas mujeres añosas (Lawson et al., 2003), como son las de nuestro estudio, así como aquellas mujeres, que no tienen por qué ser añosas, con baja respuesta ovárica (El-Toukhy et al., 2002). Estos casos llegan a ser casi un 30% de los casos de pacientes bajo tratamiento de FIV (Mathews y Hamilton, 2009). Hasta la fecha para estudiar a una paciente baja respondedora se estudiará su edad, la FSH basal, la hormona antimuleriana y el recuento de folículos antrales (Sallam et al., 2005). Todos estos factores por si solos no son tan importantes como el papel que juegan todos juntos y no individualmente (Broekmans et al., 2006) En nuestro estudio nos hemos guiado en la FSH basal, ésta arroja unos resultados de $7,87 \pm 2,36$ en el grupo A y $8,45 \pm 2,15$ en el grupo B. Se ha relacionado

(Broekmans et al., 2006) que valores de FSH basales elevados pueden estar relacionados con bajo éxito en ciclos de reproducción asistida, otros estudios también introducen la LH basal como valor predictivo en el éxito de la FIV (Liu and Greenblatt, 2008) aunque no está demostrado todavía.

En el año 2009 Brodin et al., publican un artículo en el que estudiaron la relación entre distintas concentraciones basales de FSH y LH y su éxito en ciclos de FIV. Partiendo de la hipótesis de si los valores de la LH basal añadían información junto con los de la FSH basal, que ya está demostrado que es un valor predictivo a la hora de estudiar la reserva ovárica de las pacientes. Intentaron buscar una combinación óptima entre esas hormonas. La hipótesis principal del estudio fue intentar concluir si los niveles basales de LH añaden información sobre la reserva ovárica de la paciente a la ya dada por la FSH sola (Scott et al., 1995)

Afirman que a través de la combinación de los valores basales de la FSH y LH se obtiene mejor información que cada uno de gonadotropina por si solas. La tasa de embarazo en mujeres con FSH baja (6,7 U/l) y con altos niveles de LH (4.9 U /l) fue de un 39%, mientras que la tasa de embarazo era más baja (22%) en mujeres con FSH alta y niveles bajos de LH. Las tasas de embarazo fueron intermedios (27-28%) cuando los niveles de LH y FSH eran bajos o altos ambos dos. Es cierto que la combinación de la FSH y la LH están relacionadas con otras dos variables predictivas e independientes para el éxito de la FIV, como son la calidad embrionaria y la edad.

Concluían que LH basal modifica y mejora la información dada por la FSH basal sola. Bajo nivel de FSH y en combinación con LH alta, probablemente, refleje una buena reserva ovárica y esté asociado con las mayores tasas de éxito en FIV / ICSI.

Musters et al., en el 2012 intentaron buscar una relación entre el efecto de la LH rec y la calidad embrionaria en mujeres de baja respuesta ovárica. Como acabamos de comentar define mujeres con baja respuesta ovárica aquellas con edad materna avanzada (35 a 41 años), mujeres menores de 35 años con una FSH Basal menor de 12 UI/ml acompañado de un recuento de folículos antrales menor o igual de 5. En función del número de folículos antrales la dosis de LH rec varía. Para menores de 3 o menos folículos era una relación de 450 UI FSH rec + 225 UI LH rec y para 4 a 15 folículos era de 300 UI FSH rec +

150 UI LH rec y por último de 15 folículos a más 150 UI de FSHrec y 75 UI de LHrec. La dosis tras 7 días se podía ajustar, como en nuestro estudio, pero siempre manteniendo el ratio FSH rec / LH rec 2:1. Concluyen que no hay diferencias significativas en la calidad embrionaria pero sí que ven que la adición de LH aumenta de un 11% a un 17% el número de embriones de calidad óptima y la proporción de mujeres con al menos un embrión de máxima calidad aumenta de un 32% a un 41%.

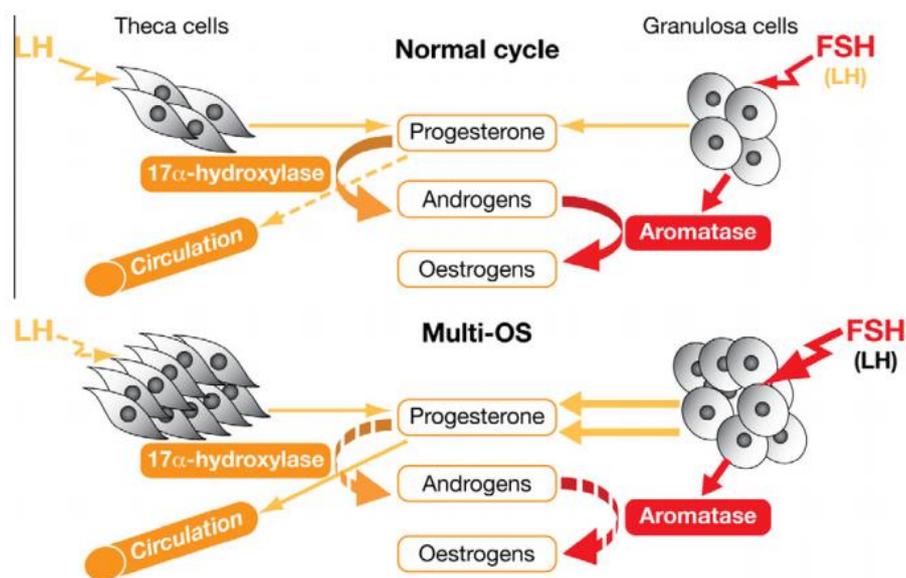
De nuevo, podemos concluir que la introducción de la LH rec favorece la maduración ovocitaria, la obtención de embriones de buena calidad y tasas de implantación mayores que en grupos con FSH rec solamente. (Tesarik y Mendoza, 2002). Por lo que la duda y la finalidad del estudio es ver qué dosis mínima de LH rec es necesaria para poder conseguir todos esos beneficios para la paciente. Nosotros hemos visto que con 75 UI/ml de LH rec dentro de nuestro grupo poblacional es suficiente al compararlo con 150 UI/ml de LH rec, obteniendo, básicamente, los mismos resultados. Es obvio mencionar que se trata de un resultado global y que dentro de grupo poblacional habrá casos que respondan mejor a unas cantidades de LH rec que otras.

Está demostrado que el desarrollo folicular es necesario para una correcta producción folicular de estradiol, éste tiene un papel primordial en la proliferación de las células de la granulosa, en el aumento de la actividad de la aromatasas, aumento de la expresión de receptores para la FSH e inducción en las células de la granulosa de receptores de LH (Macklon and Fauser, 1999). Al analizar las concentraciones de hormonas esteroideas en el líquido folicular se ha podido observar que en aquellos ciclos con antagonistas los niveles de estradiol son más bajos que en los agonistas (nuestro estudio) (García Velasco, 2001). La disminución en la síntesis de estradiol puede verse relacionada con niveles circulantes bajos de LH en la fase folicular por lo que puede conllevar un bajo número de ovocitos recuperados y una baja tasa de embarazo (Humaidan et al., 2002), nuestros resultados no arrojan diferencias a la hora de analizar los niveles de estradiol de los dos grupos, siendo en ambos grupos similar el número de ovocitos recuperados, tasa de implantación y de gestación.

De la mano de la ya mencionada teoría de las 2 células 2 gonadotropinas podemos reafirmarnos que la suplementación con LH rec provoca una maduración ovocitaria más

rápida. Una concentración elevada de LH al comenzar el tratamiento estimula la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa por acción de la FSH, a través de una mayor producción de andrógenos por parte de las células de la teca. Esta situación supone una expresión temprana de los receptores de progesterona, los cuales se sabe que están regulados por los niveles circulantes de estradiol (Bouchard et al., 1991), de modo que si las hormonas esteroideas son importantes en los procesos de maduración ovocitaria, el aumento en las concentraciones de estradiol y progesterona al inicio de la fase folicular acelera este proceso, por lo que los ovocitos maduran antes y en consecuencia, los embriones comienzan a dividirse antes (Muñoz et al., 2013). Cuando este fenómeno se da de una manera muy notable, esa asincronía puede reducir la implantación del embrión y en último término el porcentaje de embarazo.

Figura 17: Diferencias de la teoría de las 2 células – 2 gonadotropinas en ciclo normal y ciclo estimulado. Principles & practice of assisted reproductive technology (3 vols.)



Es posible que el aumento de los niveles de concentración de la progesterona en la fase folicular provocada por la estimulación ovárica, que conlleva el crecimiento del folículo puede contribuir a los cambios en el endometrio, que conducen a la asincronía del embrión con el endometrio. Este efecto puede ser más significativo cuando la estimulación ovárica se produce sin la suficiente LH. (Fleming and Jenkins, 2010).

Parece que tres factores tienen una importancia capital en la concentración de la progesterona durante la fase folicular de la estimulación ovárica, como son el número de

folículos, la actividad LH y la acción de la FSH. El número de folículos y la acción de la FSH parecen mediar en el aumento de las concentraciones de progesterona, pudiendo llegar, como ya hemos comentado a la asincronía del embrión con el endometrio, que puede reducir las posibilidades de implantación. Por el contrario, la actividad de LH a través de las células de la teca provoca la disminución de las concentraciones de progesterona en la circulación.

Se ha planteado la hipótesis de que el aumento en la concentración de andrógenos en el entorno del ovario en pacientes baja respondedoras podría conducir a un aumento en el número y maduración ovocitaria. Para conseguirlo se plantearon varias posibilidades: pretratamiento con testosterona (Balasch et al., 2006), adición de inhibidores de la aromatasasa (Mitwally and Casper, 2001) y la adición de LH rec (Ferrarretti et al., 2004)

Los niveles circulantes de LH son esenciales para la producción de hormonas esteroides que regulan el tiempo de la ovulación así como el mantenimiento del cuerpo lúteo y el embarazo. Se ha observado que los niveles elevados de LH sérica durante la fase folicular del ciclo menstrual no sólo son innecesarios para la maduración folicular, sino que son perjudiciales para los procesos reproductivos normales. Estas elevaciones pueden ocurrir como resultado de la administración de LH exógena o mediante un proceso patológico endógeno como en SOP.

Las elevaciones séricas de LH por encima de estos niveles de reposo pueden provocar un aumento en la producción de andrógenos que disminuye la función folicular y reduce la viabilidad del embrión. Los niveles elevados de LH durante el período preovulatorio también pueden influir negativamente en eventos posteriores a la ovulación, tales como la concepción y la implantación.

Aunque los receptores de LH aún no se han identificado en los ovocitos, la LH excesiva puede interrumpir la comunicación células de la granulosa en el cumulus-oophorus, que es crítica para mantener el ovocito en la fase de tardía de la meiosis hasta la ovulación. (Shoham et al., 1993)

Como puede verse a partir de los resultados presentados por todos los grupos analizados, la controversia sobre el papel de la LH en la estimulación ovárica no ha sido resuelta.

Resumiendo brevemente, uno de los primeros meta análisis que analiza los efectos beneficioso de la actividad de la LH rec en tasa de embarazo en mujeres normogonadotrópicas y bajo agonistas fue Van Wely en 2003 (Van Wely et al, 2003). En contraposición a éste, tres fueron los meta análisis que no vieron beneficios en la suplementación de LH rec a la hora de evaluar el embarazo (Baruffi et al., 2007), el RNV (Kolibianakis et al., 2007) o el embarazo clínico (Oliveira et al., 2007). Otros dos meta análisis, vuelven a concluir sobre los beneficios de la suplementación de la LHrec en mujeres mayores de 35 años (Hill et al., 2012) (Lehert et al., 2014), por último otro meta análisis, dentro del sub grupo de las baja respondedoras ve mejores tasas de embarazo en las pacientes suplementadas con LH rec (Mochtar et al., 2007). A pesar de que la FSH es universalmente reconocida como el principal motor de crecimiento del folículo ovárico y de su maduración, el papel de la LH en estos procesos es más controvertida. Se aprecia que aún hoy, no existe un tratamiento claramente ventajoso para las BR, y que aunque la mayoría de ellos obtienen algún beneficio en cuanto a los resultados de la estimulación ovárica con LH rec, no se obtienen claros incrementos en las tasas de gestación, que es el objetivo final de cualquier tratamiento de reproducción. En general, sí parece estar claro que entre las pacientes añosas, como es nuestro estudio, la acción de la LH rec es más eficiente que en pacientes jóvenes, que puede deberse a una mejor calidad ovocitaria debido a un medio folicular mejorado al final de la estimulación en este grupo poblacional (Bosch, 2011). Todos estas afirmaciones concluyen que la suplementación con LH rec en estimulación ovárica controlada debería estar basada en un uso racional y controlado bajo las necesidades de cada paciente. No obstante, se necesitan más estudios para identificar mejor a las personas o grupos poblacionales que se beneficiarían de la adición de LH.

La utilización de la LH en los protocolos de estimulación ovárica benefician a las pacientes en los siguientes aspectos:

- El grupo poblacional que más se puede beneficiar de los efectos de LH son las mayores de edad y las bajas respondedoras.
- No hemos visto evidencias que la acción de LH afecte negativamente a los resultados de pacientes baja estimulación ovárica controlada.

- Parece que la supresión hipofisaria en pacientes normogonadotropas es tan profunda con protocolos de agonistas de la GnRH que la inclusión de la LH en sus protocolos de trabajo puede beneficiarles.
- En la mayoría de los protocolos de estimulación ovárica actuales se asocia a la actividad de la FSH rec, la acción de la LH rec, tratando de buscar el ratio FSH rec/LH rec más beneficioso para cada paciente.

D. LIMITACIONES: BAJAS RESPONDEDORAS

Una de las limitaciones que pueden verse en nuestro estudio es la definición de pacientes BR. Ésta varía mucho en función del estudio analizado y que puede acarrear problemas a la hora de extrapolar esos datos en nuestro estudio. Hasta 2011 existía una falta de consenso a la hora de definir el grupo de pacientes BR. En 2011 Ferraretti et al llegan a un consenso a la hora de definirlo, lo llaman el criterio de Bolonia. Consiguiendo aunar, de esta manera, que los estudios a partir de esa fecha fuesen más homogéneos desde ese punto de vista.

De todos los estudios analizados en nuestro trabajo no existía una unanimidad a la hora de definir el grupo poblacional de BR. Muchos estudios definían ellos mismos cuándo consideraban que eran pacientes BR y el cumplimiento de un factor que llevase a esa conclusión (niveles de estradiol y FSH bajos, mayores de 35 años, bajas respuestas previas, bajo, sin a veces definir cuántos, número de recuento de folículos antrales...) les hacía afirmar que estaban en una población de BR. La recolección de datos por nuestra parte se produjo poco antes del estudio de Ferraretti, por lo que no nos podemos ceñir a sus conclusiones.

El estudio de Ferraretti et al, representó el primer intento realista para estandarizar la definición de BR de una manera sencilla y reproducible. Por lo general se caracteriza por una reducción de la respuesta folicular, lo que resulta en un número reducido de ovocitos recuperados. Se definió que, con el fin de definir la BR en los ciclos de reproducción asistida, al menos dos de las tres características siguientes deben estar presentes: la edad materna avanzada (≥ 40 años) o cualquier otro factor de riesgo para BR; una BR anterior; y una prueba de reserva ovárica anormal (ROA). Se fijó que dos episodios de BR después de una estimulación ovárica completa son suficientes para definir que una paciente es

baja respondedora. Por definición, el término BR refiere a la respuesta ovárica, y por lo tanto, un ciclo estimulado se considera esencial para el diagnóstico de BR. Sin embargo, los pacientes de edad avanzada con una ROA anormal pueden ser clasificados como respondedores pobres ya que tanto la edad avanzada y una ROA anormales pueden indicar la reducción de la reserva ovárica y actuar como un sustituto del resultado ciclo de estimulación ovárica. En este caso, los pacientes deben definirse como "pobre respuesta *esperada*". Los autores afirman que esta definición de BR se adapta de manera uniforme como los criterios mínimos necesarios para seleccionar a los pacientes para futuros ensayos clínicos, poblaciones más homogéneas serán estudiadas. Por último, mediante la reducción de sesgo causado por las definiciones de BR, se favorece la posibilidad de comparar resultados y extraer conclusiones fiables.

E. NUEVAS CONSIDERACIONES

Recientemente, y al hilo de este debate, Polyzos y Sunkara, acuñan un nuevo término al hablar de pacientes con peor pronóstico. Proponen que en aquellas pacientes que tras una estimulación ovárica convencional se obtengan de 4 a 9 ovocitos entrarían a formar parte del grupo de respondedoras sub-óptimas. Ven que las pacientes de este grupo poblacional muestran unos niveles de respuesta, que a pesar de tener unas tasas de embarazo aceptables, no son los ideales (Sunkara et al., 2011). Este último estudio muestra que el porcentaje de RNV en esta población es de alrededor de un 25% más baja comparado con mujeres de la misma edad pero en las que se obtuvieron de 10 a 15 ovocitos tras punción folicular. Nosotros creemos acercarnos más a esta última definición ya que además de estar estudiando un grupo poblacional de una edad comprendida entre los 35 y 40 años, el número de ovocitos que obtuvimos en ambos grupos fue muy cercano a nueve.

Polyzos y Sunkara creen poder afirmar que una respuesta ovárica normal es aquella de la que se obtienen de 10 a 15 ovocitos, ya que por encima de este número aumenta el riesgo de padecer el SHO y por debajo clasifican al grupo de respondedoras sub óptimas.

Creemos que existe una falta de consenso a la hora de definir a aquellas pacientes con una respuesta ovárica normal, entendiendo la dificultad que conlleva agrupar a un conjunto de pacientes significativo para llevar a cabo este tipo de estudios en el que todas

ellas puedan responder de una manera similar en respuesta a la suplementación con gonadotropinas exógenas. Es cierto que la individualización de los tratamientos en reproducción asistida puede disminuir los riesgos que conlleva esta técnica así como potenciar el éxito del tratamiento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Al comparar la pauta de estimulación ovárica 300 UI de FSH recombinante más 150 UI de LH recombinante frente a 300 UI de FSH recombinante y 75 UI de eLH recombinante, los indicadores de respuesta folicular, ovocitaria y embrionaria fueron semejantes, tanto en cuanto a número de ovocitos (parámetro principal del estudio), como de ovocitos maduros, de embriones fertilizados y de embriones de buena calidad.
2. Los resultados clínicos en cuanto a tasa de gestación, de implantación, de recién nacido vivo, de abortos y los embarazos gemelares fueron similares con ambas pautas de estimulación.
3. El perfil de seguridad de ambas combinaciones de fármacos fue similar, no existiendo complicaciones reseñables en ninguna de las pacientes.
4. El análisis coste beneficio fue más favorable para la combinación 300/75, suponiendo un ahorro de 4.236 euros por embarazo conseguido.
5. A la vista de todo lo expuesto se concluye que en la estimulación ovárica en pacientes de entre 35y 39 años, la adición a las 300 UI de FSH rec, de 75 UI de LH rec es suficiente para optimizar los resultados del ciclo *FIV*, mientras que la adición de 150 UI de FSH solo incrementa los costes, sin aumentar las tasas de embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aboulghar M, Evers JH, Al-Inany H. Intravenous albumin for preventing severe ovarian hyperstimulation syndrom. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; 2.

Acevedo Martin B, Gómez Palomares J.L, Hernández ER, Ricciarelli E. Complicaciones de la punción ovárica transvaginal en Reproducción Asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 2003. 20.

Acharya U, Irvine S, Hamilton M, Templeton A. Prospective study of short and ultrashort regimens of gonadotrophin-releasing hormone agonist in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1992; 58: 1169-73.

Agrawal R, Holmes J, Jacobs HS. Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2000; 73: 338-43.

Albano C, Smitz J, Camus M, Riethmüller-Winzen H, Van Steirteghem A, Devroey P. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 1998; 70: 357-359.

Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K, Devroey P. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *European Cetrorelix Study Group. Hum Reprod.* 2000; 15: 526-31.

Albano C, Smitz J, Camus M, Riethmüller-Winzen H, Siebert-Weigel M, Diedrich K, Van Steirteghem AC, Devroey P. Hormonal profile during the follicular phase in cycles stimulated with a combination of human menopausal gonadotrophin and gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix). *Hum Reprod.* 1996; 11: 2114-8.

Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Hum Reprod.* 2006; 21:3217-27.

Baird DT. A model for follicle selection and ovulation: lesson from superovulation. *J Steroid Biochem.* 1987; 27: 15-23.

Balaban B and Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12: 608-615.

Balash J, Bases endocrinológicas de las estrategias en la estimulación de la ovulación para técnicas de reproducción asistida en García Velasco JA, Callejo J. Estimulación ovárica en técnicas de reproducción asistida. Editorial Glosa S.L. 2010.

Balasch J, Fabregues F, Penarrubia J, Carmona F, Casamitjana R, Creus M, Manau D, Casals G, Vanrell JA. Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Hum Reprod.* 2006; 7:1884-1893.

Balasch J, Miró F, Buzarco I, Casamitjana R, Civico S, Ballezá JL, Puerto B, Vanrell JA. The role of luteinizing hormone in follicle development and oocyte fertility: evidence from in vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant follicle stimulating hormone. *Human reprod.* 1995; 10: 1678-1683.

Balasch J, Peñarrubia J, Fábregues F, Vidal E, Casamitjana R, Manau D, Carmona F, Creus M, Vanrell JA. Ovarian responses to recombinant FSH or HMG in normogonadotrophic women following pituitary desensitization by a depot GnRH agonist for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 35-42.

Balasch J, Creus M, Fábregues F, Civico S, Carmona F, Puerto B, Casamitjana R, Vanrell JA. The effect of exogenous luteinizing hormone (LH) on oocyte viability: evidence from a comparative study using recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH) alone or in combination with recombinant LH for ovarian stimulation in pituitary-suppressed women undergoing assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2001; 18: 250-6.

Balasch J. Ageing and infertility: an overview. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26: 855-60.

Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Martins AM, Cornicelli J, Cavagna M, Oliveira JB, Franco JG Jr. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 14-25.

Behre Hermann M, Howles Colin M, Longobard S, on behalf of the PERSIST Study Investigators. Randomized trial comparing luteinizing hormone supplementation timing strategies in older women undergoing ovarian stimulation. *Reproductive BioMedicine Online.* 2015; 31: 339-346.

Bellver J, Muñoz EA, Ballesteros A, Soares SR, Bosch E, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Intravenous albumin does not prevent moderate severe ovarian hyperstimulation syndrom in high risk IVF patients: a randomized controlled study. *Human Reprod.* 2003; 18:2283-8.

Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril.* 2000; 73: 31-37.

Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis. *Fertil Steril.* 2011; 95: 1031-6.

Bosdou JK, Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Zepiridis L, Tarlatzis BC. The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012; 18: 127-45.

Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist RS, Bierschwal CJ. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*. 1991; 35: 603-11.

Brodin T, Bergh T, Berglund L, Hadziosmanovic N, Holte J. High basal LH levels in combination with low basal FSH levels are associated with high success rates at assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2009; 24: 2755-9.

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:685-718.

Chaffkin L, Luciano A, Peluso J. Progesterone as an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75: 1404-10.

Chang, MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*. 1959; 184: 406.

Chappel SC. Heterogeneity of follicle stimulating hormone: control and physiological function. *Hum Reprod Update*. 1995; 1: 479-87.

Chappel SC, Howles C. Reevaluation of the roles of luteinizing-hormone and follicle-stimulating-hormone in the ovulatory process. *Hum Reprod*. 1991; 6: 1206-12.

Chikasawa K, Araki S, Tameda T. Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 62: 305-12.

Cobo A, Zulategui J, Escribá M.J., de los Santos M.J., Remohí J Congelación de embriones en pronúcleos o células. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Remohí J., Cobo A., Romero JLL., Pellicer A., y Simón C. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 2005. 239-58.

Cohen J, Gilling A, Expósito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conceptio in vitro. *Human Reprod*. 1997; 12: 1742-9.

Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 87-95.

Coughlan, Fitzgerald J., Milne P, Wingfield M. Is it safe to prescribe clomiphene citrate without ultrasound monitoring facilities? *J. Obstet Gynaecol*. 2010; 30: 393-6.

Couzinet B, Lestrat N, Brailly S, Forest M, Schaison G. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle-stimulating hormone in women with gonadotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Mar; 66: 552-6.

D'Angelo A, Amso N. "Coasting" (withholding gonadotrophins) for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; 3.

D'Angelo A, Amso N. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; 2.

Davis OK, Rosenwaks Z. Currents status of in vitro fertilization and new reproductive technologies. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1992; 4: 354-8.

Daya S. Gonadotrophin – releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in-vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 18.

Daya S, Gumbo J, Hughes EG, Collins JA, Sagle MA. A randomized, controlled trial comparing follicle stimulating hormone (FSH) to human menopausal gonadotropin (hMG) in fertilization in vitro. *Contracept Fertil Sex.* 1995; 23: 766-71.

Dekel N. La maduración del ovocito. *Reproducción humana.* McGraw Hill/Interamericana, Madrid, 1996; 24.

Dekel N. La maduración del ovocito en Remohi J, Simón C, Pellicer A y Bonilla-Musoles F. Eds. *Reproducción Humana McGraw-Hill/Interamericana de España* 1996:24.

Devroey P, Boostanfar R, Koper NP, Mannaerts BM, Ijzerman-Boon PC, Fauser BC; ENGAGE Investigators. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod.* 2009; 24: 3063-72.

El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P. Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve--an eight year study. *Hum Reprod.* 2002; 17: 1519-24.

Evans JP; Florman HM. The estate of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 57-63.

Falck B. Site of production of oestrogen in the ovary of the rat. *Nature.* 1959; 184: 1082.

Fanchin R, Hourvitz A, Olivennes F, Taieb J, Hazout A, Frydman R. Premature progesterone elevation spares blastulation but not pregnancy rates in in vitro fertilization with coculture. *Fertil Steril.* 1997; 68: 648–52.

Fauser BC, Laven JS, Tarlatzis BC, Moley KH, Critchley HO, Taylor RN, Berga SL, Mermelstein PG, Devroey P, Gianaroli L, D'Hooghe T, Vercellini P, Hummelshoj L, Rubin S, Goverde AJ, De Leo V, Petraglia F. Sex steroid hormones and reproductive disorders: impact on women's health. *Reprod Sci.* 2011; 18: 702-12.

Felberbaum RE, Ludwig M, Diedrich K. Clinical application of GnRH-antagonists. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 166: 9-14.

Felberbaum R, Diedrich K. Ovarian stimulation for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with gonadotrophins and gonadotrophin releasing hormone analogues: agonist and antagonist. *Hum Reprod.* 1999; 1: 207-221.

Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, D'Angelo A, Farfalli V, Montanaro N. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril*. 2004; 6: 1521–1526.

Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. *Hum Reprod*. 2011; 26: 1616-24.

Filicori M. Use of luteinizing hormone in the treatment of infertility: time for reassessment? *Fertil Steril*. 2003; 79: 253-5.

Filicori M, Cognigni GE, Samara A, Melappioni S, Perri T, Cantelli B, Parmegiani L, Pelusi G, DeAloysio D. The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Hum Reprod Update*. 2002; 8: 543-57.

Filicori M. The role of luteinising hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*. 1999; 71: 405-414.

Fleming R, Jenkins J. The source and implications of progesterone rise during the follicular phase of assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21: 446-9.

Forman R, Fryman R, Egan D, Ross C, Barlow DH. Severe ovarian hyperstimulation syndrome using agonists of gonadotropin releasing hormone for in vitro fertilization: a European series and a proposal for prevention. *Fertil Steril*. 1990; 53: 502-509.

Fritz MA, Speroff L. The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril*. 1982; 38: 509-29.

García Velasco JA, Pellicer A. News concepts in the understanding of the ovarian hyperstimulation síndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003; 15: 251-256.

García-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazábal A, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Hum Reprod*. 2001; 16: 2533-9.

Garrido N, Bellver J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Cumulative live-birth rates per total number of embryos needed to reach newborn in consecutive in vitro fertilization (IVF) cycles: a new approach to measuring the likelihood of IVF success. *Fertil Steril*. 2011; 96: 40-6.

Golan A, Ron-EL R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation síndrome: an update review. *Obstetric and Gynecology Surv*. 1989; 44: 430-40.

Goodman AL, Hodgen GD. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*. 1983; 39: 1-73.

Hall J E. Gonadotropin-releasing hormone antagonist: effects on the ovarian follicle and corpus luteum. *Clin Obstet Gynecol*. 1993; 36: 744-752.

Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk J. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects –a systematic review. *Human Reprod.* 2005; 20: 328-38.

Harris SJ, Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ. Improved separation of motile sperm in asthenozoospermia and its application to artificial insemination homologous. *Fertil Steril.* 1981; 36: 218-221.

Heape, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine Foster mother. *Proc R.Soc.* 1891 48, 457-458.

Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherney AH, Whitcomb BW. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012; 97:1108-14.

Hillier SG, De Zwart FA. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology.* 1981; 4: 1303-1305.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 100: 51-4.

Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 1994; 9: 188–91.

Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 179: 39-46.

Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril.* 1982; 38: 281-300.

Hompes PG, Broekmans FJ, Hoozemans DA, Schats R; FIRM group. Effectiveness of highly purified human menopausal gonadotropin vs. recombinant follicle-stimulating hormone in first-cycle in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 2008; 89: 1685-93.

Howles, C.M., Macnamee, M.C., Edwards, R.G., Goswamy, R., Steptoe, P.C. Effect of high tonic levels of luteinising hormone on outcome of in-vitro fertilisation. *Lancet.* 1986; 2, 521–522.

Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonist prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta – analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 1992; 57: 810-814.

Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Yding Andersen C. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod Biomed Online.* 2004; 8: 635-643.

Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Andersen CY. Ovarian response and pregnancy outcome related to mid-follicular LH levels in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and recombinant FSH stimulation. *Hum Reprod.* 2002; 17: 2016-21.

Humaidan P, Ejdrup Bredkjaer H, Westergaard LG, Yding Andersen C. 1,500 IU human chorionic gonadotropin administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase when gonadotropin-releasing hormone agonist is used for ovulation induction: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril.* 2010; 93:847-54.

Inge GB, Brinsden PR, Elder KT. Oocyte number per live birth in IVF: were Stetoe and Edwards less wasteful? *Hum Reprod.* 2005; 20: 588-92.

Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 4: 2-7.

Jansen CA, van Os HC, Out HJ, Coelingh Bennink HJ. A prospective randomized clinical trial comparing recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) and human menopausal gonadotrophins (Humegon) in non-down-regulated in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod.* 1998; 13: 2995-9.

Kasai T, Hoshi K, Yanagimachi R. Effect of sperm immobilisation and demembration on the oocyte activation rate in the mouse. *Zygote.* 1999; 7: 187-93.

Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001.

Kolibianakis EM, Kalogeropoulou L, Griesinger G, Papanikolaou EG, Papadimas J, Bontis J, Tarlatzis BC. Among patients treated with FSH and GnRH analogues for in vitro fertilization, is the addition of recombinant LH associated with the probability of live birth? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2007; 13: 445-52.

Kumar, P., Sait S.F. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2011; 4, 2–7.

Lawson R, El-Toukhy T, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J and Seed P. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod.* 2003; 18: 527-33.

Ledwer WL, Anumba D, Marlow N, Thomas CM, Wilson EC. Cost of Multiple Births Study Group (COMBS Group). Cost of multiple births study group (COMBS Group): The costs to the NHS of multiple births after IVF treatment in the UK. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2006; 113: 21-25.

Lee A, Christenson LK, Stouffer RL, Burry KA, Patton PE. Vascular endothelial growth factor levels in serum and follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1997; 68: 305.

Lehert P, Kolibianakis EM, Venetis CA, Schertz J, Saunders H, Arriagada P, Copt S, Tarlatzis B. Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 20: 12-17.

Lemus JF. Ectopic pregnancy: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2000; 12: 369-375.

Levi-Setti PE, Cavagna M, Baggiani A, Zannoni E, Colombo GV, Liprandi V. FSH and LH together in ovarian stimulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004; 1; 34-9.

Lin YH, Hwang JL, Seow KM, Huang LW, Hsieh BC, Tzeng CR. Comparison of outcome of clomiphene citrate/human menopausal gonadotropin/cetrorelix protocol and busserelin long protocol--a randomized study. *Gynecol Endocrinol*. 2006; 22: 297-302.

Lisi F, Rinaldi L, Fishel S. Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients. *Reproductive Bio Medicine Online*. 2002; 5:104-108.

Liu KE, Greenblatt EM. Elevated day 3 follicle-stimulating hormone/luteinizing hormone ratio ≥ 2 is associated with higher rates of cancellation in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 2008; 90: 297-301.

Loumaye and O'Dea, 2002. Ovarian stimulation: is exogenous LH necessary in all patients?. *Loumaye E. Gynecol Obstet Fertil*. 2002; 30: 890-5.

Loumaye E, Engrand P, Shoham Z, Hillier SG, Baird DT. Clinical evidence for an LH 'ceiling' effect induced by administration of recombinant human LH during the late follicular phase of stimulated cycles in World Health Organization type I and type II anovulation. *Hum Reprod*. 2003; 18: 314-22.

Macklon, N.S. and Fauser, Role of oestradiol in oocyte maturation and fertilization. In Filcori, M. *The role of Luteinizing Hormone in Folliculogenesis*. B.C.J.M. 1999: 53-68

Manipalviratn S, DeCherney A and Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009; 91: 305-315.

Marqueta J, Cabello Y, Roca P. *Gestación múltiple. Problemas actuales en medicina reproductiva y perinatología*. Editorial Médica; 2004.

Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, Werlin L, Kelly E. Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod Biomed Online*. 2004; 8: 175-182.

Martin PM; Welch HG. Probabilities for singleton and multiple pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998; 70: 478-481.

Martínez F, Trounson A. Analysis of factors associated with ectopic pregnancy in a human in vitro fertilization program. *Fertil Steril*. 1986; 45:78-88; 9:70-94.

Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Horcajadas JA. Is ovarian stimulation detrimental to the endometrium? *Reprod Biomed Online*. 2007; 15: 45-50.

Mathews TJ, Brady E, Hamilton BE. Delayed childbearing: more women are having their first child later in life. *NCHS Data Brief*. 2009; 21: 1-8.

Matorras R, Urquijo E, Mendoza R, Corcóstegui B, Expósito A, Rodríguez-Escudero FJ. Ultrasound-guided embryo transfer improves pregnancy rates and increases the frequency of easy transfers. *Hum Reprod*. 2002; 17: 1762-6.

Matorras R, Matorras F, Expósito A, Martínez L, Crisol L. Decline in human fertility rates with male age: a consequence of a decrease in male fecundity with aging? *Gynecol Obstet Invest*. 2011; 71: 229-35.

Matorras R, Matorras F, Mendoza R, Rodríguez M, Remohí J, Rodríguez-Escudero FJ, Simón C. The implantation of every embryo facilitates the chances of the remaining embryos to implant in an IVF programme: a mathematical model to predict pregnancy and multiple pregnancy rates. *Hum Reprod*. 2005; 20: 2923-31.

Mendoza R., Pérez S., de Los Santos Mj., Larreategui Z., Ayerdi F., Burgos J., Martínez Indart L, Pijoan JL, Matorras R. Congenital malformations, chromosomal abnormalities and perinatal results in IVF/ICSI newborns resulting from very poor quality embryos: a case-control study. *Gynecol Obstet Invest*. 2015; 79: 83-9.

Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition improves ovarian response to FSH: a potential option for low responders during ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2001; 4: 8-9.

Mochtar MH, Van der Veen, Ziech M, van Wely M. Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; (2).

Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Jun; 168: 167-72.

Musters AM, van Wely M, Mastenbroek S, Kaaijk EM, Repping S, van der Veen F, Mochtar MH. The effect of recombinant LH on embryo quality: a randomized controlled trial in women with poor ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2012; 27:244-50.

Nader S, Berkovitz A. Study of pharmacokinetics of human chorionic gonadotrophin and its relation to ovulation. *In vitro Fert Embryo Transf*. 1990; 7: 114-118.

Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Martins AM, Cornicelli J, Cavanha M, Pontes A, Baruffi RL, Franco JG Jr. Recombinant luteinizing hormone supplementation to recombinant follicle-stimulation hormone during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Feb-Mar; 24(2-3):67-75. Epub 2006 Dec 29.

Olivennes F, Álvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2mg. *Hum Reprod.* 1998; 13: 2411-2415.

Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, Taïeb J, Selva J, Frydman R. Scheduled administration of gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix) on day 8 of in-vitro fertilization cycles: a pilot study. *Hum Reprod.* 1995; 10: 1382-13987.

Orvieto R. Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome? *Hum Reprod.* 2005; 20: 320-2.

Oudendijk JF, Yarde F, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Broer SL. The poor responder in IVF: is the prognosis always poor? a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2012, 18: 1-11.

Padilla SL, Dugan K, Maruschak V, Shalika S, Smith RD. Use of flare up protocol with high dose of human follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil Steril.* 1996; 65:796-9.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18.

Patrizio P., Sakkas D. From oocyte to a baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2009; 91: 1061-6.

Pelinck MJ., Hoek A., Simons A.H.M., Heineman M.J. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Human Reprod Update.* 2002; 8: 129-139,

Pellicer A, Palumbo A, DeCherney AH, Naftolin F. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science.* 1988; 240: 1660-1.

Pezzuto A, Ferrari B, Coppola F, Nardelli GB. LH supplementation in down-regulated women undergoing assisted reproduction with baseline low serum LH levels. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26: 118-24.

PolyzosNP, Sunkara SK. Sub-optimal responders following controlled ovarian stimulation: an overlooked group? *Hum Reprod.* 2015; 30: 2005-8.

Richards JS, Jonassen JA, Kersey K. Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology.* 1980 Sep; 107: 641-8.

Rubio C., Mercader A., Alamá P., Lizán C., Rodrigo L., Labarta E., Melo M, Pellicer A., Remohí J. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod.* 2010; 25: 2290-7.

Ruvolo G, Bosco L, Pane A, Morici G, Cittadini E, Roccheri MC. Lower apoptosis rate in human cumulus cells after administration of recombinant luteinizing hormone to women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization procedures. *Fertil Steril.* 2007; 87: 542-6.

Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K and Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril.* 2001; 76: 1150-1156.

Sallam HN, Ezzeldin F, Agameya AF, Rahman AF, El-Garem Y. Defining poor responders in assisted reproduction. *Int J Fertil Womens Med.* 2005; 50: 115-20.

Schoot DC, Harlin J, Shoham Z, Mannaerts BM, Lahlou N, Bouchard P, Bennink HJ, Fauser BC. Recombinant human follicle-stimulating hormone and ovarian response in gonadotrophin-deficient women. *Hum Reprod.* 1994; 9: 1237-42.

Scott L, Alvero R, Leondires M and Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2394-2403.

Scott RT Jr, Hofmann GE. Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 1995; 63: 1-11.

Senat MV, Ancel PY, Bouvier- Cole MH, Bréart G. How does multiple pregnancy affect maternal mortality and morbidity? *Clin Obstet Gynecol.* 1998; 41: 78-83.

Shima K, Kitayama S, Nakano R. Gonadotropin binding sites in human ovarian follicles and corpora lutea during the menstrual cycle. *Obstet Gynecol.* 1987; 69: 800-6.

Shoham Z, Jacobs HS, Insler V. Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effects when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil Steril.* 1993; 59: 1153-61.

Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2002; 77: 1170-7.

Sills ES, Levy DP, Moomjy M, McGee M, Rosenwaks Z. A prospective, randomized comparison of ovulation induction using highly purified follicle-stimulating hormone alone and with recombinant human luteinizing hormone in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1999; 14: 2230-5.

Smits J, Camus M, Devroey P, Erard, A. Wisanto, A.C. Van Steirteghem. Incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome after GnRH agonist/hMG superovulation for in-vitro fertilization. *Human Reprod.* 1990; 5: 933-937.

Stanger, J.D., Yovich, J.L., Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1985; 92: 385-393.

Stephens, PC, and Edwards, RG. Birth after the preimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978; 12.

Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 228-32.

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. *Hum Reprod*. 2011; 26: 1768-1774.

Tarlatzis B, Tavmergen E, Szamatowicz M, Barash A, Amit A, Levitas E, Shoham Z. The use of recombinant human LH (lutropin alfa) in the late stimulation phase of assisted reproduction cycles: a double-blind, randomized, prospective study. *Hum Reprod*. 2006; 21: 90-4.

Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH agonist vs antagonist. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007; 21: 57-65.

Tesarik J, Mendoza C. Effects of exogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and developmental competence. *Hum Reprod*. 2002; 17: 3129-37.

The European Recombinant Human LH Study Group. Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 1507-14.

Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose finding study. The European Recombinant Human LH Study Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:1 507-14.

Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PM, van der Veen F: Effectiveness of human menopausal gonadotropin versus recombinant folliclestimulating hormone for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2003, 80: 1086-1093.

Veeck LL. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. Parthenon Publishing, 1998

Veeck LL. Oocyte quality and assisted conception. *Acta Eur Fertil* 1992; 23:275-278.

Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest* 1998; 12: 2622-2629.

Weil S., Vendola K., Zhou J., Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 2951-6.

Welt CK, Martin KA, Taylor AE, Lambert-Messerlian GM, Crowley WF Jr, Smith JA, Schoenfeld DA, Hall JE. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2645-52.

Westergaard LG, Erb K, Laursen S, Rasmussen PE, Rex S. The effect of human menopausal gonadotrophin and highly purified, urine-derived follicle stimulating hormone on the outcome of in-vitro fertilization in down-regulated normogonadotrophic women. *Hum Reprod.* 1996; 11: 1209-13.

Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1003-8.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Fourth Edition. 1999.

Yamoto M, Minami S, Nakano R, Kobayashi M. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 989-93.

Zeleznik AJ. Follicle selection in primates: "Many are called but few are chosen." *Biol Reprod* 2001; 65: 655–9.

Zeleznik AJ. Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8: 24-5.