

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

**“CALIDAD FOLICULAR: AGONISTAS
VERSUS ANTAGONISTAS DE LA GnRH EN
UNA POBLACIÓN DE BUEN
PRONÓSTICO”**

Maria Enriqueta López Moreno

GRANADA, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Enriqueta López Moreno
D.L.: GR.1619-2008
ISBN: 978-84-691-4870-9

D. LUÍS MARTÍNEZ NAVARRO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DE LAS NIEVES" DE GRANADA

CERTIFICO:

Que Dña. M^a ENRIQUETA LÓPEZ MORENO ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: "**CALIDAD FOLICULAR: AGONISTAS VERSUS ANTAGONISTAS DE LA GnRH EN UNA POBLACIÓN DE BUEN PRONÓSTICO**", que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para la obtención del grado de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada.

Granada, Marzo de 2.008

Fdo.: D. Luís Martínez Navarro

D. JOSE ANTONIO CASTILLA ALCALÁ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES” DE GRANADA

CERTIFICO:

Que Dña. M^a ENRIQUETA LÓPEZ MORENO ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“CALIDAD FOLICULAR: AGONISTAS VERSUS ANTAGONISTAS DE LA GnRH EN UNA POBLACIÓN DE BUEN PRONÓSTICO”**, que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para la obtención del grado de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada.

Granada, Marzo de 2.008

Fdo.: D. José Antonio Castilla Alcalá

D. ALBERTO SALAMANCA BALLESTEROS, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICO:

Que Dña. M^a ENRIQUETA LÓPEZ MORENO ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema: **“CALIDAD FOLICULAR: AGONISTAS VERSUS ANTAGONISTAS DE LA GnRH EN UNA POBLACIÓN DE BUEN PRONÓSTICO“**, que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para la obtención del grado de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada.

Granada, Marzo de 2.008

Fdo.: D. Alberto Salamanca Ballesteros

Esta tesis ha sido financiada por el siguiente proyecto: Estudio de la calidad folicular en estimulación de la ovulación con agonistas versus antagonistas de la GnRH en ciclos de fecundación in vitro. Agencia financiadora: SAS N° expediente: 159/04. Investigador principal: Luís Martínez Navarro.

Parte de sus resultados han sido enviados a los congresos de la Sociedad Española de Fertilidad y de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia en 2006 y 2007.

Parte de sus resultados han sido publicados en la Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción humana (Santalla A, López-Moreno ME, López-Criado MS, Fontes J, Gonzalvo MC, Perez M et al. Influencia del protocolo de estimulación en la concentración hormonal de líquidos foliculares. Rev Iber Fert 2008; 25: 13-9).

Escribir los agradecimientos de esta tesis doctoral significa haber concluido un intenso trabajo realizado en colaboración con muchos profesionales del Hospital Universitario Virgen de las Nieves que me han apoyado durante los años que he dedicado a la realización de este proyecto. Trabajar junto a ellos ha sido para mí un gran honor y vaya de antemano mi agradecimiento a todos.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Luis Martínez Navarro, coordinador de la Unidad de Reproducción, el haberme permitido realizar esta tesis doctoral. Para mí ha sido un honor que una persona como él me haya dirigido la tesis y es por eso que le dedico un especial agradecimiento, tanto por la confianza que depositó en mí al proponerme la realización de este proyecto, como por haberme brindado su amistad. Gracias “Luis” por tus consejos, tu constante apoyo y por haberme brindado todos tus conocimientos.

También quiero agradecer al Dr. José Antonio Castilla Alcalá, su interés, apoyo y consejos. Su colaboración ha sido básica para poder llevar a cabo el desarrollo de este proyecto.

Debo también un agradecimiento especial al Dr. Alberto Salamanca quien depositó su confianza en mí y accedió a ser director de esta tesis.

Agradezco a todos los médicos de plantilla y residentes del Servicio de Obstetricia y Ginecología, así como a todo el personal de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” que siempre estuvieron dispuestos a colaborar en este proyecto, y a todos los pacientes que aceptaron participar en el mismo.

Al Dr. Vicente Maldonado Ezequiel por ser amigo y maestro y por su inestimable ayuda al comienzo de este proyecto.

A la Dra. Isabel Pérez Herrezuelo, le doy las gracias por su amistad y por compartir diariamente las tareas hospitalarias, las horas de estudio y las inquietudes personales.

A todos aquellos que trabajaron en proyectos de investigación previos de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” y que han servido para el desarrollo de nuestra línea de investigación actual.

A mis padres, que siempre me enseñaron el bien y la perseverancia en el trabajo, les doy las gracias por sus esfuerzos y por la confianza que siempre han depositado en mí.

A mi hermano y a su esposa, Marga, que desde el primer momento me alentaron a seguir y me apoyaron.

A mi tía Maria Luisa por su apoyo incondicional.

Finalmente debo un especial agradecimiento a mi esposo Pedro, que junto a nuestra niña, Isabel, han sabido comprender la importancia que para mi ha representado poder llevar a cabo este proyecto. Espero que sepan disculparme por el tiempo que les he robado. Sin su comprensión, apoyo, tolerancia y amor no hubiese podido llegar a buen término esta tesis doctoral.

ÍNDICE

A. Situación de la fecundidad en España	4
A. 1 Causas de esterilidad	5
B. Técnicas de reproducción asistida	6
B. 1 Indicaciones para la FIV	7
B. 2 Factores pronósticos	8
a. Edad materna.....	9
b. Reserva ovárica	7
B. 3 Evaluación antes de la FIV	11
a. Reserva ovárica	11
b. Factor masculino.....	11
c. Detección selectiva de enfermedades infecciosas	12
d. Evaluación del útero.....	12
B. 4 Pautas de estimulación ovárica	13
a. Ciclo natural	13
b. Citrato de clomifeno	14
c. Tratamiento secuencial con citrato de clomifeno y gonadotropinas exógenas ..	15
d. Inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas.....	16
d. 1 Preparados de gonadotropinas.....	16
d. 2 Estimulación con gonadotropinas exógenas después de una regulación a la baja (Down-Regulation) con un agonista de la GnRH de acción prolongada: Protocolo largo.....	19
d. 3 Estimulación secuencia con un agonista de la GnRH y gonadotropinas exógenas: Protocolo corto.....	24
d. 4 “Coasting”.....	25
d. 5 Estimulación con gonadotropinas exógenas con adición de un antagonista de la GnRH.....	26
C. Recuperación de ovocitos	32

D. Maduración de ovocitos	34
E. Fecundación	34
E. 1 Fecundación in Vitro (FIV)	35
E. 2 Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)	36
a. Indicaciones para ICSI	38
b. Fallo de fecundación tras ICSI	39
c. Seguimiento de los embarazos y recién nacidos.....	39
F. Transferencia embrionaria.....	41
F. 1 Técnica de transferencia.....	41
F. 2 Directrices para la transferencia de embriones	43
G. Apoyo de la fase lútea	43
H. Resultados de la FIV-ICSI	46
H. 1 Embarazo múltiple	47
H. 2 Riesgos de la FIV- ICSI.....	49
I. Calidad folicular	51
I. 1 Parámetros ecográficos.....	51
I. 2 Parámetros en células de la granulosa	52
I. 3 Parámetros en líquido folicular (LF)	55

A. Tipo de estudio.....	73
A. 1 Criterios de inclusión.....	73
A. 2 Consentimiento informado.....	73
A. 3 Grupos de estudio.....	73
B. Protocolos de estimulación	74
B. 1 Protocolo con agonistas de la GnRH.....	74
B. 2 Protocolo con antagonistas de la Gn RH.....	74
C. Punción folicular	75
D. Recogida de semen y procesamiento de la muestra.....	76
E. Laboratorio de Fecundación “in vitro”: aislamiento de ovocitos y realización de técnicas de fecundación “in vitro” (FIV-ICSI)	76
F. Aislamiento de líquido folicular	78
G. Variables a estudiar	79
H. Calidad folicular	80
H. 1 Determinación de hormonas esteroideas.....	80
H. 2 Determinación de hormonas proteicas.....	80
I. Métodos estadísticos.....	80

I. 1	Análisis descriptivo.....	80
I. 2	Estudio de normalidad de las variables	81
I. 3	Comparación de la distribución de variables cualitativas	81
I. 4	Comparación de medias	81

RESULTADOS	83
-------------------	-----------

DISCUSIÓN	111
------------------	------------

A.	Aspectos clínicos.....	118
B.	Calidad embrionaria y tasas de gestación.....	119
C.	Calidad folicular.....	121
C. 1	Estradiol.....	121
C. 2	Progesterona.....	123
C. 3	Testosterona.....	124
C. 4	Hormonas hipofisarias.....	125

CONCLUSIONES	127
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	131
---------------------	------------

APÈNDICE	177
-----------------	------------

Apéndice I: Hoja de Infomación a la paciente.....	179
---	-----

ABREVIATURAS

- AFP	alfafetoproteína
- CBP	proteína transportadora de cortisol
- CEA	antígeno carcinoembrionario
- CG	células de la granulosa
- DFM	desarrollo folicular múltiple
- emb	embriones
- EOD	esterilidad de origen desconocido
- FIV	fecundación "in vitro"
- FSH	hormona folículo estimulante
- FSHr	hormona folículo estimulante recombinante
- FSHu	hormona folículo estimulante ultrapurificada
- GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
- hCG	gonadotrofina coriónica humana
- HDL	lipoproteínas de alta densidad
- hMG	gonadotrofina menopáusica humana
- 11β HSD	enzima 11- β -hidroxiesteroide dehidrogenasa
- ICSI	inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- IGF-I	factor de crecimiento insulínico tipo I
- IGF-II	factor de crecimiento insulínico tipo II
- IGFBP	proteínas transportadoras de los IGF
- IGF-rP	proteínas relacionadas con los IGF
- IL- 1	interleuquina tipo 1
- LF	líquido folicular
- LFC	líquido folicular claro
- LH	hormona luteinizante
- LHr	hormona luteinizante recombinante
- MII	ovocito metafase II (maduro)
- MESA	microsurgical epididymol sperm aspiration

- **OMS** Organización mundial de la Salud
- **PAPP-A** proteína placentaria A asociada a embarazo
- **PG** progesterona
- **PVP** polivinil-pirrolidona
- **RIA** radio inmunoanálisis competitivo
- **SEF** Sociedad Española de Fertilidad
- **SHGB** proteína transportadora de hormonas sexuales
- **SHO** síndrome de hiperestimulación ovárica
- **SOP** síndrome de ovarios poliquísticos
- **TE** transferencia embrionaria
- **TESE** testicular sperm extraction
- **TNF** factor de necrosis tumoral
- **TGF α** factor transformador del crecimiento tipo α
- **TGF β** factor transformador del crecimiento tipo β
- **TRA** técnicas de reproducción asistida
- **VEGF** factor de crecimiento endotelial vascular
- **VIH** virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

La esterilidad se define como la incapacidad para concebir tras un año de relaciones sexuales sin uso de anticoncepción. Afecta aproximadamente a un 10-15% de las parejas en edad fértil, por lo que es un componente importante de la práctica clínica de muchos médicos. Fecundabilidad es la probabilidad de lograr un embarazo en un ciclo menstrual (alrededor del 20-25% en las parejas normales); la fecundidad es la probabilidad de que un solo ciclo de lugar a un bebé vivo.

En las últimas dos décadas, en el campo de la esterilidad se han producido tres cambios notables. En primer lugar, la introducción de la fecundación *in vitro* y otras técnicas de reproducción asistida (TRA) que han aumentado las posibilidades de tratamiento efectivo y abierto la posibilidad de estudiar los procesos básicos de la reproducción. En segundo lugar, y en parte por la atención que los medios de comunicación le prestaron a las TRA, el público ha comenzado a conocer los posibles tratamientos y esto ha aumentado llamativamente las consultas por esterilidad. El tercer cambio es el aumento de la proporción de mujeres mayores de 35 años que solicitan atención médica por esterilidad. Una de cada cinco mujeres en Estados Unidos tiene su primer hijo después de los 35 años, un incremento marcado respecto de las cifras anteriores. Esto refleja la mayor edad con que se contrae matrimonio y la postergación del embarazo cuando las mujeres, por elección o por necesidad, ingresan en el mercado laboral. También ha aumentado ligeramente la proporción de parejas consideradas estériles. Por consiguiente, las parejas estériles tienen ahora más probabilidades de buscar consejo médico, evaluación y tratamiento.

A. SITUACIÓN DE LA FECUNDIDAD EN ESPAÑA

España ocupa el último lugar del mundo en cuanto a tasas de natalidad, que empezaron a bajar de forma continua hace más de 20 años. Mientras que en 1976 nacieron 667.458 bebés, en 1998 vinieron al mundo aproximadamente la mitad (365.193). Aunque desde ese año se observa un pequeño repunte, que llega a 416.518 nacimientos en el año 2002 (gracias, sobre todo, a nacimientos de madres inmigrantes que han contribuido con el 10,4% del total de natalicios) (INE 2003), España sigue siendo el país con tasas más bajas. En cuanto al número medio de hijos, en el año 2002 España alcanza su nivel más alto desde 1993, con 1,26 hijos. Si establecemos una comparación con otros países europeos, en el año 2000 se contaba 1,24 hijos por mujer en España, seguido de Italia (1,25) y Grecia (1,30); Francia e Irlanda son los países con mayor natalidad (1,89) (INE 2003).

Paulatinamente, la media de edad de las mujeres en el momento de la maternidad en España se está retrasando de forma ostensible; ésta llegó a 30,73 años en 2000, la más alta de Europa. Antes de 1996, las mujeres españolas entre 25 y 29 años eran las que aportaban las tasas más altas de fecundidad, y desde entonces hasta 2000 son las de 30-34 años las que ocupan ese lugar, incrementándose además el porcentaje de mujeres de 35-39 años que dan a luz (un 17% en 2000).

Actualmente se antepone la finalización de los estudios, el bienestar, la estabilidad de la pareja, la estabilidad económica, geográfica, etc., como requisitos para tener descendencia. Ahora parece excepcional que una persona haya planificado su porvenir antes de los 30 años de edad, y aunque sus padres y abuelos también tuvieron que resolver su futuro, las edades no eran las mismas.

Aunque los datos de prevalencia de infertilidad no son muy precisos, se estima que entre un 8 y un 15% de las parejas sufren problemas de infertilidad durante la edad reproductiva, según los distintos países y las características de los estudios realizados (Oliva y Arnau, 2001; Review of assisted reproductive technology, 1998). En España, por encima de la media, la prevalencia de esterilidad se estima ya en más del 19% de las parejas en edad fértil, y se calcula que existe cerca de 1 millón de parejas demandantes de los servicios de reproducción (Sociedad Española de Fertilidad, 2003), de las que aproximadamente un 40% realizarán un tratamiento de reproducción asistida (Casado et al., 2001; Oliva y Arnau, 2001). Estas cifras se incrementan año tras año, y se constata el hecho de que cada vez son más las mujeres que optan por retrasar la maternidad, hecho que hace más frecuentes los problemas de esterilidad (Minaretzis et al., 1998). Aproximadamente un 30% de las causas de esterilidad en las parejas corresponden a problemas en el eje hormonal hipotalamohipofisario femenino, y un 40% de los casos se debe a causas masculinas (Larizgoitia et al., 2000). El resto puede atribuirse a causas mixtas, incluida la infertilidad de origen desconocido. Este condicionante, entre otros, contribuye al aumento progresivo del porcentaje de parejas sin nuevos hijos, que desde 1990 a 1997 se incrementó en un 9,4% (D'Entremont, 2001).

A.1 Causas de esterilidad

Las causas más importantes de esterilidad son disfunción ovulatoria (15%), enfermedades tubáricas y peritoneales (30-40%) y factores masculinos (30-40%); las enfermedades uterinas suelen ser infrecuentes y el resto de las causas quedan sin explicación. En cierta medida, la prevalencia de cada causa varía con la edad.

La evaluación de la esterilidad se ha diseñado para aislar y analizar la integridad de cada uno de los componentes del proceso reproductor humano, en la medida de lo posible, y para identificar cualquier anomalía que pudiera alterar o impedir la concepción. El ritmo y grado de la evaluación se basan en los deseos de la pareja, la edad, la duración de la esterilidad y los rasgos exclusivos de la historia clínica o la exploración física.

Algunos problemas de esterilidad que antaño se consideraban insalvables pueden subsanarse hoy con tratamientos modernos.

Indefectiblemente, el ámbito y la secuencia de la evaluación moderna de la esterilidad han cambiado hasta llegar a un punto en el que se hace mucho menos hincapié en lograr un diagnóstico exacto y específico y se concede más importancia a la aplicación del tratamiento más eficaz y coste-efectivo.

B. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Entendemos como reproducción asistida en la especie humana el empleo de métodos de manipulación de uno o ambos gametos para la consecución de un embarazo, independientemente de la causa de esterilidad y del grado de manipulación.

Las técnicas de reproducción asistida abarcan todas las técnicas que implican la manipulación directa de los ovocitos y/o espermatozoides fuera del cuerpo. La primera forma de TRA, y todavía la más frecuente, es la fecundación *in vitro* (FIV), pero existen otras técnicas relacionadas dentro del campo de las TRA. El éxito de las TRA modernas ha revolucionado totalmente la evaluación y el tratamiento de la esterilidad. Algunos tratamientos tradicionales han quedado obsoletos, mientras que otros actualmente sólo tienen aplicaciones limitadas debido a que las TRA son simplemente más eficaces.

La FIV consiste en una secuencia de pasos muy coordinados que comienza con la hiperestimulación ovárica controlada con gonadotropinas exógenas, seguida de la recuperación de los ovocitos de los ovarios bajo ecografía transvaginal, fecundación en el laboratorio y transferencia transcervical del embrión al útero. El primer niño concebido por FIV nació en 1978 (Stephoe and Edwards, 1978). Desde entonces, las técnicas utilizadas se han perfeccionado y ampliado notablemente. Las TRA incluyen en la actualidad métodos para la fecundación asistida por inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI, por su nombre en inglés, intracitoplasmatic sperm injection) utilizando espermatozoides aislados del semen u obtenidos por

aspiración espermática epididimaria microquirúrgica (MESA, por su nombre en inglés, microsurgical epididymal sperm aspiration) o extracción espermática testicular (TESE, por su nombre en inglés, testicular sperm extraction), eclosión embrionaria asistida (assited embryo hatching) y diagnóstico genético preimplantacional.

B.1 Indicaciones para la FIV

La FIV se desarrolló inicialmente como medio para superar la esterilidad debida a enfermedad tubárica irreparable, pero actualmente se aplica de forma mucho más amplia para el tratamiento de casi todas las causas de esterilidad. La FIV esta indicada principalmente cuando el método ofrece la forma de superar uno o más obstáculos específicos que no puedan tratarse de otras formas.

1. Esterilidad por factor tubárico

Obstrucción tubárica distal

Obstrucción tubárica proximal

Obstrucción tubárica bipolar

Esterilización tubárica previa

2. Endometriosis

3. Esterilidad por factor masculino

4. Esterilidad idiopática

5. Otras indicaciones para la FIV

Las mujeres a las que se ha diagnosticado recientemente un cáncer u otro trastorno médico y que requieren un tratamiento inminente (quimioterapia, radioterapia) que supone un peligro grave para su futura fertilidad podrían ser candidatas a la FIV con criopreservación de embriones antes de que comience el tratamiento si los plazos de tiempo y la salud lo permiten.

Las mujeres anovuladoras que ovulan en respuesta al tratamiento pero que no conciben también pueden ser candidatas en último término para FIV.

Las mujeres que tienen un trastorno o riesgo genético que podría expresarse en su descendencia pueden ser candidatas para FIV con diagnóstico genético preimplantacional para identificar y descartar los embriones afectados.

B.2 Factores pronósticos

La probabilidad de éxito de la FIV depende de varios factores, muchos de los cuales por desgracia no se conocen hasta que el ciclo de tratamiento está en curso (respuesta a la estimulación) o incluso cerca de su finalización (número y calidad de los embriones). Antes de que comience un ciclo de FIV, los indicadores pronósticos principales de éxito son la edad de la madre, la “reserva ovárica” y la capacidad reproductiva previa. Para todos los diagnósticos salvo la reserva ovárica baja, las tasas de éxito de la FIV varían relativamente poco con la causa de la esterilidad (Centres for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, 2001).

a. Edad materna

Datos de estudios longitudinales en la comunidad hutterita y en otras poblaciones naturales (que no utilizan métodos anticonceptivos) indican que la fertilidad en las mujeres tiene un máximo entre los 20 y los 24 años y posteriormente disminuye de manera uniforme, un 4%-8% entre los 25 y los 29 años, un 15%-19% entre los 30 y los 34 años, un 26%-46% entre los 35 y los 39 años y hasta un 95% después de los 40 años. A medida que aumenta la edad materna y disminuye la fertilidad, la incidencia de abortos espontáneos también se eleva (Maroulis, 1991; Stein, 1985; Hassold and Chiu, 1985; Warburton et al, 1986). Los datos de muchas líneas de investigación indican claramente que la causa primaria de estos cambios en la capacidad reproductiva asociados a la edad es un aumento de la prevalencia de aneuploidía en los ovocitos envejecidos debido a un trastorno de los

mecanismos reguladores que controlan la formación y la función del huso meiótico (Pellestor et al., 2003; Nasmyth, 2001; Battaglia et al., 1996). Las tasas de éxito conseguidas con las TRA, al igual que las tasas de fertilidad natural, disminuyen a medida que aumenta la edad materna.

Las tasas de embarazo han aumentando continuamente en los últimos 15 años en las mujeres de todos los grupos de edad, pero los datos de los resúmenes nacionales anuales de las tasas de éxito de las TRA en EEUU desde 1989 han mostrado claramente que la edad es el indicador pronóstico aislado más importante.

b. Reserva ovárica

El número total de ovocitos en cualquier mujer está determinado genéticamente y disminuye de modo inexorable a lo largo de la vida, de aproximadamente 1-2 millones en el momento del parto a unos 300.000 en la pubertad, 25.000 a los 37-38 años (cuando se acelera el ritmo de agotamiento folicular) y menos de 1.000 en la menopausia (Gougeon et al., 1994; Faddy et al., 1992). Las pruebas de reserva ovárica ayudan a predecir la respuesta a la estimulación con gonadotropinas exógenas y la probabilidad de éxito de la FIV y están ampliamente aceptadas como elemento esencial de la evaluación de las candidatas para FIV. En la práctica clínica, las pruebas más frecuentes son la concentración sérica de FSH el día 3 del ciclo y la prueba de estimulación con citrato de clomifeno. Las pruebas de reserva ovárica suelen ser fiables, pero no son infalibles. Excepto cuando son claramente anormales, los resultados de las pruebas deben utilizarse para orientar el tratamiento más que para rechazarlo.

FSH sérica el día 3 del ciclo

Numerosos estudios han documentado la relación entre las concentraciones de FSH el día 3 del ciclo y los resultados de la FIV. A medida que aumentan las concentraciones de FSH, disminuyen de manera uniforme las concentraciones máximas de estradiol alcanzadas durante la estimulación,

el número de ovocitos recuperados y la probabilidad de embarazo y parto con hijo vivo (Muasher et al., 1988; Scott et al., 1989; Toner et al., 1991; Pearlstone et al., 1992; Scott and Hofmann, 1995; Bukman and Heineman, 2001; Barroso et al., 2001). Con los sistemas de análisis más utilizados, generalmente se consideran anormales unas concentraciones de FSH el día 3 del ciclo por encima de 10-15 UI/l.

Estradiol sérico el día 3 del ciclo

Las concentraciones de estradiol al comienzo de la fase folicular proporcionan información adicional útil. Las concentraciones superiores a 75-80 pg/ml reflejan el desarrollo folicular avanzado típico de las mujeres con una reserva folicular baja y, al igual que la elevación de las concentraciones de FSH el día 3 del ciclo, pronostican pocas probabilidades de éxito (Smotrich et al., 1995; Licciardi et al., 1995; Buyalos et al., 1997). Dado que las elevaciones precoces de las concentraciones séricas de estradiol pueden suprimir las concentraciones de FSH que de otra forma revelarían una reserva ovárica baja, la medición de las concentraciones de FSH y estradiol el día 3 del ciclo tiene mayor valor informativo.

Prueba de estimulación con citrato de clomifeno

La prueba de estimulación con citrato de clomifeno es una prueba de provocación, algo más sensible, de la reserva ovárica. La prueba incluye determinaciones de las concentraciones séricas de FSH y estradiol el día 3 del ciclo, y añade una determinación de la concentración sérica de FSH el día 10 del ciclo después del tratamiento con citrato de clomifeno (100 mg/día, días 5-9 del ciclo) (Navot et al., 1987). Se considera anormal >25 (la suma de la FSH el día 3 del ciclo más la FSH el día 10 del ciclo), aunque las concentraciones basales del día 3 sean normales (Hofmann et al., 1998; Yong et al., 2003).

Un valor elevado de FSH el día 3 del ciclo o un resultado anormal en la prueba de estimulación con clomifeno implican un pronóstico precario de éxito de la FIV, con independencia de la edad (Scout et al., 1989;

Toner et al., 1991; Bukman and Heinemann, 1995; El-Toukhy et al., 2002; Csemiczky et al., 2002; Yanushpolsky et al., 2003).

Estas y otras observaciones indican que la edad y los resultados de la prueba de reserva ovárica son factores pronósticos independientes del resultado de la FIV (Akande et al., 2002). El pronóstico para las mujeres con un resultado anormal en la prueba de reserva ovárica suele ser desfavorable, aunque sean jóvenes. Para las mujeres con resultados normales en la prueba, el pronóstico depende de la edad; un resultado normal no mejora el pronóstico adverso específico de la edad en las mujeres mayores.

B.3 Evaluación antes de la FIV

Las parejas que tienen una o más indicaciones comentadas anteriormente y que son candidatas para FIV requieren una evaluación adicional antes de comenzar el ciclo de tratamiento.

a. Reserva ovárica

Como la respuesta ovárica está inversamente relacionada con la concentración sérica de FSH el día 3 del ciclo, los resultados también pueden ayudar a orientar la elección del régimen de tratamiento y las dosis de gonadotropinas utilizadas para la estimulación.

b. Factor masculino

Incluso cuando una evaluación diagnóstica previa ha revelado parámetros seminales completamente normales, debe repetirse un análisis del semen no mucho antes del comienzo programado del ciclo para confirmar que la calidad del semen no ha variado de manera considerable entre tanto o que no ha sufrido una agresión transitoria por enfermedades febriles u otras causas. Aunque algunos autores recomiendan realizar un cultivo sistemático del semen antes de la FIV como protección frente al riesgo de contaminación imprevista,

la mayoría limita dicha evaluación a los varones que presentan leucocitospermia. La evaluación de la morfología de los espermatozoides, valorada por criterios estrictos (norma III de la OMS), también ayuda a determinar si la fecundación asistida con ICSI puede ser recomendable (Kruger et al., 1988; Menkveld and Kruger, 1995).

c. Detección selectiva de enfermedades infecciosas

Mientras que algunos autores recomiendan realizar pruebas sistemáticas para las infecciones no diagnosticadas por clamydias, que pueden reducir la probabilidad de éxito de la FIV o aumentar el riesgo de aborto espontáneo en los ciclos de concepción (Rowland et al., 1985; Lunenfeld et al., 1989; Licciardi et al, 1992), otros autores limitan dicha evaluación a las mujeres con esterilidad por factor tubárico o que presentan otros factores de riesgo o recomiendan un tratamiento preliminar sistemático de los dos miembros de la pareja con un ciclo de doxiciclina oral.

Se recomienda realizar la detección sistemática de infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y el virus de la hepatitis C (anticuerpo frente al virus de la hepatitis C) en los dos miembros de la pareja como medida de protección para el resto del personal sanitario y para los fetos que pueden obtenerse por la FIV y frente al riesgo de contaminación cruzada de los embriones criopreservados almacenados.

d. Evaluación del útero

Como los miomas submucosos y los pólipos endometriales pueden interferir en la implantación o producir un efecto adverso en el resultado del embarazo, debe evaluarse meticulosamente la cavidad uterina antes de comenzar un ciclo de FIV. Una histerosalpingografía realizada en un momento más temprano durante la evaluación diagnóstica puede ser suficiente si es completamente normal y relativamente reciente. Si la exploración de la cavidad

uterina se ha realizado hace más de 6 meses o no se ha efectuado, o si existe algún motivo para sospechar una anomalía de la cavidad uterina, está indicada una ecohisterografía o una histeroscopia en consulta. Aunque algunos autores han recomendado practicar una histeroscopia preliminar sistemática antes de la FIV (Goldenberg et al., 1991; Dicker et al., 1992; Asma et al., 1992; Golan et al., 1992), la ecohisterografía es más fácil de realizar y su sensibilidad y especificidad son similares a las de la histeroscopia para la detección de anomalías dentro de la cavidad uterina (Becker et al., 2002; Leone et al., 2003; Sylvestre et al., 2003).

B.4 Pautas de estimulación ovárica

La pauta de estimulación ovárica ideal para la FIV debe tener una tasa de cancelación baja, reducir los costes farmacológicos, los riesgos y los efectos secundarios, precisar un seguimiento limitado por comodidad práctica y optimizar las tasas de embarazo simple, pero todavía no se ha definido un régimen de este tipo. Se han descrito numerosas pautas que varían desde la ausencia de estimulación (ciclos naturales), pasando por una estimulación mínima (citrato de clomifeno) o leve (tratamiento secuencial con citrato de clomifeno y gonadotropinas exógenas en dosis bajas), hasta la estimulación intensiva (gonadotropinas exógenas en dosis altas, solas o en combinación con un agonista o antagonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)). Cada uno tiene sus ventajas, desventajas y aplicaciones. El régimen de estimulación seleccionada para una mujer debe estar basado en la edad, la respuesta a estimulaciones previas y la reserva ovárica.

a. Ciclo natural

El primer parto resultante de FIV derivó de un ovocito recogido en un ciclo menstrual natural sin estimulación (Steptoe and Edwards, 1978). Naturalmente, la FIV con ciclo natural sigue siendo posible, pero las tasas de éxito por inicio de ciclo son muy bajas en comparación con las conseguidas en ciclos de estimulación ovárica (Paulson et al., 1992; Claman et al., 1993; Fahy et al., 1995; Ng et al., 2001). Aunque la recuperación de ovocitos y la fecundación

tengan éxito, los ciclos naturales generalmente producen sólo un ovocito maduro y un único embrión. No existe oportunidad de seleccionar o criopreservar embriones y las tasas globales de éxito reflejan la eficiencia relativamente baja de implantación de un embrión dado. La FIV con ciclo natural sigue siendo una opción para las mujeres que responden insuficientemente a la estimulación ovárica (produciendo sólo 1-2 folículos) y para aquéllas que padecen enfermedades en las que es preferible evitar los riesgos asociados a la estimulación. La gonadotropina coriónica humana (hCG) exógena se administra cuando el folículo dominante alcanza un tamaño compatible con una madurez plena, eliminando así la necesidad de controlar frecuentemente las concentraciones séricas endógenas de LH (para detectar el pico de LH) y definiendo mejor el momento óptimo para la recuperación de ovocitos. El tratamiento adyuvante con un antagonista de la GnRH puede ayudar a prevenir un pico prematuro de LH y mejorar los resultados conseguidos con la FIV con ciclo natural (Leroy et al., 1994; Rongieres-Bertrand et al., 1999).

b. Citrato de clomifeno

Puede utilizarse la estimulación mínima con citrato de clomifeno para aumentar el número de folículos en desarrollo. Generalmente, citrato de clomifeno (100 mg diarios) se ha administrado durante 5-8 días comenzando el día 3 del ciclo. El fármaco induce el desarrollo de dos o más folículos en la mayoría de las mujeres que presentan una ovulación normal (Dickey et al., 1998; Messinis et al., 1998; Ingerslev et al., 2001), aunque el número de óvulos generados (1-3) sólo es ligeramente superior al obtenido en ciclos sin estimulación y sensiblemente inferior al obtenido en ciclos con estimulación con gonadotropinas exógenas (Ingerslev et al., 2001; Braningan and Estes, 2000; MacDougall et al., 1994). Las tasas de terminación del ciclo son algo menores que en los ciclos naturales, y el número de ovocitos recuperados, el número de embriones transferidos y las tasas de embarazo son mayores. Al igual que en los ciclos naturales, la hCG exógena se administra cuando el folículo dominante alcanza un tamaño compatible con una madurez plena, y puede utilizarse un antagonista de la GnRH para prevenir un pico prematuro de LH

endógena. Los resultados de un ensayo clínico aleatorizado que comparó los resultados del ciclo en ciclos de FIV naturales y estimulados con clomifeno indican que el tratamiento con clomifeno no tiene efectos adversos demostrables sobre el crecimiento y el desarrollo del endometrio (Ingerslev et al., 2001).

c. Tratamiento secuencial con citrato de clomifeno y gonadotropinas exógenas

El tratamiento secuencial con clomifeno (100 mg diarios durante 5 días) y gonadotropinas exógenas en dosis bajas es más eficaz para estimular el desarrollo multifolicular que el tratamiento con clomifeno solo (Diamond et al., 1986; Corfman et al., 1993; Dor et al., 1992). Los costes farmacológicos y los requisitos de control son moderadamente mayores, pero sensiblemente inferiores a los asociados al tratamiento de estimulación convencional de “protocolo largo” que incluye un tratamiento con gonadotropinas en dosis más altas después de la regulación por disminución preliminar con un agonista de la GnRH de acción prolongada (Weigert et al., 2002; Williams et al., 2002). Aunque se recuperan menos ovocitos y se dispone de menos embriones para transferencia o criopreservación, las tasas de embarazo alcanzadas en ciclos de transferencia de embriones “frescos” no son considerablemente inferiores y los riesgos de síndrome de hiperestimulación ovárica son menores. El principal inconveniente del tratamiento de estimulación secuencial con clomifeno/gonadotropinas es que la capacidad reproductiva global es menor (embarazos totales resultantes de embriones frescos y embriones congelados-descongelados derivados de un único ciclo de estimulación) (Toner et al., 1991). La adición de un antagonista de la GnRH al tratamiento anula de manera eficaz el pequeño riesgo de un pico prematuro de LH, pero también aumenta los costes (Williams et al., 2002; Engel et al., 2002).

d. Inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas

Las gonadotropinas exógenas se han utilizado durante más de 40 años para inducir la ovulación en las mujeres con carencia de gonadotropinas y en las que no responden a otras formas menos complicadas de tratamiento. Estos fármacos potentes son sumamente eficaces, pero también muy caros y tienen riesgos considerables, tales como el embarazo múltiple y síndrome de hiperestimulación ovárica. Por consiguiente, las gonadotropinas exógenas deben ser utilizadas únicamente por médicos con la formación y la experiencia necesarias para proporcionar un tratamiento seguro y eficaz.

d.1 Preparados de gonadotropinas

Los preparados de gonadotropinas exógenas empleados para la inducción de la ovulación son de tres variedades diferentes: formulaciones urinarias, urinarias purificadas y recombinantes. Durante casi 30 años, las únicas gonadotropinas exógenas disponibles eran las gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG, menotropinas), un extracto preparado a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas que contiene cantidades equivalentes (75 UI) de FSH y LH por ampolla o vial y que requiere inyección intramuscular. Las menotropinas urinarias también contienen cantidades pequeñas pero cuantificables y variables de hCG, en su mayor parte añadidas intencionadamente durante el proceso de fabricación para proporcionar el grado adecuado de actividad LH y algunas derivadas de otras fuentes (Stokman et al., 1993). Los extractos de gonadotropinas relativamente sin elaborar como las hMG tradicionales también contenían cantidades importantes de proteínas urinarias no caracterizadas (Van de Weijer et al., 2003) que podían ser antigénicas. Los preparados actuales de hMG están mucho más purificados que antiguamente y se pueden administrar por vía subcutánea (Gocial et al., 2000).

Hace aproximadamente 20 años se empezaron a desarrollar preparados urinarios más purificados de FSH eliminando la LH de los extractos urinarios con el uso de columnas de inmovilización que contenían anticuerpos anti-

hCG. Los preparados iniciales de FSH urinaria purificada (75 UI) contenían menos de 1 UI de LH pero una cantidad considerable de otras proteínas urinarias y tenían que seguir administrándose por vía intramuscular. Los productos mucho más purificados que se emplean en la actualidad contienen menos de 0,001 UI de LH y cantidades mucho menores de proteínas urinarias, y se pueden administrar por vía subcutánea. Hace poco más de 15 años que se consiguió la producción *in vitro* de FSH humana recombinante mediante genotecnología. Los preparados de FSH recombinantes contienen isoformas de FSH menos ácidas que tienen una semivida más corta que las procedentes de orina humana, pero estimulan la secreción de estrógenos con una eficiencia equivalente o incluso mayor (Filicori et al., 2003). Las ventajas de los preparados de FSH recombinantes son la ausencia de proteínas urinarias, el suministro más constante y la menor variación de la actividad biológica entre un lote y otro.

Tradicionalmente y todavía hoy día, en virtud de su semejanza estructural y biológica con la LH, la hCG se utiliza para simular el pico de LH a fin de inducir la ovulación en ciclos estimulados con gonadotropinas exógenas una vez que el desarrollo folicular alcanza la madurez. Aunque la hCG extraída de la orina de embarazos humanos se siguen empleando de forma generalizada, también se dispone de una forma recombinante de hCG, obtenida mediante técnicas semejantes a las descritas anteriormente para la FSH recombinante (Ludwing et al., 2003). El producto se comercializó en EEUU en 2001 y desde entonces ha adquirido popularidad con rapidez. Aunque se sigue discutiendo la equivalencia de la potencia y la dosis de la hCG recombinante y de la hCG urinaria, por el momento los estudios indican que 250 µg del producto recombinante obtienen resultados semejantes a los conseguidos con 5.000-10.000 UI de hCG urinaria (Ludwing et al., 2003; Butler, 2003; McDonough, 2003; Chang et al., 2001; Internacional Recombinant Human Chorionic Gonadotropin Study Group, 2001).

Se ha desarrollado una forma recombinante de LH humana con unas actividades fisicoquímica, inmunológica y biológica semejantes a las de la LH hipofisaria humana (Porchet et al., 1995; le Cottonnec et al., 1998; le Cottonnec et al., 1998; le Cottonnec et al., 1998), que fue aprobada en Europa en el año 2000. Tras la revisión de la literatura actual, se pueden sacar las siguientes conclusiones en lo que respecta a la utilización de la LH en los protocolos de estimulación para FIV-ICSI:

1. No existe evidencia clínica basada en pruebas de que el contenido de LH de las preparaciones disponibles para la estimulación ovárica afecte negativamente el resultado de los tratamientos de FIV-ICSI.
2. Las pacientes que más se pueden beneficiar de la utilización de LH son las de grupos de edad mayor y las de bajas respuestas anteriores.
3. Es posible que un número importante de mujeres normagonadotropas sean suprimidas tan profundamente en protocolos con agonistas de la GnRH, que podrían beneficiarse de la adición de LH en su protocolo de estimulación.
4. En las estrategias de estimulación ovárica más actuales, es necesario asociar a la FSH urinaria pura o recombinante, acción LH en cantidades diversas y con el ratio FSH/LH adecuado para cada paciente de manera individual.

La experiencia clínica con la LH recombinante continúa siendo bastante limitada, pero parece probable que aumente en un futuro próximo.

La disponibilidad de FSH, LH y hCG recombinantes ha contribuido significativamente a aumentar nuestros conocimientos sobre las acciones específicas de las gonadotropinas en el desarrollo folicular y la maduración del ovocito (Fauser, 1997; Filicori, 1999; Levy et al., 2000). Las gonadotropinas recombinantes confieren la capacidad de adaptar los regímenes de estimulación ovárica a las necesidades de cada mujer con el fin de optimizar la calidad de los ovocitos y la fecundidad de los ciclos. Por desgracia, todavía no

contamos con la capacidad de definir con exactitud cuáles son estas necesidades específicas.

d.2 Estimulación con gonadotropinas exógenas después de una regulación a la baja (Down-Regulation) con un agonista de la GnRH de acción prolongada: Protocolo largo

La introducción de los agonistas de la GnRH de acción prolongada a finales del decenio de 1980 revolucionó la estrategia de la estimulación ovárica en las TRA al permitir la regulación a la baja de la secreción de gonadotropinas hipofisarias endógenas y, así, evitar un pico prematuro de LH durante la estimulación con gonadotropinas exógenas. El tratamiento adyuvante con un agonista de la GnRH eliminó la necesidad de mediciones frecuentes de la LH sérica y aplacó los temores de una luteinización prematura, que anteriormente había requerido la cancelación de aproximadamente el 20% de los ciclos de FIV antes de la recuperación de ovocitos (Meldrum, 1989; Edwards et al., 1996; Janssens et al., 2000). Como menos del 2% de los ciclos se complican por un pico prematuro de LH después de la regulación a la baja con un agonista de la GnRH, la estimulación puede continuar hasta que los folículos sean mayores y más maduros. Ensayos clínicos posteriores demostraron que el número de ovocitos producidos y las tasas de embarazo fueron significativamente mayores en comparación con los ciclos estimulados sólo con gonadotropinas exógenas (Hughes et al., 1992; Daya, 2000). Además, el tratamiento con agonistas de la GnRH ofreció la deseada ventaja adicional de la flexibilidad en la programación, que permite que los programas coordinen los comienzos de los ciclos para grupos de mujeres simplemente variando la duración de la supresión con agonistas de la GnRH. No resulta sorprendente que el “protocolo largo” se convirtiera en el tratamiento de estimulación ovárica de elección para todas las formas de TRA. Su único inconveniente es que el tratamiento con agonistas de la GnRH en ocasiones reduce la respuesta a una estimulación subsiguiente con gonadotropinas y aumenta la dosis y la duración necesarias del tratamiento con gonadotropinas para estimular el desarrollo folicular. Los costes combinados de las gonadotropinas adicionales y del propio agonista aumentan el coste total del tratamiento. No obstante, debido a que los

agonistas de la GnRH tienen más ventajas que inconvenientes, el protocolo largo ha seguido siendo el tratamiento de estimulación ovárica habitual en los ciclos de TRA durante más de un decenio.

En el ciclo típico, el tratamiento con agonistas de la GnRH comienza durante la fase lútea media, aproximadamente 1 semana después de la ovulación, en un momento en el que las concentraciones de gonadotropinas endógenas se encuentran en sus valores mínimos o próximas a éstos y en el que la liberación aguda de gonadotropinas hipofisarias almacenadas en respuesta al agonista, conocido como efecto de estimulación inicial (*flare-up*), es menos probable que estimule una nueva “ola” de desarrollo folicular (Meldrum et al., 1988; Urbancsek and Witthaus, 1988). El tratamiento también puede comenzar al inicio de la fase folicular, pero el tiempo necesario para conseguir la regulación por disminución de la hipófisis es mayor y la prevalencia de folículos quísticos es más alta (Meldrum et al., 1988). La estimulación con gonadotropinas también produce más folículos y ovocitos cuando el tratamiento con agonistas comienza durante la fase lútea (Urbancsek and Witthaus, 1988; Ron-El et al., 1991), posiblemente porque la producción de andrógenos estimulada por la LH y las concentraciones de andrógenos circulantes se suprimen con mayor eficacia durante toda la foliculogénesis (Cedars et al., 1990). Como el número de óvulos producidos es mayor, el número de embriones disponibles también es más alto. Por consiguiente, la probabilidad de disponer de un número óptimo de embriones para transferencia y un número sobrante de embriones para criopreservación es mayor. El tratamiento con un agonista de la GnRH puede programarse para comenzar el día 21 del ciclo suponiendo un ciclo normal de aproximadamente 28 días.

Los agonistas de la GnRH de uso habitual son el acetato de leuprorelina (administrado en inyección subcutánea), el acetato de nafarelina (administrado en pulverizador nasal), acetato de buserelina (administrado en inyección subcutánea o en pulverizador nasal) y triptorelina (administrada por vía subcutánea), y todos ellos parecen tener la misma eficacia (El-Nemr et al., 2002).

En condiciones ideales, debería confirmarse una supresión eficaz inducida por el agonista de la GnRH de las concentraciones séricas de estradiol (inferior a aproximadamente 40 pg/ml) y de la actividad folicular ovárica (la ecografía transvaginal basal no muestra quistes foliculares de más de 10-15 mm de diámetro) antes de comenzar la estimulación con gonadotropinas.

La dosis inicial de gonadotropinas exógenas utilizada para estimular el desarrollo de los folículos ováricos después de la regulación a la baja inducida por el agonista de la GnRH debe ajustarse a las necesidades de cada mujer. Las dosis iniciales típicas varían entre 150 y 300 UI de FSH diarias, dependiendo de la edad, de los resultados de la prueba de reserva ovárica y de la respuesta observada en ciclos previos de FIV. Puede realizarse un aumento progresivo (comenzando con una dosis baja y aumentándola según sea necesario en función de la respuesta) o una disminución progresiva (comenzando con una dosis más alta y reduciéndola según sea necesario en función de la respuesta), pero suele preferirse esta última estrategia.

Persiste la preocupación por el hecho de que el tratamiento con un agonista de la GnRH pueda suprimir las concentraciones de LH endógena por debajo de los valores necesarios para el desarrollo normal de los folículos al menos en algunas mujeres (Filicori, 1999). Como sólo el 1% de los receptores para la LH debe estar ocupado para una esteroidogénesis folicular normal (Chappel and Howles, 1991), los niveles bajos de secreción de LH después de la regulación a la baja con un agonista de la GnRH son suficientes para satisfacer las necesidades en la mayoría de las mujeres estimuladas con FSHu o FSHr solas (Balasch et al., 2001). Sin embargo, las concentraciones de LH también podrían ser insuficientes en las mujeres que presentan una supresión más profunda. Los datos indican que el tratamiento combinado con LH recombinante y FSHr puede mejorar la respuesta en mujeres que han respondido previamente mal a la FSHr sola (Laml et al., 1999). De hecho, las concentraciones de LH están claramente suprimidas (menos de 1 UI/l) en muchas mujeres tratadas sólo con FSHr, y en esos ciclos la dosis y la duración de gonadotropinas necesarias son mayores y las concentraciones máximas de estradiol son más bajas; el número de ovocitos y de embriones también puede

disminuir (Fleming et al., 1996; Fleming et al., 2000). Otros datos indican que las tasas de fecundación, implantación y embarazo podrían verse afectadas negativamente cuando las concentraciones de LH son extremadamente bajas (Westergaard et al., 2001; Gordon et al., 2001; Westergaard et al.; 1996; The Ganirelix Dose-Finding Study Group, 1998). La incidencia de embarazos bioquímicos y abortos precoces también parece ser más alta después de la concepción en ciclos de TRA en los que la LH se ha suprimido a concentraciones excepcionalmente bajas (Westergaard et al., 2000; Esposito et al., 2001). Los datos indican que podría haber un subgrupo de mujeres normogonadotrópicas que podrían beneficiarse del tratamiento complementario con hMG o LHr durante la estimulación ovárica. Aunque todavía no se han establecido criterios fiables para identificar a esas mujeres, existen buenos motivos para prever que las investigaciones futuras definirán con el tiempo el intervalo de concentraciones de LH que produce resultados óptimos (Shoham, 2002).

La respuesta a la estimulación se controla mediante mediciones seriadas del estradiol sérico y ecografía transvaginal de los folículos ováricos. La primera concentración sérica de estradiol suele obtenerse después de 3-5 días de estimulación para determinar si es preciso ajustar la dosis elegida de gonadotropinas. Posteriormente, las concentraciones séricas de estradiol y los estudios de imagen de los ovarios se obtienen cada 1-3 días en función de la calidad de la respuesta y de la necesidad de evaluar la repercusión de posibles ajustes de la dosis del tratamiento con gonadotropinas. La mayoría de las mujeres requiere un total de 7-12 días de estimulación. En general, el objetivo es tener al menos dos folículos de 17-18 mm de diámetro medio, idealmente acompañados de otros folículos de 14-16 mm, y una concentración sérica de estradiol concordante con el tamaño global y la madurez de la cohorte (aproximadamente 200 pg/ml por folículo de 14 mm o más). Es importante señalar que estos valores umbrales proporcionan únicamente una guía aproximada, ya que las mediciones de los folículos varían entre los observadores y con el equipo empleado. Los numerosos análisis de estradiol utilizados en la práctica clínica también varían en sus características de

rendimiento. Por último, cada programa debe establecer empíricamente sus propios umbrales basándose en su propia experiencia.

Generalmente también se vigila el desarrollo del endometrio durante la estimulación midiendo el grosor del endometrio. Aunque varios estudios han investigado el valor pronóstico del grosor y la textura ecográfica del endometrio en los ciclos de TRA, esta cuestión sigue siendo controvertida. Muchos autores han señalado que los resultados son mejores cuando el endometrio tiene un grosor de al menos 8-9 mm o un aspecto “trilaminar” y peores cuando el endometrio tiene un grosor de 6-7 mm o tiene un aspecto homogéneo el día de la administración de hCG (Ueno et al., 1991; Bergh et al., 1992; Oliveira et al., 1997; Noyes et al., 1995; Dickey et al., 1992; Fanchin et al., 2000; Check et al., 1993). Sin embargo, otros autores no han observado una correlación clara entre el grosor o el aspecto del endometrio y los resultados (Ueno et al., 1991; Bergh et al., 1992; Oliveira et al., 1997; Zaidi et al., 1995; Khalifa et al., 1992; Bassil, 2001). Aunque las determinaciones del crecimiento del endometrio son habituales, su utilidad sigue siendo dudosa. Por consiguiente, resulta difícil justificar los cambios en los regímenes de estimulación y la terminación del ciclo basándose en el grosor o el aspecto del endometrio (De Geyter et al., 2000).

Una vez alcanzados los umbrales de respuesta deseados, se administra hCG (5000-10.000 UI) para inducir la maduración folicular final. La dosis equivalente de la forma recombinante de hCG actualmente disponible es 250 µg (Ludwig et al., 2003; Butler, 2003). En su momento existió una controversia importante sobre el valor pronóstico de la concentración sérica de progesterona el día de la administración de la hCG. Aunque muchos estudios mostraron que las tasas de embarazo eran mucho menores cuando la concentración de progesterona era superior a 0,9-1,0 ng/ml (Schoolcraft et al., 1991; Silverberg et al., 1991; Mio et al., 1992; Fanchin et al., 1993; Harada et al., 1995; Shulman et al., 1996), otros muchos no demostraron esta correlación o incluso detectaron la correlación inversa (Givens et al., 1994; Bultillo et al., 1995;

Abuzeid et al., 1996; Hofmann et al., 1996; Moffitt et al., 1997). Con el tiempo se demostró que las concentraciones de progesterona ligeramente elevadas a mitad del ciclo son relativamente frecuentes en mujeres que responden bien a la estimulación con gonadotropinas y que constituyen un indicador de mal pronóstico sólo en las mujeres que presentan una respuesta insuficiente (Fanchin et al., 1997). Aunque podría ser tentador retrasar la administración de hCG en las mujeres con una respuesta insuficiente para dar la oportunidad a los folículos más pequeños de madurar más, esta práctica no es probable que tenga éxito y podría ser contraproducente.

d.3 Estimulación secuencial con un agonista de la GnRH y gonadotropinas exógenas: Protocolo corto.

El protocolo corto es un régimen de estimulación alternativo que aprovecha la fase inicial breve agonista de la respuesta a un agonista de la GnRH de acción prolongada y la supresión subsiguiente de la secreción de gonadotropinas endógenas inducida por el tratamiento a largo plazo (Padilla et al., 1996; Garcia et al., 1990). En un protocolo corto convencional típico se administra acetato de leuprorelina (1,0 mg diarios) los días 2-4 del ciclo, continuando luego con una dosis reducida (0,5 mg diarios), y la estimulación con gonadotropinas (150-450 UI diarias) comienza el día 3 del ciclo. Los ajustes posteriores de la dosis de estimulación con gonadotropinas, si son necesarios, se basan en la respuesta, y las indicaciones para la administración de hCG son las mismas que en el protocolo largo. Un metaanálisis inicial de 7 ensayos clínicos que compararon los regímenes de tratamiento corto y largo con un agonista de la GnRH mostró que los dos protocolos produjeron tasas de cancelación del ciclo y de embarazo similares (Hughes et al., 1992). Una revisión sistemática posterior de 22 ensayos concluyó que las tasas de embarazo conseguidas con el protocolo largo fueron en general ligeramente superiores a las alcanzadas con el protocolo corto (odd ratio: 1,27; IC: 1,04-1,56) (Daya, 2000). La disminución de la flexibilidad de programación es un inconveniente claro del protocolo corto, a menos que el inicio de la menstruación esté controlado con tratamiento preliminar con un anticonceptivo oral. El régimen de tratamiento del protocolo corto también se asocia

habitualmente a aumentos significativos de las concentraciones séricas de progesterona y andrógenos, probablemente por un rescate tardío del cuerpo lúteo (San Roman et al., 1992; Gelety et al., 1995), lo cual puede tener efectos adversos sobre la calidad de los ovocitos y la fecundación, así como sobre las tasas de embarazo (Loumaye et al., 1989).

El protocolo “ultracorto” con un agonista de la GnRH es una variación del protocolo corto en el que se administra un agonista durante 3 días para estimular la respuesta corta pero después se suspende; el tratamiento continúa sólo con gonadotropinas exógenas. Como cabría prever, los picos prematuros de LH tienen mayor prevalencia que en los ciclos estimulados con protocolos largo o corto convencionales, ya que la regulación a la baja de la secreción de gonadotropinas endógenas requiere el tratamiento con agonistas a un plazo más largo. El protocolo ultracorto de estimulación con un agonista de la GnRH produce resultados inferiores a los obtenidos con los protocolos corto y largo y rara vez se utiliza (Ron-El et al., 1992; Tan et al., 1994).

d. 4 “Coasting”

Esta estrategia ha despertado en los últimos tiempos, especial interés por su eficacia y porque constituye una medida que permite continuar hasta el final el tratamiento en pacientes con riesgo de presentar un Síndrome de Hiperestimulación ovárica (SHO). La palabra *coasting* es un anglicismo que significa “avanzar sin esfuerzo”, proceso que fue descrito por primera vez en 1995 por Sher y cols., y que consiste en el retraso en la aplicación de la hCG suspendiendo la administración de la FSH, hasta que los niveles de estradiol desciendan a valores seguros. Los resultados (Waldenstrom et al., 1999; Egbase et al., 1999; Fluker et al., 1999; Al-Shawaf et al., 2001) indican que la tasa de gestación se mantiene y, aunque parece disminuirse el porcentaje de SHO grave, no lo evita en todos los casos.

Una caída de los niveles de estradiol por debajo de 3000 pg/ml puede ser, por una parte segura pero por otra, nociva para la calidad de los ovocitos. Debe igualmente tenerse en cuenta el porcentaje de ovocitos entre 15-17 mm en el

momento de realizar el *coasting*, pues es ahí donde está el futuro del tratamiento, ya que se considera que éstos pueden seguir su crecimiento en presencia de mínimas cantidades de FSH, mientras que los más grandes y los más pequeños sufrirían atresia. Si el porcentaje de folículos mayores de 18 mm es muy superior al de los menores de 18 mm, posiblemente sea demasiado tarde y se desarrollen grandes quistes con ovocitos de mala calidad.

En la mayoría de las pacientes, los niveles de estradiol siguen subiendo durante uno o dos días más, y es necesario realizar controles diarios, tanto de estradiol como ecográfico, para seguir el desarrollo folicular. La duración del *coasting* más allá de cierto umbral de tiempo también podría afectar a la calidad de los ovocitos.

d.5 Estimulación con gonadotropinas exógenas con adición de un antagonista de la GnRH

La introducción relativamente reciente de antagonistas de la GnRH en la práctica clínica ha proporcionado otra opción para la estimulación ovárica en las TRA. A diferencia de los agonistas de acción prolongada, que primero estimulan y luego inhiben la secreción de gonadotropinas hipofisarias mediante la desensibilización de las células gonadotróficas a la GnRH por medio de una regulación a la baja de los receptores, los antagonistas bloquean el receptor para la GnRH de manera competitiva dosis-dependiente y no tienen efecto de liberación de gonadotropinas (Matikainen et al., 1992); la supresión de las gonadotropinas es casi inmediata.

Los antagonistas de la GnRH ofrecen varias ventajas potenciales sobre los agonistas. En primer lugar, la duración del tratamiento con un antagonista es más corta que con un agonista. Dado que su única finalidad es prevenir un pico prematuro de LH endógena y que sus efectos son inmediatos, el tratamiento con antagonistas puede posponerse hasta un momento más avanzado del desarrollo folicular (después de 5-7 días de estimulación con gonadotropinas), una vez que las concentraciones de estradiol se han estabilizado, eliminando así los síntomas de carencia de estrógenos que

pueden aparecer en las mujeres tratadas con un agonista (Olivennes et al., 2002). En segundo lugar, como también se eliminan los efectos supresores que pueden ejercer los agonistas sobre la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas, pueden reducirse la dosis total y la duración de la estimulación con gonadotropinas (Olivennes et al., 2002; Albano et al., 2000). Por la misma razón, los protocolos de estimulación que utilizan un antagonista pueden ser beneficiosos para las mujeres que han mostrado una respuesta baja con un protocolo largo convencional (Akman et al., 2001). En tercer lugar, al eliminar el efecto corto de los agonistas, los antagonistas de la GnRH evitan el riesgo de estimular el desarrollo de un quiste folicular. Por último, el riesgo de hiperestimulación ovárica grave asociado al uso de antagonistas parece ser menor que con los agonistas (Feberbaum et al., 2000; Ludwig et al., 2000; Ludwig et al., 2001; Al-Inany and Aboulghar M., 2002).

Los antagonistas de la GnRH también tienen posibles inconvenientes. Cuando se administran en dosis diarias pequeñas, es esencial un cumplimiento estricto del régimen de tratamiento prescrito. Los antagonistas también suprimen la secreción de gonadotropinas endógenas de forma más completa que los agonistas. Mientras que las concentraciones bajas de LH observadas durante el tratamiento con agonistas suelen ser suficientes para apoyar la esteroidogénesis folicular normal cuando se utiliza FSHu o FSHr para la estimulación, pueden no serlo las concentraciones aún más bajas observadas en las mujeres tratadas con un antagonista. De hecho, las concentraciones séricas de estradiol pueden estabilizarse o descender con el tratamiento con antagonistas (The Ganirelix Dose-Finding Study Group, 1998; Olivennes et al., 2002; de Jong et al., 2001). Aunque no parece afectarse el crecimiento folicular, muchos autores prefieren añadir o reemplazar el tratamiento con una dosis baja de hMG (75 UI) al mismo tiempo. En tercer lugar, hay datos que indican que las tasas de embarazo en los ciclos de tratamiento con antagonistas pueden ser moderadamente menores en comparación con los ciclos de agonistas en el protocolo largo (Al-Inany and Aboulghar, 2002), posiblemente porque los antagonistas de la GnRH podrían influir en la

programación mitótica de las células implicadas en la foliculogénesis, la formación de blastómeros y el desarrollo endometrial (Hernandez, 2000).

Los dos antagonistas de la GnRH disponibles para su uso clínico, ganirelix y cetorelix, tienen la misma potencia y la misma eficacia. En ambos casos, la dosis eficaz para prevenir un pico prematuro de LH es de 0,25 mg diarios, administrados por vía subcutánea (The Ganirelix Dose-Finding Study Group, 1998; Albano et al., 1997). Tanto ganirelix como cetorelix pueden administrarse en una serie de dosis diarias pequeñas (0,25 mg). El protocolo de tratamiento puede ajustarse para comenzar el día 5-6 de la estimulación con gonadotropinas (The Ganirelix Dose-Finding Study Group, 1998; Albano et al., 1997; Diedrich et al., 1994) o adaptarse a la respuesta de la mujer, comenzando el tratamiento cuando el folículo dominante alcanza aproximadamente 13-14 mm de diámetro (Ludwig et al., 2002; Klipstein et al., 2004). Los datos disponibles indican que el régimen individualizado generalmente requiere menos dosis totales y puede producir mejores resultados globales (Ludwig et al., 2002). Alternativamente, una dosis única mayor de cetorelix (3,0 mg) evitará de manera eficaz un pico de LH durante 96 horas. Si se administra el día 6-7 de estimulación, el intervalo de supresión eficaz incluirá el día de administración de hCG en la mayoría de las mujeres (75%-90%); el resto podría recibir dosis diarias adicionales (0,25 mg) según sea preciso, finalizando el día del tratamiento con hCG (Olivennes et al., 1998; Olivennes et al., 2000; Olivennes et al., 2003). El régimen de tratamiento con antagonistas en dosis única también puede posponerse hasta que el folículo dominante alcance 13-14 mm de diámetro (Fanchin et al., 2003).

Individualmente, los resultados de los primeros ensayos clínicos aleatorizados que comparaban un protocolo de tratamiento fijo con antagonistas con el protocolo largo con agonistas convencional indicaron que los dos regímenes de estimulación habían producido tasas de embarazo similares (Albano et al., 2000; Olivennes et al., 2000; Borm and Mannaerts, 2000; The European Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001). Sin embargo, un metaanálisis que combinó los datos de cinco de estos ensayos reveló que la tasa de embarazos clínicos había sido un 5% menor en

los ciclos de tratamiento con antagonistas a pesar de que se transfirieron números equivalentes de embriones de buena calidad (Al-Inany and Aboulghar, 2002). En general, la dosis total y la duración de la estimulación con gonadotropinas necesarias, las concentraciones séricas máximas de estradiol y el número de folículos y ovocitos también fueron menores en los ciclos de antagonistas.

Dosis más altas de gonadotropinas podrían ayudar a aumentar el número de folículos y ovocitos en los ciclos de tratamiento con antagonistas (Wikland et al., 2001). Otra estrategia consiste en el tratamiento preliminar con estradiol micronizado oral durante la fase lútea del ciclo antes de la estimulación (4,0 mg diarios desde el día 20 del ciclo hasta el día anterior al comienzo de la estimulación con gonadotropinas). El tratamiento previo con estradiol en la fase lútea reduce el ritmo de crecimiento y la disparidad del tamaño folicular al comienzo de la estimulación y aumenta el número de folículos maduros, ovocitos y embriones en los ciclos de tratamiento con antagonistas (Fanchin, Salomon et al., 2003; Fanchin, Cunha-Filho et al., 2003). La mejora de la dinámica folicular observada es similar a la obtenida con la regulación por disminución con un agonista de la GnRH en el protocolo largo y podría ayudar a aumentar las tasas de éxito al mismo nivel. El aumento de rebote de las concentraciones de FSH endógena que sigue a la retirada del tratamiento con estradiol podría muy probablemente presentar sinergia con las gonadotropinas exógenas para inducir el desarrollo multifolicular (de Ziegler et al., 1998; Fanchin et al., 2003).

No está clara la explicación de las tasas de embarazo ligeramente inferiores observadas en los ciclos de tratamiento con antagonistas. Es posible, pero improbable, que los antagonistas de la GnRH tengan efectos adversos sobre los ovocitos, los embriones o el endometrio (Hernandez, 2000; Ortmann et al., 2001). Parece más probable que los primeros resultados simplemente reflejaran la inexperiencia y que mejorarán con el tiempo y con las futuras mejoras del régimen de tratamiento. Muchas de las ventajas originalmente

previstas para los antagonistas de la GnRH ya se han hecho realidad. Todavía no está claro si los antagonistas sustituirán finalmente a los agonistas y se convertirán en el régimen de estimulación habitual de las TRA, pero se han considerado especialmente prometedores para las mujeres con poliquistosis ovárica y para aquéllas que responden mal a la estimulación después del tratamiento con un agonista. Tanto los agonistas como los antagonistas pueden suprimir las concentraciones elevadas de LH circulante, pero las cohortes de folículos más pequeños observadas en los ciclo de antagonistas pueden ayudar a reducir el riesgo de hiperestimulación ovárica en mujeres con poliquistosis ovárica que tienden a presentar una respuesta alta. El uso de antagonistas en lugar de agonistas también ofrece la oportunidad de utilizar un agonista en lugar de hCG para inducir la maduración final de los ovocitos, reduciendo quizá así aún más el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Mientras que la inyección de un bolo único de un agonista desencadena un pico fisiológico de LH que dura menos de 24 horas, acompañado de una elevación aguda de la FSH, las concentraciones de hCG permanecen elevados durante varios días y estimulan concentraciones claramente más altas de estradiol y progesterona (Fauser et al., 2002).

Las pautas de tratamiento con antagonistas utilizadas actualmente también tienen posibles inconvenientes para las mujeres con poliquistosis ovárica. Las concentraciones de LH tónicamente elevadas permanecerán así hasta que comience el tratamiento con antagonistas. Por consiguiente, las concentraciones de LH pueden aumentar de forma prematura, especialmente si se pospone el tratamiento con antagonistas hasta que el folículo dominante alcance al menos 14 mm. Además, los datos disponibles indican que el aumento de la exposición a la LH durante el inicio del desarrollo folicular puede ser perjudicial y predisponer a tasas de embarazo más bajas (Kolibianakis, Bourgain et al., 2002; Kolibianakis, Albano et al., 2003; Kolibianakis, Zikopoulos et al., 2002; Kolibianakis, Albano, Kahn et al., 2003; Kolibianakis, Albano, Camus et al., 2003). En teoría, el tratamiento previo con un anticonceptivo oral podría ser bastante útil al suprimir las concentraciones de LH y andrógenos antes de que comience la estimulación, reduciendo la exposición durante el

inicio del desarrollo folicular y el riesgo de elevación de la concentración de LH antes de que se inicie el tratamiento con antagonistas. La supresión preliminar con anticonceptivos orales y el posterior tratamiento con antagonistas también podría ayudar a limitar la respuesta folicular a la estimulación con gonadotropinas preservando la opción de uso de un agonista para inducir la maduración final de los ovocitos. Un comienzo más temprano del tratamiento con antagonistas puede ofrecer ventajas similares.

Las mujeres con respuesta baja constituyen otro grupo en el que los antagonistas de la GnRH podrían ser especialmente útiles debido a que el tratamiento con antagonistas elimina los efectos supresores que los agonistas de acción prolongada pueden tener sobre la respuesta folicular y puede prevenir los picos prematuros de LH observados habitualmente en mujeres estimuladas sólo con gonadotropinas (Surrey and Schoolcraft, 2000). La experiencia inicial con el uso de antagonistas en esta población específica indicaba que la adición de un antagonista al régimen de estimulación con gonadotropinas no reduce el número de folículos y de ovocitos producidos o las tasas de fecundación, y que podría aumentar las tasas de embarazo (Akman et al., 2000). En un ensayo no aleatorizado de mujeres con respuesta baja tratadas de nuevo con un protocolo largo convencional o con un régimen de estimulación con antagonistas, se observaron tasas de embarazo similares, pero la dosis total y la duración de la estimulación con gonadotropinas necesarias fueron significativamente menores en las mujeres que recibieron tratamiento con antagonistas (Nikolettos et al., 2001). Un ensayo clínico aleatorizado que comparó los resultados obtenidos con un protocolo corto con un agonista de la GnRH en microdosis y un régimen de tratamiento con un antagonista no mostró diferencias en las tasas de embarazo a pesar de que las concentraciones máximas de estradiol eran más bajas en las mujeres tratadas con un antagonista (Akman et al., 2001). En otro estudio de mujeres con respuesta baja que no consiguieron concebir con un protocolo corto convencional, un régimen de tratamiento con un antagonista produjo un número mayor de embriones y transferencias y tasas de embarazo en curso por transferencia más altas (Fasouliotis et al., 2003). Es lógico esperar que los

resultados alcanzados con los regímenes de estimulación alternativos en mujeres con una respuesta previa baja seguirán siendo moderados, pero las primeras experiencias con protocolos de antagonistas sugieren que son al menos tan eficaces como otros regímenes de tratamiento más complicados y caros.

C. RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

La recuperación de ovocitos suele realizarse aproximadamente 36 horas después de la administración de hCG. Los intervalos moderadamente más largos no aumentan sensiblemente el riesgo de ovulación ni afectan de forma negativa a la calidad de los ovocitos, las tasas de fecundación ni los resultados globales en ciclos con regulación a la baja con agonistas de la GnRH (Dimitry et al., 1991; Tan et al., 1992; Jamieson et al., 1991; Tarlatzis, 1992), pero una recuperación más temprana podría dar lugar a un número menor de ovocitos maduros (Mansour et al., 1994).

Actualmente la técnica habitual es la aspiración de ovocitos guiada por ecografía transvaginal (Ditkoff et al., 1997).

El tratamiento profiláctico con antibióticos (doxiciclina 100 mg, cefoxitina 2 g), administrados por vía intravenosa 30-60 minutos antes de la recuperación es frecuente pero controvertido debido a la baja incidencia de complicaciones infecciosas después de la recuperación (0,3%-0,6%) (Dicker et al., 1993; Bennett et al., 1993). De forma alternativa puede iniciarse el tratamiento con antibióticos orales justo después del procedimiento (tetraciclina, doxiciclina), reservando los antibióticos intravenosos para las mujeres con un riesgo alto de infección (antecedentes de enfermedad inflamatoria pélvica, endometrioma).

Los antisépticos (povidona yodada) son tóxicos para los ovocitos, y algunos datos indican que su uso podría asociarse a tasas de embarazo más

bajas (Van Os et al., 1992). Cuando se utilizan para preparar la vagina antes de la recuperación, debe realizarse a continuación una irrigación meticulosa con solución salina estéril, pero la irrigación repetida con solución salina sola suele ser suficiente para limpiar la vagina.

Se utiliza un sonda ecográfica vaginal (5-7 MHz) en una funda de plástico estéril con una guía de aguja acoplada para visualizar los ovarios y alinear la guía con los folículos en su diámetro mayor. Se utiliza una aguja desechable del calibre 16-17 G especialmente diseñada para penetrar claramente cada folículo y aspirar el líquido folicular y los ovocitos. Con la presión de vacío apropiada (100-200 mm Hg), las paredes del folículo se colapsan rápidamente pero no obstruyen la luz de la aguja. En general, pueden aspirarse todos los folículos que tengan un diámetro mayor de 10 mm con no más de 1 o 2 penetraciones diferentes en cada lado.

Las complicaciones graves de la recuperación de ovocitos son infrecuentes. Una hemorragia vaginal limitada al punto de punción es relativamente frecuente (8%) y suele controlarse con un período breve de compresión directa, pero en ocasiones puede requerir sutura (Bennett et al., 1993). La hemorragia aguda del ovario y la hemorragia o los hematomas por lesión de los vasos uterinos, ováricos o ilíacos son poco frecuentes (0,04%-0,07%), pero pueden requerir intervención quirúrgica (Bennett et al., 1993). La incidencia de infecciones pélvicas postoperatorias es bastante baja incluso sin profilaxis antibiótica (0,3%-0,6%), y casi la mitad se presenta como abscesos tuboováricos 1-6 semanas después de la recuperación (Dicker et al., 1993; Bennett et al., 1993). Las mujeres con endometriomas ováricos y las que tienen antecedentes de salpingitis presentan el riesgo más alto (Padilla, 1993; Younis et al., 1997; Tureck et al., 1993; Yaron et al., 1994). Otras complicaciones poco frecuentes son la rotura de un quiste dermoide (Cocía et al., 1996), la laceración de una vena sacra (Almog et al., 2000) y la osteomielitis lumbosacra (Almog et al., 2000).

D. MADURACIÓN DE OVOCITOS

Hasta el 20%-30% de los ovocitos recuperados pueden ser inmaduros en el momento de la recuperación, lo cual refleja el tamaño variable de los folículos de la cohorte en el momento de la administración de hCG. Es importante efectuar una evaluación precisa de la madurez de los ovocitos para determinar el momento de la fecundación, especialmente cuando se va a realizar una ICSI.

Al igual que el pico de LH en los ciclos naturales, la hCG induce la reanudación de la meiosis en los ovocitos primarios previamente detenidos en la profase I de la primera división meiótica. La madurez de los ovocitos generalmente puede valorarse por la expansión de la masa del cúmulo, la radiación de las células de la corona, el tamaño y la cohesividad de las células de la granulosa y la forma y el color del ovocito. Cuando se retira la masa del cúmulo como preparación para la ICSI puede evaluarse el ovocito en función de la presencia o ausencia del primer corpúsculo polar y la vesícula germinal (membrana nuclear).

Un ovocito maduro (metafase II) ha extruido el primer corpúsculo polar y se encuentra en la fase de reposo de la meiosis II. Las células del cúmulo suelen estar expandidas y luteinizadas y la corona radiada muestra un patrón de “rayos de sol”.

Los ovocitos maduros requieren una incubación preliminar escasa y normalmente se inseminan unas 4 horas después de la recuperación (intervalo 2-8 horas).

E. FECUNDACIÓN

La fecundación puede conseguirse mediante FIV o mediante ICSI cuando existe un factor masculino confirmado o presunto y cuando existe preocupación por una fecundación deficiente o fracasada. De hecho, un factor masculino es

actualmente el diagnóstico aislado más frecuente en las parejas que se someten a ICSI.

E. 1 Fecundación *in vitro* (FIV)

Debe obtenerse una muestra de semen por masturbación justo antes o justo después de la recuperación. Los dos métodos más utilizados para la preparación de los espermatozoides antes de la fecundación son la técnica del swim-up y la centrifugación por gradiente de densidad. A continuación se incuban los espermatozoides aislados en medios enriquecidos con una concentración alta de proteínas durante 0,5-4,0 horas para conseguir la capacitación.

En general, en FIV-TE cada ovocito se incuba con 50.000-100.000 espermatozoides móviles durante un período de 12-18 horas a 37 °C en dióxido de carbono al 5% en aire, con una humedad relativa del 98%. La reacción acrosómica, esencial para permitir a los espermatozoides penetrar en la zona pelúcida, se inicia por el contacto entre los espermatozoides y la zona. A su vez, la penetración del espermatozoide desencadena la reacción cortical con exocitosis de los gránulos corticales del ooplasma y deja la zona pelúcida relativamente resistente a la penetración por más de un espermatozoide (polispermia). La FIV convencional suele conseguir tasas de fecundación de entre el 50-70%.

La penetración del espermatozoide también activa el ovocito y estimula la segunda división meiótica, provocando la separación de las cromátides entre el y el segundo corpúsculo polar. Se evalúan los ovocitos en busca de signos de fecundación aproximadamente 18 horas después de la inseminación. Un ovocito fecundado normalmente muestra dos pronúcleos diferentes, uno derivado del ovocito y el otro derivado del espermatozoide, así como dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino. Deben examinarse meticulosamente los cigotos en busca de la presencia de pronúcleos

adicionales, ya que los embriones poliploides pueden escindirse normalmente y no ser identificados hasta fases más avanzadas del desarrollo. La poliploidía puede observarse en un 5%-10% de todos los embriones, pero tiene mucha mayor prevalencia en los ovocitos inmaduros (hasta un 30%) que en los ovocitos maduros (1%-2%) (Van Blerkom et al., 1984; Van der Ven et al., 1985). Además de la polispermia, la poliploidía puede deberse a diginia por errores en el huso meiótico o al fallo en la extrusión de un corpúsculo polar, acontecimientos que suelen asociarse a ovocitos inmaduros, envejecidos o postmaduros (MacFadden and Langlois, 2000; McFadden and Pantzar, 1996). El proceso de fecundación requiere unas 24 horas y finaliza con la primera división mitótica (escisión).

E. 2 Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)

Se desarrollaron técnicas de fecundación asistida para evitar la necesidad de que los espermatozoides penetren en la zona pelúcida. Se han descrito diversos métodos, pero el éxito de la ICSI ha hecho que los demás queden obsoletos (Levran et al., 1995; Tarlatzis and Bili, 2000). Los métodos anteriores, como la “perforación” de la zona pelúcida (“drilling”) (utilizando una micropipeta y solución de Tyrode acidificada o láser) (Gordon et al., 1988; Strohmer and Feichtinger, 1992), la disección parcial de la zona pelúcida (apertura de la zona con una microaguja) (Malter and Cohen, 1989) y la inseminación o inserción subzonal (“Suzi”) (inyección de los espermatozoides debajo de la zona en el espacio perivitelino) (Fishel et al., 1991), seguían precisando que los espermatozoides interaccionaran con el ovolema y no evitaban la fecundación polispermica, pero la ICSI resolvió estos problemas (Palermo et al., 1992).

En el procedimiento de ICSI, primero se inmoviliza un único espermatozoide seleccionado comprimiendo la cola con una pipeta de inyección (diámetro interno 5-7 μm) y posteriormente se recoge en la pipeta. Se sujeta el ovocito, generalmente con el corpúsculo polar en la posición de las 6 o las 12, y se penetra en la posición de las 3. La pipeta perfora la zona pelúcida y

el oolema y se inyecta el espermatozoide directamente en el ovoplasma. La ICSI no requiere que el espermatozoide experimente la reacción acrosómica ni que se fusione con la membrana del ovocito como sucede en la fecundación natural. En cambio, la rotura mecánica del ovoplasma y de las membranas del espermatozoide, facilitada por la inmovilización del espermatozoide y la aspiración suave y la reinyección del citoplasma del ovocito, induce la activación del ovocito (Tesarik et al., 1994; Tesarik and Sousa, 1995; Gearon et al., 1995; Gerris et al., 1995; Dozortsev et al., 1995). En la mayoría de los casos, la ICSI consigue tasas de fecundación similares a las observadas con la FIV convencional en ausencia de factores masculinos (50%-70%).

Aunque algunos investigadores han comprobado que los embriones obtenidos por ICSI pueden tener mayor probabilidad de fragmentación o menor probabilidad de blastulación (Dumoulin et al., 2000; Frattarelli et al., 2000; Griffiths et al., 2000), otros no han observado estas diferencias (Moilanen et al., 1999; Plachot et al., 2002; Westphal et al., 2003). Las diferencias en la técnica pueden influir en la eficiencia de la fecundación o en el desarrollo embrionario y podrían explicar la discrepancia (Nagy et al., 1995; Dumoulin et al., 2001). Debido a que el segundo huso meiótico varía en posición y no siempre está situado justo debajo del primer corpúsculo polar, la ICSI puede dañar el huso meiótico aunque se evite el área adyacente al primer corpúsculo polar (Hewitson et al., 1999; Hardarson et al., 2000). Un sistema óptico polarizante que visualice el huso meiótico podría ayudar a reducir el riesgo de lesión del huso (Wang et al., 2001). Como preparación para la ICSI, los espermatozoides móviles suelen incubarse en un medio de gran viscosidad que contiene un polímero sintético, polivinilpirrolidona (PVP), por lo que inevitablemente se inyecta una cantidad pequeña con el espermatozoide. No obstante, no existen indicios de que la PVP tenga efectos nocivos sobre los ovocitos o los embriones.

a. Indicaciones para ICSI

La indicación principal para la ICSI es la esterilidad por factor masculino. Los parámetros umbral del semen varían entre los centros, pero suelen incluir oligospermia intensa (<5 millones de espermatozoides/ml), astenospermia (<5% de motilidad progresiva) o teratospermia (<4% de formas normales según criterios estrictos). La ICSI también está indicada cuando se utilizan espermatozoides recuperados mediante cirugía (debido a que el número de espermatozoides maduros es relativamente limitado) o cuando el plan de tratamiento incluye el diagnóstico genético preimplantacional (debido a que la inseminación convencional puede causar la fijación de espermatozoides adicionales a la zona pelúcida, lo cual puede contaminar la muestra para el diagnóstico por la reacción en cadena de la polimerasa), así como para las parejas en las que la fecundación ha fracasado o ha tenido poca eficacia con la FIV convencional. Como protección frente a posibles consecuencias de una anomalía funcional no identificada de los espermatozoides, algunos centros realizan la ICSI en al menos una parte de los ovocitos recuperados de mujeres con esterilidad idiopática (Takeuchi et al., 2000; Hershlag et al., 2002; Jaroudi et al., 2003). La ICSI también puede producir tasas de fecundación más altas para los ovocitos madurados in vitro (Barnes et al., 1995; Nagy et al., 1996; Chian et al., 1999) y para los ovocitos criopreservados (Tucker et al., 1998; Kuleshova et al., 1999) que a menudo muestran una zona pelúcida endurecida (resistencia a la digestión por proteasas) (Schroeder et al., 1990; Manna et al., 2001; Loutradis et al., 2001; Yuzpe et al., 2000; Seta, 2001; Gardner et al., 2000). Se ha recomendado la ICSI como medio de reducir el riesgo de transmisión de agentes infecciosos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de varones seropositivos y sus parejas seronegativas (Marina et al., 1998; Loutradis et al., 2001). Por último, se ha utilizado la "ICSI de rescate" para fecundar ovocitos que no han podido fecundarse con FIV convencional, pero es relativamente ineficaz en este contexto (Yuzpe et al., 2000).

b. Fallo de fecundación tras ICSI

El fallo completo de fecundación tras ICSI es un suceso infrecuente (3% de los ciclos) (Flaherty et al., 1988). La situación más comúnmente asociada es la microinyección de menos de 3 ovocitos. Otros factores menos frecuentes son la microinyección en pacientes con globozoospermia, astenozoospermia y defectos intrínsecos de los ovocitos (fallo en la activación del ovocito), así como una disociación entre los mecanismos de la activación ovocitaria, la descondensación nuclear del esperma y la formación pronuclear. Si bien un 87% de las parejas con un fallo completo de fecundación tras ICSI tendrán una tasa de fecundación normal en ciclos posteriores, un subgrupo de pacientes volverá a repetir un fallo completo de fecundación. No disponemos de ningún método para detectar qué parejas presentarán un nuevo fallo de fecundación. Las estrategias propuestas van encaminadas a mejorar tanto los ciclos de estimulación, para obtener un número mayor de ovocitos, como la técnica de ICSI.

c. Seguimiento de los embarazos y recién nacidos

Aún es controvertido si la ICSI es un procedimiento completamente inocuo, sin secuelas para la descendencia. La crítica más generalizada es que se trata de una técnica invasiva, en la que se obvia la selección natural del espermatozoide más apto. Sin embargo, no conocemos aún los mecanismos de selección espermática en la especie humana, ni tampoco si la ICSI altera realmente estos mecanismos. Por otro lado, no está claro si la utilización de espermatozoides inmaduros de epidídimo o testículo, sin la suficiente impronta genómica, tendrá repercusiones a largo plazo. En algunos estudios, el seguimiento de los nacidos detectó un ligero aumento (2%) de alteraciones cromosómicas, mientras que la incidencia de malformaciones congénitas mayores (definidas como aquellas malformaciones que causan alteraciones funcionales o precisan de corrección quirúrgica) y menores no fue superior a las encontradas en la población general (De Vos et al., 1999; Tarlatzis et al., 1988; Van Steirteghem et al., 1998). Boundelle et al. (Boundelle et al., 1994; Boundelle et al., 1998) siguieron 2.375 gestaciones ICSI y detectaron cariotipos

fetales anormales en el 2,6% (28 casos de 1082). El 1,7% (18 casos) fueron alteraciones cromosómicas de novo. La tasa de malformaciones congénitas fue similar a las encontradas en la población general. De los recién nacidos vivos, el 2,3% (46 casos de 1966) presentaron malformaciones mayores. Los resultados de este seguimiento señalan un ligero incremento de las alteraciones cromosómicas de novo, lo que podría relacionarse con las peculiares características de los varones estériles tratados con la ICSI (Van Steirteghem et al., 2000). La alta frecuencia de transmisión de alteraciones cromosómicas estructurales está relacionada con las alteraciones cromosómicas de los varones estériles (Van Steirteghem et al., 2000). El ligero aumento detectado en la tasa de aberraciones cromosómicas está probablemente relacionado con la esterilidad masculina. El análisis cromosómico de biopsias testiculares señala anomalías cromosómicas en un 5-7% de los varones infértiles (Engel et al., 1996). Entre un 7 y un 10% de los varones con oligospermia severa presentan deleciones en las regiones AZFb y AZFc en el brazo largo del cromosoma Y (Girardy et al., 1997; Prior et al., 1997). Las microdeleciones submicroscópicas del cromosoma Y son ahora potencialmente transmisibles a la descendencia. Es aún controvertido si debe solicitarse rutinariamente el cariotipo de los varones (o las parejas) estériles subsidiarios de ICSI, o si deben analizarse las deleciones del cromosoma Y. Consideramos que debe realizarse sistemáticamente un cariotipo a todos los varones con oligoazoospermia grave o azoospermia (Hargreave, 2000), así como en las alteraciones graves de la morfología y de la movilidad. Algunos autores han descrito retraso en el desarrollo mental en los niños ICSI de un año de edad (Bowen et al., 1998; Speroff et al., 1999). Sin embargo, otros autores han comunicado una baja tasa de alteraciones neurológicas o del desarrollo mental en niños estudiados a los dos meses de edad, y un desarrollo completamente normal a los dos años (Speroff et al., 1999; Boundelle et al., 1996).

F. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Aunque se han transferido embriones con éxito en cualquier fase del desarrollo inicial, desde el cigoto a blastocisto, la transferencia suele realizarse 2-3 días después de la recuperación y la fecundación de los ovocitos.

Los sistemas para clasificar la calidad de los embriones varían entre los distintos programas, pero las características morfológicas en las que se basa la clasificación son similares, e incluyen el número de células, la simetría y la forma de los blastómeros, el grado de fragmentación citoplásmica en el espacio perivitelino y la velocidad de división. En la situación ideal, el embrión en la fase de división del día 3 tiene 6-8 blastómeros de igual tamaño sin fragmentación citoplásmica. Los embriones de menor calidad pueden mostrar menos células, blastómeros de tamaños diferentes o diversos grados de fragmentación.

F.1 Técnica de transferencia

Las características esenciales de la transferencia de embriones no han variado significativamente desde que se describiera el procedimiento por primera vez en 1984 (Edwards et al., 1984). Aunque es difícil estudiar la influencia de la técnica de transferencia en los resultados, la mayoría de los médicos consideran que puede ser casi tan importante como la calidad del embrión (Kovacs, 1999). La mayoría de los estudios (Mansour et al., 1990, Englert et al., 1986; Visser et al., 1993; Lass et al., 1999; Wood et al., 2000; Schoolcraft et al., 2001; Tomas et al., 2002) pero no todos (Tur-Kaspa et al., 1998; Nabi et al., 1997), han observado tasas de embarazo más altas después de transferencias “fáciles” que después de transferencias “difíciles”. Esta medición es subjetiva y difícil de cuantificar, pero no necesariamente no válida.

La transferencia de embriones tiene diversas dificultades potenciales. La mayoría de los autores coinciden en que es preferible eliminar el moco cervical visible o en exceso antes de la transferencia, aunque no existen pruebas de que un lavado cervical enérgico sea útil (Lesny et al., 1998).

Es preferible evitar, en la medida de lo posible, las contracciones uterinas en el momento de la transferencia de los embriones. Las manipulaciones asociadas a transferencias técnicamente difíciles o el uso de un tenáculo cervical estimulan contracciones uterinas que pueden impulsar a los embriones en sentido ascendente por las trompas de Falopio o en sentido descendente hasta el cuello del útero (Lesny et al., 1999; Lesny et al., 1998).

Los catéteres de transferencia tienen diseños variados. Pueden ser relativamente rígidos o bastante “blandos” y tener una abertura en el extremo o en el lateral; muchos tienen también una funda externa maleable. Ningún catéter blando ha demostrado ser superior (Wisanto et al., 1989; Englert et al., 1986; al-Shawaf et al., 1993; Rosenlund et al., 1996).

Algunos datos indican que los mejores resultados se obtienen cuando la punta del catéter no toca el fondo del útero y la transferencia tiene lugar a un nivel aproximadamente 1-2 cm inferior (Waterstone et al., 1991; Yovich et al., 1985; Coroleu et al., 2002). Las transferencias en puntos más altos del fondo del útero pueden aumentar el riesgo de embarazo ectópico (Yovich et al., 1985; Nazari et al., 1993), y las transferencias bajas pueden causar implantaciones cervicales (Bennet et al., 1993).

La transferencia de embriones bajo guía ecográfica transabdominal o transvaginal ofrece varias ventajas potenciales sobre una técnica ciega. La guía ayuda a facilitar la inserción de catéteres blandos, confirmar la colocación correcta y evitar traumatismos accidentales al endometrio del fondo del útero (Schoolcraft et al., 2001; Woolcott and Stanger, 1997). Los ensayos clínicos comparativos indican que las tasas de embarazo después de transferencias bajo guía ecográfica son más altas que después de transferencias a ciegas (Wood et al., 2000; Hurley et al., 1991; Prapas et al., 1995; Coroleu et al., 2000; Kan et al., 1999; Lindheim et al., 1999).

F. 2 Directrices para la transferencia de embriones

El objetivo de la FIV es optimizar las tasas de embarazo al tiempo que se reducen al mínimo los embarazos múltiples, especialmente los embarazos múltiples de orden alto. La probabilidad de éxito aumenta con el número de embriones transferidos si bien a partir de un número sólo aumenta el riesgo de embarazo múltiple (Templeton and Morris, 1998; Schieve et al., 1999; Engmann et al., 2001).

La edad materna y la calidad de los embriones son los dos factores más importantes que influyen en la probabilidad de implantación de cada embrión (Shulman et al., 1993). Cuando se dispone de embriones sobrantes de gran calidad para criopreservación, lo cual permite una selección más discriminativa, pueden transferirse menos embriones porque puede preverse mayor eficiencia de implantación (Schieve et al., 1999; Salha et al., 2000 594). Por el mismo motivo, pueden transferirse menos blastocistos que embriones en fase de división precoz (Schoolcraft and Gardner, 2000; Wilson et al., 2002; Patton et al., 1999; Langley et al., 2001). Las mujeres con las características de mejor pronóstico (<35 años, primer ciclo de FIV o ciclos previos de FIV con éxito, embriones sobrantes de gran calidad) en las que el riesgo de embarazo múltiple es más alto son candidatas apropiadas para la transferencia de un solo embrión (Strandell et al., 2000; De Neubourg et al., 2004; Matikainen et al., 2004). En conjunto, los datos disponibles indican que puede conseguirse un equilibrio óptimo entre las tasas de embarazo y el riesgo de embarazo múltiple con una política flexible de transferencia de embriones basada en la edad de la madre, la calidad de los embriones y la disponibilidad de embriones sobrantes de gran calidad.

G. APOYO DE LA FASE LÚTEA

La hiperestimulación ovárica controlada con gonadotropinas exógenas generalmente produce múltiples cuerpos lúteos que cabría suponer que

mantengan concentraciones séricas suprafisiológicas de estradiol y progesterona durante la fase lútea de los ciclos de FIV. El tratamiento concomitante con análogos de la GnRH para la prevención de los picos prematuros de LH y la luteinización suprime de manera eficaz la secreción endógena de LH, tal como se preveía. Por desgracia, aunque el tratamiento con agonistas y antagonistas termine bruscamente el día de la administración de hCG, no sucede así con la supresión residual de la LH endógena. Las concentraciones anormalmente bajas de LH durante la fase lútea pueden ser insuficientes para estimular y mantener el nivel de la función lútea necesario para inducir la maduración oportuna del endometrio en preparación para la implantación o para apoyar el comienzo del embarazo una vez establecido. La secreción endógena de LH puede mantenerse suprimida hasta 10 días después de la finalización del tratamiento con un agonista de la GnRH de acción prolongada, y la función lútea a menudo es insuficiente en cantidad o duración (Pritts and Atwood, 2002). Aunque los antagonistas tienen una acción mucho más corta, a menudo tienen la misma consecuencia. Las concentraciones integradas de estradiol y progesterona son anormalmente bajas y la duración de la fase lútea es muy corta en los ciclos de tratamiento con una antagonista de la GnRH, especialmente cuando se utiliza un agonista de la GnRH en lugar de hCG para estimular las fases finales de la maduración de los ovocitos (Beckers et al., 2003). Como no existe forma alguna de predecir quién puede requerir o no apoyo luteínico en un ciclo dado, debe proporcionarse alguna forma de tratamiento a todas las mujeres.

Numerosos estudios clínicos han comparado las tasas de embarazo clínico, en curso o con parto y las tasas de abortos espontáneos entre grupos tratados con diferentes regímenes de apoyo luteínico y han obtenido resultados variables. Se ha administrado progesterona por vía oral (300-800 mg diarios), por vía vaginal en gel al 8% (90 mg diarios), en crema o comprimidos (100-600 mg diarios) y en inyección intramuscular (25-50 mg diarios; 17 β -hidroxiprogestero, 341 mg cada 3 días). Generalmente se han administrado dosis complementarias de hCG cada 3 días (1.500-2.500 UI). Cuando se examinaron sistemáticamente los datos disponibles de 30 ensayos

aleatorizados (en todos ellos se utilizó un agonista de la GnRH) en metaanálisis, sólo se observaron algunas diferencias significativas (Pritts and Atwood, 2002). Los datos disponibles indican que el apoyo luteínico con suplementos de progesterona exógena o hCG es beneficioso en las mujeres tratadas de forma concomitante con un análogo de la GnRH y gonadotropinas exógenas. En teoría, la hCG podría ofrecer ventajas sobre otras formas de apoyo luteínico, ya que estimula el cuerpo lúteo; las concentraciones de estradiol y progesterona aumentan, así como otros factores que podrían facilitar la implantación. Sin embargo, en ensayos comparativos su eficacia parece no ser superior a la de la progesterona, y varios estudios han demostrado que los suplementos de hCG aumentan el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (Buvat et al., 1990; Herman et al., 1990; Claman et al., 1992; Araujo et al., 1994; Mochtar et al., 1996). Por consiguiente, la progesterona parece ser la opción más prudente. La progesterona oral es cómoda de administrar y, por tanto, interesante, pero tiene efectos secundarios hipnóticos y sedantes y una eficacia dudosa. Las inyecciones intramusculares son dolorosas y pueden causar reacciones locales o incluso abscesos estériles (Tavaniotou et al., 2000) pero también producen las concentraciones séricas de progesterona más altas. Sin embargo, la progesterona vaginal consigue concentraciones titulares locales más altas (Bourgain et al., 1994; Ludwig and Diedrich, 2001). No obstante, los resultados de un metaanálisis y de otros ensayos aleatorizados indican que pueden conseguirse mejores resultados con la progesterona intramuscular que con la progesterona vaginal (Damario et al., 1999; Pritts and Atwood, 2002; Propst et al., 2001).

Los datos disponibles todavía son insuficientes para determinar la utilidad de la adición de estradiol al régimen de sostén con hCG o progesterona.

No se ha definido la duración óptima del tratamiento. A falta de esos datos, la mayoría de los autores recomienda continuar el apoyo luteínico hasta aproximadamente la semana 7 de gestación (5 semanas después de la recuperación), que corresponde al momento del cambio normal lúteo-placentario.

H. RESULTADOS DE LA FIV-ICSI

Con el fin de analizar de forma global los éxitos de la FIV se crearon registros nacionales en los que se dan a conocer las tasas de gestación anuales. Las estadísticas más populares son las americanas (SART), la francesa (FIVNAT) y en nuestro país las que recoge y publica la SEF.

La siguiente tabla recoge las tasas de embarazo por ciclo, por punción y por transferencia en ciclos con embriones FIV/ICSI (SEF 2003). El porcentaje de embarazos por ciclo, punción y transferencia, es superior en FIV+ICSI.

Tasas de embarazo (%) en los ciclos con transferencia FIV / ICSI				
	FIV	ICSI	FIV + ICSI	TOTAL
% embarazo por ciclo	29,1	30,1	35,3	30,3
% embarazo por punción	33,2	33,6	37,8	33,9
% embarazo por transferencia	36,8	36,1	40,4	36,7

Las tasas de éxito de la FIV pueden expresarse de varias formas utilizando diferentes numeradores y denominadores. Los dos numeradores más frecuentes son los embarazos y los partos con hijo vivo; la mayoría de los autores consideran más importante este último. Aproximadamente el 18% de los embarazos tiene los siguientes desenlaces: aborto espontáneo (15,5%), aborto inducido (0,9%), mortinato (0,6%) o embarazo ectópico (0,7%). Las tasas de embarazos o de partos con hijo vivo pueden calcularse como porcentaje de los comienzos de ciclos, recuperaciones o transferencias. Cerca del 15% de los ciclos se cancela antes de la recuperación debido a una respuesta insuficiente (11,8%) o excesiva (0,5%) a la estimulación, una enfermedad concurrente (0,14%) o motivos personales de la paciente (1,6%) (Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, 2003). En el año 2000, los registros europeos de 22 países y 569 programas indican que se realizaron 279.267 ciclos, que representan un aumento del 8% en comparación con 1999. De ellos, 226.937 (81,2%) fueron ciclos de FIV con ovocitos frescos no de donante (44% con ICSI), que produjeron una tasa de embarazos clínicos por transferencia del 28,4%. Otros 45.800 (20,2%) fueron ciclos de transferencia de embriones

congelados, con una tasa de embarazo clínico por transferencia del 16,6%. En comparación con 1999, la tasa de embarazos clínicos aumento en un 0,7%. (Nyboe et al., 2004).

Las tasas de éxito varían ligeramente con el diagnóstico o causa de esterilidad. Aunque las definiciones de los diagnósticos pueden variar en los distintos programas, las parejas con esterilidad por factor tubárico, disfunción ovulatoria, factor masculino o idiopática mostraron tasas de éxito superiores a la media. Como cabría esperar, las tasas de éxito más bajas se observaron en mujeres con una reserva ovárica disminuida. Las parejas con esterilidad por factor uterino, "otras" causas o multifactorial mostraron tasas de éxito inferiores a la media. En todos los grupos de edad, las tasas de éxito son más altas para las mujeres con un parto con hijo vivo previo y en las que se trata de su primer ciclo de TRA en comparación con las mujeres nulíparas y aquellas en las que ha fracasado un ciclo previo de TRA (Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, 2003). No obstante, las tasas de éxito no disminuyen de forma importante hasta cuatro ciclos de FIV intentados (Meldrum et al., 1998).

H.1 Embarazo múltiple

El riesgo de embarazo múltiple aumenta considerablemente en los ciclos de TRA. En 2000, en Europa, el 26,4% de todos los partos con hijo vivo fueron múltiples; el 24,4% fueron gemelos y el 2,0% fueron trillizos o partos múltiples de un orden mayor (Nyboe et al., 2004).

Las tasas de éxito aumentan con el número de embriones transferidos hasta cierto punto por encima del cual sólo aumenta la tasa de embarazos múltiples (Templeton and Morris, 1998; Schieve et al., 1999). El número de embriones correspondiente a ese umbral generalmente define el número máximo de embriones que deben transferirse. Según los datos del registro nacional de 2001 de los resultados de las TRA (Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, 2003), cuando se transfiere 1 embrión, el 99% de los partos resultantes son partos simples.

Cuando se transfieren 2, el 66,5% son partos simples, el 32,6% son gemelos y el 0,9% son partos múltiples de orden superior (trillizos o más). Cuando se transfieren 3 embriones o más, el 62% son partos simples, el 32% son gemelos y el 5% son trillizos o partos múltiples de orden superior.

La edad y el número de embriones generados y disponibles para transferencia son casi, si no tan importantes como el número de embriones transferidos para predecir el éxito (Templeton and Morris, 1998; Schieve et al., 1999; Vahratian et al., 2003). Las mujeres jóvenes tienden a tener tasas de éxito y tasas de partos múltiples más altas.

Algunos autores han argumentado que el cultivo prolongado hasta la fase de blastocisto facilita la selección de los embriones de mayor calidad que tienen la mayor probabilidad de implantación y desarrollo y, por tanto, reduce el número de embriones necesarios para optimizar las tasas de éxito y el riesgo de parto múltiple. Para todos los grupos de edad, la tasa de partos con hijo vivo por transferencia para los blastocistos (día 5 después de la fecundación) es mayor que para los embriones en fase de escisión (día 3 después de la fecundación); las diferencias varían entre el 5% y el 12% y son menores para las mujeres menores de 35 años y mayores para las mujeres mayores de 42 años (Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, 2003). Cuando se transfieren dos blastocistos, la incidencia de embarazo múltiple de orden superior disminuye notablemente pero no se elimina del todo, ya que la incidencia de gemelaridad monocigota puede aumentar después de la transferencia de blastocistos (Wright et al., 2004) y la incidencia de gemelos no es inferior a la asociada a la transferencia de cifras mayores de embriones en fase de escisión (Gardner et al., 2000; Gardner et al., 2004).

Las directrices más recientes, que recomiendan no transferir más de dos embriones en mujeres menores de 35 años, y quizá 1 en las que tienen las mejores características pronósticas, deberían ayudar a reducir aún más el

riesgo de embarazos múltiples de orden superior y disminuir el porcentaje de embarazos gemelares.

Con el fin de reducir los riesgos inherentes a las gestaciones múltiples, se puede aconsejar a la pareja la conversión de la gestación múltiple en una gestación de orden menor (generalmente gemelar, y más raramente única) mediante la reducción embrionaria. Conlleva un riesgo de aborto que oscila entre el 8 y el 16% (Evans et al., 1996). Independientemente de los aspectos éticos, desde el punto de vista perinatal la evolución general de los embarazos gemelares es más favorable sin embrioreducción (Graigo, 1998), mientras que la de los embarazos cuádruples o mayores es mejor tras la embrioreducción. Respecto al embarazo triple, la bibliografía es discrepante.

H.2 Riesgos de la FIV-ICSI

Además del riesgo de embarazo múltiple, la FIV aumenta el riesgo de embarazo ectópico y de síndrome de hiperestimulación ovárica. Ninguno de ellos es frecuente, pero tampoco raro. La mejor defensa frente a ellos es tenerlos en cuenta y conocer sus factores predisponentes y sus signos y síntomas precoces. Las preocupaciones iniciales por una posible relación entre el cáncer de ovario y los fármacos inductores de la ovulación han disminuido en gran medida, pero todavía persisten.

Embarazo ectópico

El riesgo de embarazo ectópico es al menos dos veces mayor en las mujeres que conciben mediante TRA (Marcus and Brinsden, 1995; Braude and Rowell, 2003). Aunque no se han definido los mecanismos responsables, las explicaciones lógicas son la migración natural a la trompa de Falopio y la transferencia tubárica directa accidental de los embriones. Las mujeres con esterilidad por factor tubárico o antecedentes de embarazo ectópico previo tienen un riesgo más alto, probablemente porque los embriones que migran o son transferidos a las trompas de Falopio tienen menor probabilidad de retornar

al útero antes de la implantación. También es posible que exista un efecto adverso de la elevación de las concentraciones hormonales en los ciclos de FIV sobre la función de transporte tubárico (Fernandez et al., 1991). Los volúmenes altos de medio de transferencia o una colocación más profunda del catéter pueden predisponer a una transferencia tubárica accidental (Marcus and Brinsden, 1995; Knutzen et al., 1992). Se han identificado las transferencias técnicamente difíciles como otro factor de riesgo independiente (Lesny et al., 1999). Los embarazos heterotópicos, en los que se implantan uno o más embriones en el útero y en la trompa de Falopio, son extremadamente raros en los embarazos espontáneos (aproximadamente 1 de cada 10.000 embarazos) (Reece et al., 1983), pero mucho más frecuentes en las mujeres que conciben después de la inducción de la ovulación o de la FIV (Braude et al., 2003; Lemus, 2000).

Síndrome de hiperestimulación ovárica

Básicamente, este síndrome consiste en la salida de líquido del compartimento intravascular, que se acumula en la cavidad abdominal (y en la pleural en los casos graves). Como consecuencia, se produce una disminución de la tensión arterial y del flujo sanguíneo renal, por lo que se reduce el volumen total de orina producido. La hipótesis más aceptada como fisiopatología de este síndrome es un aumento de la permeabilidad vascular, probablemente mediada por el VEGF (vascular endotelial growth factor).

Clínicamente, el síndrome se caracteriza por un aumento del perímetro abdominal, debido al aumento del tamaño de los ovarios, y al líquido acumulado en la cavidad abdominal. Suele aparecer dolor abdominal de intensidad variable, producido por la distensión de los ovarios, pequeñas crisis de torsión, etc. Cuando el síndrome es más grave y se afecta el flujo sanguíneo renal, disminuye la producción de orina, pudiendo llegar a la oligoanuria. Es frecuente la aparición de náuseas, vómitos o diarrea.

El diagnóstico del SHO se hace fundamentalmente mediante la anamnesis. La paciente refiere haber sido sometida a una inducción de la ovulación, y también tener síntomas como dolor abdominal, sensación de hinchazón, dificultad respiratoria, o la producción de una escasa cantidad de orina.

I. CALIDAD FOLICULAR

Consideramos folículos de buena calidad aquellos cuyo ovocito es capaz de fecundarse dando lugar a un embrión que se desarrolla con normalidad. La calidad folicular puede evaluarse mediante diferentes parámetros:

I.1 Parámetros ecográficos

El tamaño del folículo y su volumen constituyen dos posibles parámetros de evaluación de la calidad folicular. En ciclos naturales se considera el diámetro medio de los folículos preovulatorios en unos 20 mm y este tamaño se ha relacionado con la madurez ovocitaria. En ciclos estimulados existe controversia, ya que algunos estudios correlacionan un mayor volumen de líquido y tamaño folicular con una mayor tasa de fecundación, mejor calidad embrionaria (Ectors et al.; 1997; Arnot et al., 1995; Dubey et al., 1995; Wittmaach et al., 1994; Teisser et al., 2000) y mayores tasas de gestación (Saith et al., 1998), mientras que otros (Salha et al., 1998) no encuentran una relación importante entre el potencial de desarrollo del ovocito y el tamaño folicular. Sin embargo, Wittmaack et al. (1994) observan unas tasas de recuperación de ovocitos, fecundación y división significativamente menores en los folículos con volumen menor de 1 ml y otros autores demuestran que folículos con diámetros mayores de 14 mm tienen una alta probabilidad de contener ovocitos maduros (Scott et al., 1989; Teissier et al., 2000) o bien que los ovocitos de folículos con un diámetro mayor de 16 mm y un volumen mayor de 2 ml en el momento de la punción tendrán mayores posibilidades de conseguir una gestación (Andersen, 1993). No existe por tanto un acuerdo

sobre el tamaño y volumen folicular relacionado con una mayor calidad folicular y mejores resultados reproductivos.

La vascularización perifolicular también se ha relacionado con la calidad folicular. Este parámetro se mide mediante ecografía Doppler color que permite visualizar los capilares pequeños debido a su mayor sensibilidad. Mediante esta técnica se ha demostrado la existencia de cambios en la vascularización de los folículos durante su maduración, incrementándose durante el periodo periovulatorio (Campbell et al., 1993) al igual que la velocidad del flujo sistólico (Balakier y Stronerll, 1994). Chui et al., (1997) no encontraron diferencias significativas entre las tasas de fecundación y los diferentes grados de vascularización perifolicular, pero sí existe una tendencia a obtener tasas de fecundación elevadas con mayor grado de vascularización, así como tasas de embarazo significativamente mayores. Ello explica que algunos autores hayan relacionado una vascularización pobre con una mayor tasa de fallos en la gestación y con mayor porcentaje de aneuploidia (Gregory, 1998; Chui et al., 1997). Por ello, la medición de la vascularización perifolicular mediante Doppler podría servir para anticipar la probabilidad de embarazo, incluso ante el inicio de un ciclo determinado, permitiendo retrasar el comienzo del tratamiento hasta un momento más adecuado (Gregory, 1998).

I.2 Parámetros en células de la granulosa

Las células de la granulosa (CG) realizan una importante función de síntesis produciendo un gran número de productos de los que las hormonas esteroideas son los más conocidos y mejor estudiados. Los esteroides participan en el proceso reproductivo ejerciendo su acción en tejidos distantes tras ser transportados por el sistema cardiovascular, pero también actúan de modo paracrino y autocrino en el folículo donde son producidos influyendo sobre el patrón secretor de las células tecaes, la maduración del ovocito, la tasa de mitosis y la diferenciación de las propias CG (Gore-Langton y Amstrong, 1994). El control de la función esteroidegénica ovárica no está mediado únicamente por las gonadotropinas. Diversos factores participan en su

regulación actuando como mediadores y ejerciendo su influencia tanto a nivel de las CG como en el resto del folículo incluyendo el ovocito.

La gran mayoría de las sustancias producidas por las CG tienen sus correspondientes receptores para permitirles realizar su acción a nivel local, por lo que las CG expresan en su membrana múltiples moléculas con funciones orientadas a producir un ovocito de buena calidad que fecunde y consiga un embarazo. De igual manera presentan receptores para otras sustancias como neurotransmisores (Tsafiriri y Adashi, 1994), distintos antígenos de histocompatibilidad (Fujiwara et al., 1993; Baranao et al., 1995; Dohr, 1987), leucocitarios (Hattori et al., 1995; Bukulmez y Arici; 2000), marcadores de células endoteliales (Antczak y Van Blerkom, 2000), antígenos de diferenciación como CD9, CD47, CD56 y CD44 (Ohta et al., 1999) y moléculas de adhesión (Vigano et al., 1997; Vigano et al., 1998, Bukulmez y Arici, 2000; Blaschuk y Farookhi, 1989; Canipari, 2000).

La expresión de todos estos receptores, antígenos y moléculas sobre la superficie de las CG pueden utilizarse como marcadores de calidad folicular. El antígeno de diferenciación CD44s (forma estándar) se expresa en las CG humanas, siendo dicha expresión mayor en las células del cúmulo que en las CG murales. Se ha demostrado que la expresión de CD44s en CG de folículos con ovocitos maduros es mayor que en folículos con ovocitos inmaduros, de modo que dicha molécula puede constituir un marcador de madurez ovocitaria (Ohta et al., 1999). Otra molécula relacionada con la maduración del ovocito es la conexina-43, la cual se expresa en las células del cúmulo y se cree que es necesaria para el desarrollo ovocitario (Canipari, 2000). La integrina $\alpha 6\beta 1$ es un receptor para la laminina que se encuentra en la superficie de las CG. Produce una disminución de los niveles de progesterona que previene una prematura luteinización del folículo perjudicial para la adecuada maduración del ovocito (Fujiwara et al., 1997).

La muerte celular programada o apoptosis es un importante fenómeno fisiológico en el ovario que podemos encontrar a nivel de folículos atrésicos, en

el epitelio durante la ovulación así como en el cuerpo lúteo, por lo que alteraciones en este proceso podrían conducir a diversas condiciones patológicas (Palumbo y Yeh, 1995). En situaciones normales existe una regulación hormonal de la apoptosis folicular que depende del desarrollo en que se encuentre el folículo, así como una complicada regulación génica en donde intervienen los genes bax, bcl-2, bcl-x (Tilly et al., 1995), el sistema Fas y Fas Ligando (Hakuno et al., 1996; Kim et al., 1999; De los Santos et al., 2000), p53 (Keren-Tal et al., 1995; Kim et al., 1999) y c-myc (Jhonson et al., 1993).

Se ha estudiado profundamente la relación entre el porcentaje de CG que se encuentran en apoptosis y la calidad folicular demostrándose que los ovocitos cuyas CG tienen menor porcentaje de células apoptóticas obtienen mejores tasas de fecundación que los que tienen mayor porcentaje de células en apoptosis (Nakahara et al., 1997a; Nakahara et al., 1997b). Estos autores también relacionan un elevado porcentaje de CG en apoptosis con folículos vacíos y peor calidad del embrión en caso de fecundarse el ovocito. En un trabajo realizado por Oosterhuis et al. (1998) se midió apoptosis en CG de mujeres sometidas a FIV y se encontraron diferencias significativas entre el grupo que conseguía embarazo y el que no lo conseguía. Las pacientes con mayor porcentaje de células apoptóticas tenían menor probabilidad de quedar embarazadas, estableciendo estos autores un punto de corte en el 13% de CG en apoptosis.

Nuestro grupo realizó un estudio en el que se evaluaba la apoptosis en CG en un grupo de mujeres con posible déficit de reserva ovárica (FSH basal elevada), encontrando un aumento significativo de dicho porcentaje en estas mujeres respecto a un grupo control (Castilla et al., 2000). Estos resultados sugieren que detrás de la resistencia a las gonadotropinas exógenas observada en mujeres con déficit de reserva ovárica estaría una disminución de la funcionalidad de las CG por un aumento de la apoptosis y coinciden con lo observado por otros autores que encuentran una apoptosis en CG cuatro veces mayor en el grupo de mujeres con un elevado nivel basal de FSH, lo que indica que dichas mujeres tendrán un peor pronóstico en la FIV (Seifer et al., 1996).

I.3 Parámetros en líquido folicular (LF)

El líquido folicular (LF) representa un complejo compartimento funcional en el que se integran distintas señales endocrinas, inmunológicas y mitógenas que hacen que cada folículo ovárico sea único. La actividad de las células de la granulosa produce distintas sustancias y factores que pueden ser valorados en el LF estableciendo distintos parámetros de calidad folicular que vamos a analizar a continuación.

Se han asociado altas absorbancias a 415 y 455 nm en LF con la fecundación “in vitro” de ovocitos y la capacidad de división embrionaria (Fisch et al., 1990; Bayer et al., 1988). Estos autores observaron que los ovocitos que se fecundaban procedían de folículos con niveles significativamente mayores de absorbancia a 455 nm comparados con aquellos que no se fecundaban, aunque no pudieron relacionar la absorbancia a 455 nm con la división embrionaria. La referida absorbancia se debe al contenido de bilirrubina del LF, suponiendo por tanto que la bilirrubina presente en LF puede ser un marcador de vascularización y de calidad folicular.

El LF humano contiene una cantidad escasa de lipoproteínas de baja y muy baja densidad, encontrándose la mayoría del colesterol en forma de HDL. Ninguno de los parámetros lipídicos del LF predice la capacidad de fecundación “in vitro” de los ovocitos asociados (Berger et al., 1987; Montero et al., 1991), no teniendo tampoco relación con la velocidad de división embrionaria (Montero et al., 1991).

Se han descrito elevaciones significativas de distintas proteínas del LF en los folículos cuyos ovocitos son maduros y consiguen mayores tasas de fecundación y división (Shalgi et al., 1973; Edwards, 1974; Gonzalez, 1992). Posiblemente el incremento de la vascularización y permeabilidad en folículos maduros es también el causante de la mayor concentración de proteínas como

fibrinógeno, plasminógeno, ceruloplasmina, fracción C3 del complemento, alfa1-antitripsina, alfa2-macroglobulina, beta2-microglobulina y transferrina.

Se cree que la alfa1-antitripsina aumenta en LF en momentos cercanos a la ovulación con la finalidad de proteger al complejo cúmulo-corona-ovocito de las enzimas proteolíticas que en ese momento actúan sobre la pared folicular (Lavy et al., 1988). Esto podría relacionarse con la observación de niveles significativamente más elevados de esta proteína en el LF de folículos con ovocitos maduros y que fecundan (Imoedenhe y Shaw, 1986; Nayudu et al., 1983). En ciclos de DFM para técnicas FIV, nuestro grupo publicó las mismas conclusiones (Molina et al., 1991), no obstante Andersen (1993) no encontró relación entre los niveles en LF de alfa1-antitripsina y la tasa de gestación conseguida tras la realización de FIV.

Diversos autores han sugerido que la transferrina podría relacionarse con la madurez y la calidad ovocitaria. Entman et al. (1987) encontraron que había niveles mayores de esta proteína en LF correspondientes a ovocitos maduros que se fecundaban que en aquellos asociados a ovocitos inmaduros o que no se fecundaban. Sin embargo, nosotros (Molina, 1990) no encontramos relación entre niveles de transferrina en LF y capacidad del ovocito para fecundarse, ni tampoco con la velocidad de división embrionaria, al igual que ocurrió con las concentraciones de albúmina (Molina, 1990).

Nayudu et al. (1983) relacionan los niveles de fibrinógeno en LF con la capacidad del ovocito para implantarse. Los folículos cuyos ovocitos se fecundaron y dividieron presentaban niveles más bajos de fibrinógeno que aquellos que no se fecundaron. Otra sustancia que se relaciona con la capacidad de fecundación del ovocito es la fosfatasa ácida, ya que sus niveles son significativamente más bajos en mujeres cuyos ovocitos no se fecundaron (Kleinman et al., 1987; Gonzalez et al., 1989; Molina, 1990).

Se ha detectado la presencia de glicosaminoglicanos en LF humanos. Los niveles de condroitín sulfato, dermatán sulfato y sulfato de heparina parecen correlacionarse positivamente con el resultado de la maduración folicular y de la FIV (Bellin et al., 1986; Bellin et al 1987). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con otros autores que encuentran concentraciones bajas de glicosaminoglicanos en folículos maduros y altas en folículos atrésicos (Bushmeyer et al., 1985), sin relacionarlos con otros resultados (Franchimont et al., 1990).

La relación de determinados factores de crecimiento con la capacidad de fecundación del ovocito en programas de fecundación "in vitro" (FIV) ha sido estudiada ampliamente. Uno de los principales es el factor de crecimiento insulin-like tipo I (IGF-I), el cual juega un papel clave en la fisiología folicular, ya que estimula la acción de la aromatasa, la producción de inhibina por las células de la granulosa e induce la expresión en éstas de receptores para la LH (Carson et al., 1989). Nuestro grupo ha encontrado en anteriores estudios relación entre las concentraciones de IGF-I en LF y la capacidad de fecundación del ovocito, siendo dichas concentraciones significativamente más elevadas en los LF de folículos cuyos ovocitos se fecundaron (Jimena et al., 1992a; Jimena, 1993).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Rabinovici et al., 1990; Suchanek et al., 1991). Sin embargo, otros encuentran asociación entre las concentraciones de IGF-I en LF y maduración del ovocito, pero no con la fecundación del mismo (Artini et al., 1994). Incluso se ha realizado un estudio en pacientes en tratamiento con ICSI en el que no se encontró correlación entre los niveles de IGF-I en LF y la gestación tras la microinyección espermática (Hammadeh et al., 2000).

La reducción de IGFBP-3 es un importante mecanismo para incrementar la biodisponibilidad de IGF libre modulando la respuesta folicular a las gonadotropinas. Este efecto es aún mayor en ciclos estimulados (Amato et al., 1998). Tras estudiar las concentraciones de IGF-I y de IGFBP-3 en LF de

folículos dominantes de pacientes estériles sometidas a FIV, se pudo demostrar una correlación positiva entre la maduración ovocitaria y los niveles de IGF-I y negativa para IGFBP-3 lo que demuestra el papel de estos factores de crecimiento en la calidad folicular (Nardo et al., 2001).

Otros factores de crecimiento estudiados en LF, son el factor de crecimiento insulín-like tipo II (IGF-II), cuyas concentraciones son mucho mayores en LF que las del IGF-I (Kubota et al., 1993), y que se relaciona con el número de ovocitos obtenidos, con la calidad ovocitaria y con la tasa de gestación de un programa FIV-TE (Berkane et al., 1989).

Distintas situaciones con estado nutricional subóptimo (desórdenes alimenticios, amenorrea inducida por el ejercicio, amenorrea hipotalámica) están asociadas a bajos niveles séricos de leptina. Igualmente alteraciones como obesidad o SOP cursan con elevación sérica y en líquido folicular de leptina, indicando la existencia de una relativa deficiencia de ésta o una resistencia en su función. La leptina podría ser un interesante enlace entre el tejido adiposo y el sistema reproductivo, informando si las reservas energéticas son adecuadas para una normal reproducción (Moschos et al., 2002). Durante la reproducción asistida los niveles de leptina en LF podrían ser utilizados como valor predictivo, así a mayor concentración en LF existe una mayor resistencia ovárica al tratamiento y menor posibilidad de embarazo (Cioffi et al., 1997; Butzow et al., 1999).

Las concentraciones elevadas en LF del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y de la interleuquina-1 (IL-1) también se relacionan con folículos cuyos ovocitos fueron fecundados (Mendoza et al., 1999). Asimismo, la endotelina-2 se encuentra elevada en LF de folículos cuyos ovocitos se fecundaron y dividieron, correlacionándose los niveles de esta sustancia con los de IGF-I (Sudik et al., 1996).

Otro factor de crecimiento que se relaciona directamente con la calidad folicular es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sintetizado por las células de la granulosa y que puede correlacionarse con la calidad del folículo a través de la angiogénesis perifolicular (Gregory, 1998; Chui et al., 1997). Sin embargo, estudios con pacientes sometidas a protocolos de DFM, relacionan incrementos del nivel de VEGF en LF con una menor respuesta ovárica, disminución de la mitosis de células de la granulosa e incremento de la apoptosis en este compartimento celular, lo cual traduciría una mala calidad de los folículos afectados (Quintana et al., 2001).

Hay autores que observan que altos niveles de CA-125 en LF interfieren con la fecundación e implantación (Acien et al., 1988), pero otros no encuentran relación entre los niveles en LF de dicho marcador tumoral y la fecundabilidad del ovocito (Mordel et al., 1992), al igual que los resultados obtenidos por nuestro grupo (Jimena et al., 1993). Respecto a la alfa-fetoproteína (AFP) y al antígeno carcinoembrionario (CEA) tampoco hemos encontrado relación entre sus niveles en LF y el resultado de la fecundación “in vitro” (Jimena et al., 1993).

Nayudu et al. (1983) demostraron una relación positiva entre los niveles de Inmunoglobulina G en LF y el resultado de la fecundación “in vitro”. Dichos resultados no fueron confirmados por nuestro laboratorio en el estudio realizado por Molina et al. (1991). También existe controversia en la relación existente entre las beta-endorfinas en LF y la fecundabilidad del ovocito, ya que Fachinetti et al. (1989) encontraron niveles más elevados en LF de ovocitos que se fecundaban, mientras que otros autores no observan dicha relación (Tam et al., 1988; Lovegren et al., 1991).

La proteína placentaria-A asociada al embarazo (PAPP-A) parece servir como índice de madurez folicular pero no predice la capacidad de fecundación del ovocito (Sinosich, 1987).

Tarlatzis et al. (1985) demostraron que las concentraciones de AMPc en LF se asocian con fecundación, división y viabilidad de los ovocitos humanos “in vitro”, por lo que, para estos autores, la concentración de dicha sustancia en LF podría ser un marcador de madurez ovocitaria y desarrollo folicular en los ciclos FIV. Otro posible marcador podría ser la actividad fibrinolítica del activador del plasminógeno que se ha visto aumentada en los LF de ovocitos que se fecundan (Milwidsky et al., 1989).

Nuestro grupo de trabajo no encontró relación entre la fecundabilidad ovocitaria y los niveles de insulina en LF (Jimena, 1993) lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Ben-Rafael et al., 1987), aunque contradice lo encontrado por Diamond et al. (1985), que describen mayores niveles de insulina en LF de ovocitos no fecundados que en los que se fecundan.

Los niveles de inhibina en LF están relacionados con el crecimiento folicular de modo que se elevarían en folículos con ovocito maduro (Miller et al., 1991). Otros autores también los relacionan positivamente con el estradiol sérico y con el número de folículos y ovocitos de ciclos FIV (McLachlan et al., 1986). Los niveles de RNA mensajero de la subunidad alfa de la inhibina se encuentran elevados en el LF de folículos con ovocitos maduros y que posteriormente se fecundan (Fujiwara et al., 2000), no obstante, también observan que niveles excesivos de dicha subunidad alfa se asocian con mala calidad embrionaria.

Se ha descrito la presencia de activina A en LF, pero se desconoce su relación con la maduración folicular y la fecundación “in vitro” del ovocito (Burger et al., 1988). Sin embargo, dado que en cultivos de ovocitos y células del cúmulo se observa una relación positiva entre los niveles de activina A y la calidad ovocitaria, debemos pensar que dicha sustancia debe actuar en la maduración ovocitaria (Lau et al., 1999). La folistina se encuentra también en

LF, siendo sus niveles más elevados en folículos que contienen ovocitos en estadios de metafase I y II que en vesícula germinal (Fujiwara et al., 2000).

Con relación a los niveles de hormonas hipofisarias en LF, se ha demostrado un aumento significativo de los niveles de LH en los folículos cuyos ovocitos se fecundaban (Jimena, 1993), así como una relación positiva entre dichos niveles y las tasas de fecundación y gestación (Imoedenhe y Sigue, 1988). Por tanto, los niveles de LH en LF son capaces de predecir la calidad folicular, señalando la exposición adecuada del folículo preovulatorio a la LH para la reanudación de la meiosis. La FSH en LF no diferencia los ovocitos capaces de fecundar de aquellos que no se fecundan en ciclos estimulados con citrato de clomifeno/hMG (Stone et al., 1988; Molina, 1990), sin embargo, Laufer et al. (1984) encontraron en ciclos estimulados con hMG/hCG niveles de FSH mayores en LF de ovocitos que se fecundaban que en los que no lo hacían.

Lindner et al. (1988) refieren niveles significativamente más elevados de prolactina en LF correspondientes a ovocitos fecundados que en aquellos asociados a ovocitos no fecundados, concluyendo que dicha hormona puede ser un parámetro adicional de calidad folicular en LF. Sin embargo, nuestro grupo (Molina, 1990) no observó relación entre la prolactina presente en LF y el resultado de la fecundación "in vitro".

Las hormonas esteroideas sexuales han sido ampliamente estudiadas como parámetros de evaluación de la calidad folicular. Los niveles de estradiol en LF reflejan la calidad global del folículo, relacionándose su concentración con el número de células de la granulosa, así como con la madurez del citoplasma y núcleo ovocitario (kreiner et al., 1987; Botero-Ruiz et al., 1984; Liu et al., 1986; Entman et al., 1987; Teissier et al., 2000). Diversos autores han estudiado los niveles de estradiol en LF de ovocitos fecundados y no fecundados, obteniéndose niveles significativamente elevados en LF correspondientes a ovocitos que se fecundan (Wransby et al., 1981;

Imoedenhe and Sigue, 1988; Lee et al., 1987; Liu et al., 1986). Nuestro grupo también demostró la existencia de un aumento significativo en los niveles de estradiol en LF de folículos cuyos ovocitos se fecundaron, relacionando dichos niveles con el número de células de la granulosa (Molina, 1990; Jimena, 1993). Estos resultados coinciden con los estudios de Gregory (1998) tras cultivo de células del cúmulo durante 24 horas y valoración de la concentración de estradiol en el medio, siendo ésta significativamente mayor en los ciclos que finalizan con el embarazo de la paciente. No obstante, otros autores no han observado esta relación (Berger et al., 1987; Sinosich, 1987; Smith et al., 1988).

Así mismo, en los estudios realizados por nuestro grupo (Molina, 1990; Jimena, 1993) se encontró una relación entre los niveles de progesterona en LF y la calidad folicular, siendo dichos niveles mayores en los LF cuyos ovocitos se fecundaban tras la técnica de reproducción asistida. Estos resultados coinciden con los de otros autores que encuentran correlación positiva entre los niveles de progesterona en LF y las tasas de fecundación. La capacidad de la progesterona para predecir la fecundación del ovocito puede estar asociada con el hecho de que sus niveles en LF se relacionan con la madurez del ovocito y con el grado de luteinización del folículo (Kreiner et al., 1987; Entman et al., 1987; Droesch et al., 1988; Botero-Ruiz et al., 1984; Liu et al., 1986; Lee et al., 1987; Reinthaller et al., 1987; Teissier et al., 2000), con la tasa de fecundación (Wransby et al., 1981; Ben-rafael et al., 1987; Reinthaller et al., 1987; Franchimont et al., 1989; Molina 1990), la tasa de división (Ben-rafael et al., 1987) y la de gestación (Basuray et al., 1988). Otros trabajos, sin embargo, no encuentran estas relaciones (Berger et al., 1987; Sinosich, 1987; Smith et al., 1988; Imoedenhe y Sigue, 1988).

Los andrógenos, y más concretamente la testosterona, se han utilizado cómo un parámetro de calidad ovocitaria encontrándose significativamente disminuidos en los LF de folículos cuyos ovocitos se fecundaron posteriormente (Jimena, 1993). Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por

Botero-Ruiz et al. (1984) y Uehara et al. (1985), así como con el mayor incremento de anomalías ovocitarias observadas en ovocitos preovulatorios con altos niveles de andrógenos en LF (De Sutter et al., 1991). Sin embargo, Teissier et al. (2000) no encuentran relación entre los niveles de testosterona y la madurez ovocitaria, a pesar de que esta hormona se correlaciona negativamente con el crecimiento del folículo y con las concentraciones de estradiol y progesterona.

Hay autores que creen que los niveles de dichas hormonas esteroideas no son predictores de la calidad folicular, pero que sí lo es el cociente progesterona/estradiol, el cual se encuentra significativamente elevado en los casos en que los ovocitos se fecundan (Enien et al., 1995). Por otro lado, Xia y Younglai (2000) encuentran que el cociente estradiol/testosterona se relaciona directamente con la morfología y calidad del ovocito, mientras que no existe relación con los niveles de estradiol, progesterona y testosterona medidos independientemente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Andersen (1993), el cual correlaciona el aumento de estradiol/testosterona en LF con mayores tasas de gestación en programas de FIV. También se ha relacionado con el número de células de la granulosa del folículo, de modo que si un folículo contiene un número bajo de células de la granulosa no aromatizará suficientes andrógenos, y entrará en atresia. Dicho cociente refleja la efectividad de las células de la granulosa en la conversión de andrógenos en estradiol, de modo que las células de la granulosa con un valor estradiol/testosterona mayor son las más efectivas y las que pertenecen a folículos más sanos. Un valor bajo indicaría cambios atrésicos en el folículo. Dado que los folículos de mayor tamaño son los que más células de la granulosa contienen, se puede deducir que los folículos grandes tienen un nivel estradiol/testosterona alto, y por tanto mayor tasa de fecundación.

Respecto a la androstendiona, diversos autores observan que existen niveles más elevados en LF correspondientes a ovocitos no fecundados que en aquellos asociados a ovocitos fecundados (Kobayashi et al., 1991; De Sutter et

al., 1991; Dehennin et al., 1987). Sin embargo, también han sido publicados resultados que no encuentran diferencias significativas en sus niveles (Liu et al., 1986; Ben-Rafael et al., 1987; Imoedenhe y Sigue, 1988). Según De Sutter et al. (1991) se pueden utilizar los niveles de androstendiona en LF y la razón androstendiona/estradiol para evaluar la probabilidad de obtener un ovocito cromosómicamente anormal, ya que dichas determinaciones se encontrarían significativamente elevadas.

Niveles elevados de cortisol en LF se asocian con ovocitos que no se fecundaron (Jimena et al., 1992b; Jimena, 1993), de modo que el cortisol ejercería un efecto negativo sobre el folículo, actuando directamente sobre el ovocito y/o alterando el proceso de maduración de las células de la granulosa. Estos resultados coinciden con los de Fateh et al. (1989) que observan que los LF correspondientes a ovocitos fecundados tienen niveles de cortisol menores que los que no se fecundan, siendo dichos niveles mayores en los LF de ovocitos maduros que en los inmaduros.

Un estudio realizado por Harlow (1997) concluye que existe un aumento de cortisol en LF durante la aparición del pico de LH y que dichos niveles de cortisol son necesarios para la completa maduración del ovocito, así como para disminuir la actividad de la enzima 11- β -hidroxiesteroide dehidrogenasa (11 β -HSD) que lo mantiene inhibido. Esta enzima puede constituir un marcador de fecundabilidad del ovocito ya que el aumento de su actividad se relaciona con menores tasas de fecundación y gestación en programas de FIV-TE (Michael et al., 1995). Además se ha demostrado un mecanismo de inhibición paracrino de la enzima, ya que al incubar células de la granulosa con actividad negativa de la enzima con otras con actividad positiva, estas últimas se convierten en células con actividad de la 11 β -HSD negativa (Michael et al., 1996). La correlación entre 11 β -HSD y embarazo puede explicarse por la necesidad de que exista inmunosupresión en el lugar de la implantación (Gregory, 1998).

Los niveles de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y de la proteína transportadora de cortisol (CBP) fueron medidos por Andersen et al.

(1990) en mujeres sometidas a programas de FIV-TE, concluyendo que la medida de estas proteínas es un buen parámetro para predecir el resultado de la FIV ya que se encuentran significativamente elevadas en las mujeres que conseguían embarazo. Campo et al. (1989) observaron que la SHBG está presente en el LF, sugiriendo que pudiera jugar un papel importante en la limitación de la concentración de esteroides en el folículo. Sin embargo, Ben-Rafael et al. (1987), no encontraron relación entre la capacidad de fecundación del ovocito y las concentraciones de SHBG.

OBJETIVO

El uso de fármacos agonistas de la GnRH supuso una importante mejora en la efectividad de los protocolos de estimulación ovárica utilizados para fecundación *in vitro*, aumentando las tasas de recuperación de ovocitos totales y metafase II y las tasas de embarazo, y disminuyendo la tasa de cancelación por pico prematuro de LH.

Los antagonistas de la GnRH han surgido como una alternativa en los tratamientos de reproducción asistida. Con un mecanismo de acción distinto producen una anulación de los picos endógenos de LH, atribuyéndose ventajas, como necesidad de menores dosis de gonadotropinas y menor incidencia de síndrome de hiperestimulación ovárica, sin cambios significativos en las tasas de embarazo.

El objetivo principal del presente estudio es comparar los resultados clínicos y de calidad folicular, obtenidos en los ciclos de ICSI mediante estimulación ovárica con el tratamiento de antagonista de la GnRH versus el habitual de agonistas de la GnRH mediante protocolo largo.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio clínico randomizado, realizado en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, en pacientes sometidas a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) durante el período comprendido entre Abril de 2005 y Septiembre de 2006.

A. 1 Criterios de inclusión

1. Se incluirá en la muestra de estudio toda mujer de edad comprendida entre 18 y 40 años, con esterilidad primaria, con FSH sérica el día 3º menor de 15 mUI/mL y que vaya realizar su primer ciclo de reproducción asistida (ICSI), independientemente de la indicación.
2. Aceptar la participación en el estudio.

Como criterios de exclusión se considera el no cumplimiento de alguno de los anteriores criterios de inclusión.

A. 2 Consentimiento informado

Es imprescindible que la paciente otorgue libremente su consentimiento informado antes de poder ser incluida en el estudio clínico.

A. 3 Grupos de estudio

Al final del estudio se habían incluido 274 pacientes, distinguiendo dos subgrupos:

1. 139 pacientes que recibieron protocolo largo de Agonistas de la GnRH.
2. 135 pacientes que recibieron protocolo de Antagonistas de la GnRH.

B. PROTOCOLOS DE ESTIMULACION

B. 1 Protocolo con agonistas de la GnRH

Se realizó un protocolo de “análogo largo”. Consiste en administrar desde el día 22 del ciclo, 0,1 mg/día de acetato de leuprorelina (Procrin 0.5, Abbott, Madrid, España) hasta el día en que se inicia la administración de gonadotropina, en el que se reduce la dosis al 50% hasta el día de la hCG. Tras la regla, espontánea o tras tratamiento con anticonceptivos, se procede a comprobar la frenación hipofisaria mediante ecografía vaginal ovárica (ausencia de folículos y quistes) y determinación sérica de estradiol (<50 pg/mL). Si se confirma dicha hipofisectomía médica se comienza a administrar 300 UI de FSH recombinante (FSHr) al día (Gonal F, Serono, Madrid, España; o Puregón, Organón, Barcelona, España) durante dos días, y 150 UI de FSHr desde el 3º al 7º día. En este día se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol, con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente. Una vez que la respuesta folicular es adecuada (más de 3 folículos ováricos mayores de 17 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 microgramos de coriogonadotropina alfa recombinante (r-hCG) (Ovitrelle, Serono, Madrid, España).

B. 2 Protocolo con antagonistas de la GnRH

Se inicio el día 2º del ciclo, tras una regla espontánea o provocada con tratamiento anticonceptivo, con 300 UI de FSHr los días 2º y 3º del ciclo y a partir del 4º día del ciclo se administró 150 UI de FSHr. El día 6º de estimulación o cuando un folículo adquiere 14 mm. de diámetro se empieza la administración de 0.25 mg/día de antagonista Cetorelix (Cetrotide; Serono Laboratorios SA, Aubonne, Switzerland) o Ganirelix (Orgalutran; Organon Laboratorios, Oss, The Netherlands). El día 9º se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente. Una vez que la respuesta folicular es adecuada (más de 3 folículos ováricos mayores de 17 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 microgramos

de coriogonadotrofina alfa recombinante (r-hCG) (Ovitrelle, Serono, Madrid, España).

Se administro LH recombinante, a mujeres ≥ 35 años, con FSH basal > 10 mUI/mL en el día 3º del ciclo o con una ratio FSH/LH $> 3/1$. Este grupo lo formaron 46 pacientes (33%) en el grupo que recibió protocolo largo de agonistas de la GnRH y 50 pacientes (37%) en el grupo que recibió protocolo de antagonistas de la GnRH.

C. PUNCIÓN FOLICULAR

La punción folicular se realizo con adecuadas condiciones de asepsia, vía transvaginal ecoguiada y aproximadamente 36 horas después de la administración de la hCG, anticipándonos al proceso ovulatorio. Tras abundante lavado con suero fisiológico, realizamos una anestesia paracervical con Mepivacaína clorhidrato diluido al 0,2% (Scandinibsa, Inibsa, Barcelona, España) y utilizando una aguja de punción ovárica (Labotect Labor-Technik-Göttingen, Göttingen, Germany) puncionamos uno a uno los folículos mayores de 17 mm aspirando su contenido en tubos de recogida de líquido folicular (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) con un sistema de vacío a 150 mm de Hg de presión.

El contenido del folículo aspirado se transporta rápidamente al laboratorio de reproducción, junto a la sala de punción, para comprobar de inmediato la presencia del complejo cúmulo-corona-ovocito en el líquido folicular.

No se realizó de forma habitual profilaxis antibiótica, y tan sólo en los casos en que la punción ofreció mayor dificultad se administró vía intravenosa una dosis única de 1.500 mg de cefuroxima sódica (Cefuroxima Normon EGF, Madrid, España) o de 1.000 mg de lactobionato de eritromicina (Pantomicina Abbot, Madrid, España) en pacientes alérgicas a betalactámicos.

D. RECOGIDA DE SEMEN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El semen se obtuvo por masturbación tras lavado de manos y de genitales y después de abstinencia sexual previa de 3-5 días. Una vez recogido el semen en un recipiente estéril se mantiene a 37°C durante 30 minutos para que se licue. Todas las manipulaciones del eyaculado se realizan dentro de una campana de flujo laminar con instrumental estéril. Una pequeña muestra de semen se utiliza para observar en fresco la motilidad espermática y demás parámetros habituales del seminograma.

La recuperación de espermatozoides móviles se llevó a cabo mediante la técnica de *swim-up* (Windt et al., 1990) que describimos a continuación. Tras depositar la muestra del semen en un tubo de cultivo de 17x100 mm junto con medio de cultivo Gamete (IVF Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden), se agita y se centrifuga a 300 g durante 7 minutos. El sobrenadante se retira con una pipeta Pasteur y al pellet se le añade cuidadosamente 1 ml de medio de cultivo y se vuelve a centrifugar durante 15 segundos para depositar las partículas más groseras que pudieran haberse desprendido del pellet. A continuación se coloca en la incubadora con objeto de que los espermatozoides móviles migren al medio de cultivo. A los 20-30 minutos se recogen mediante una pipeta parte del sobrenadante, pasándolo a un tubo de cultivo de 12x75 mm en el que permanece hasta la realización de la técnica de fecundación "in vitro". Una gota de esta preparación se observa al microscopio para contabilizar los espermatozoides móviles utilizando una cámara de Neubauer.

E. LABORATORIO DE FECUNDACIÓN "IN VITRO": AISLAMIENTO DE OVOCITOS Y REALIZACIÓN DE TÉCNICAS DE FECUNDACIÓN "IN VITRO" (FIV- ICSI)

Una vez que los líquidos foliculares (LF) llegan al laboratorio, se inicia la búsqueda e identificación del ovocito. Para ello se depositan en una placa de

Petri de 100x15 mm y bajo visión estereomicroscópica se observan para localizar el complejo cúmulo-corona-ovocito. Identificado éste, mediante una pipeta Pasteur se coloca en una nueva placa de Petri de 35x10 mm en el interior de unas gotas de medio de cultivo IVF Vitrolife (IVF Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) previamente gasificado y calentado a 37°C, para eliminar los restos de LF.

Tras el aislamiento de los ovocitos, éstos se depositan en una placa de 4 pocillos (2-3 ovocitos por pocillo) junto a 0,7 ml de medio de cultivo IVF Vitrolife por pocillo.

La realización de ICSI obliga a eliminar el cúmulo y la corona radiada del ovocito. Para decumular se sumerge el complejo cúmulo-corona-ovocito en una solución con 80 UI/mL de hialuronidasa (HYASE, IVF Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) en medio de cultivo Gamete (IVF Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) durante 10-20 segundos aspirando varias veces el complejo mediante pipeta Pasteur. La actuación sobre la corona radiada se realiza mecánicamente haciendo pasar al ovocito varias veces por una pipeta Pasteur afilada con un diámetro adecuado. Una vez aislado el ovocito de sus envolturas se procede a la realización de la microinseminación en los ovocitos maduros en metafase II caracterizados por la presencia del primer corpúsculo polar, el cual sirve como depósito del material cromosómico extra que es expulsado del ovocito después de la telofase de la primera división meiótica (Veeck, 1986). Esta estructura es la primera indicación de que el proceso de maduración se ha completado.

La placa de microinseminación utilizada fue una placa de Petri hidrófoba en la cual se colocan los ovocitos en microgotas. A continuación se añaden varias microgotas con suspensión de Polivinil-pirrolidona (PVP) (ICSI, IVF Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) y a estas microgotas de PVP se añaden 1-3 µl de la suspensión de espermatozoides recuperados mediante *swim-up* con el objeto de frenar a los espermatozoides, permitir la fractura del flagelo y su captura. Una vez lista la placa se cubren todas las gotas con aceite mineral (Ovoil; IVF Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) previamente equilibrado con medio de cultivo, gasificado y atemperado a 37°C.

Para realizar la microinseminación utilizamos un microscopio invertido (Eclipse TE-200, Nikon, Tokyo, Japón) con pletina termostatazada y un equipo de micromanipulación (Narishige, Tokyo, Japón). En dicho microscopio se coloca la placa de microinseminación y se realiza ésta con micropipetas comerciales (Humagen, Charlottesville, VA, USA). Tras la microinseminación se cultivan los ovocitos microinyectados que no sufrieron degeneración en medio de cultivo IVF-Scandinavia a 37°C en atmosfera 5% de CO₂.

Aproximadamente a las 17-18 horas tras la realización de las técnicas FIV o ICSI observamos en el microscopio invertido el ovocito con el objeto de comprobar si se ha producido su fecundación (presencia de dos pronúcleos). A continuación se incuban los ovocitos fecundados en medio de cultivo IVF Vitrolife durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se clasifican los embriones según su calidad siguiendo la clasificación de Plachot et al. (1987). Se consideró embriones de buena calidad aquellos que presentan blastómeros iguales y ausencia de restos citoplasmáticos (tipo I), y los que presentaron blastómeros iguales y presencia de algunos restos citoplasmáticos (tipo II) que se encontraban en cuatro células o más a las 48 horas de la punción folicular.

La transferencia de embriones a útero se realizó a las 48 horas de la punción folicular mediante catéter de transferencia embrionaria (Labotect Labor-Technik-Göttingen, Göttingen, Germany). En ningún caso se transfirieron más de tres embriones. El resto de embriones no transferidos se dejaron en medios de cultivo secuenciales (Vitrolife, Science Scandinavia, Gothenburg, Sweden) hasta el día 5º desde la punción, para posibilitar su desarrollo hasta el estadio de blastocisto.

F. AISLAMIENTO DE LÍQUIDO FOLICULAR

Todos los LF utilizados, con objeto de determinar parámetros de calidad folicular, fueron claros sin ningún signo de contaminación sanguínea macroscópica, correspondiendo cada una de las muestras a un pool de líquidos de cada paciente. Se centrifugó (400g) en el laboratorio durante 10

minutos, con el objetivo de decantar el sobrenadante eliminando el contenido celular. Los líquidos foliculares fueron congelados a -80°C hasta la determinación hormonal.

G. VARIABLES A ESTUDIAR

1. Días de estimulación con FSHr
2. Dosis total de FSHr
3. Nivel sérico de estradiol el día que se administra hCG
4. Número total de folículos mayores de 17 mm el día de la hCG
5. Número de ciclos cancelados
6. Ciclos con *coasting*
7. Número de ovocitos recuperados
8. % de ovocitos en metafase II
9. % ovocitos fecundados/ovocitos microinyectados
10. % de embriones >4 células
11. Número de embriones tipo I y II
12. Número de embriones transferidos
13. Tasa de gestación
14. % de embarazos múltiples
15. Niveles de hormonas esteroideas (estradiol, progesterona, testosterona y prolactina) en líquido folicular
16. Niveles de hormonas proteicas (FSH y LH) en líquido folicular

H. CALIDAD FOLICULAR

El estudio de calidad folicular se realizó evaluando hormonas esteroideas y proteicas en LF.

H. 1 DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS.

Los niveles de estradiol séricos durante el desarrollo folicular y los de estradiol, progesterona y testosterona en LF se determinaron mediante kits comerciales (Roche/Hitachi modular E-170 system, Madrid, España).

H. 2 DETERMINACIÓN DE HORMONAS PROTEICAS.

La medida de FSH, LH y Prolactina en LF se realizó mediante kits comerciales (Roche/Hitachi modular E-170 system, Madrid, España).

I. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio se realizó mediante los paquetes estadísticos STATISTICA for Windows 5.1 (StatSoft, Tulsa, USA), MedCalc 1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) y SPSS, dándose los siguientes pasos:

I. 1 Análisis descriptivo

Las pacientes incluidas en el estudio se clasificaron en base al protocolo de estimulación seguido (Agonistas o Antagonistas). Se realizó un análisis descriptivo de cada una de las variables objeto de estudio en cada grupo. Para la descripción de las variables cualitativas se utilizó la frecuencia absoluta y relativa (porcentaje) y de las variables cuantitativas: media, desviación estándar, mínimo, máximo y número de casos.

I. 2 Estudio de normalidad de las variables

Para comprobar si las variables cuantitativas seguían una distribución normal se utilizó el test de Shapiro-Wilk, rechazándose la hipótesis de normalidad por debajo de una $p < 0,005$. Al considerar todas las pacientes juntas, se comprobó que todas las variables cuantitativas analizadas siguieron una distribución normal, excepto los niveles de estradiol en suero y líquido folicular, los cuales lo hicieron tras transformación logarítmica.

I.3 Comparación de la distribución de variables cualitativas

La comparación de variables cualitativas se realizó mediante el test de X^2 , y en caso de no cumplirse las condiciones de validez el test de Fisher.

I.4 Comparación de medias

Para la comparación de medias entre los grupos de pacientes establecidos se realizó en primer lugar el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas. Si dicho test resultaba significativo se realizaba el test de Welch, y si el test de Levene resultaba no significativo se calculaba la t de Student clásica.

RESULTADOS

INDICACIÓN DEL TRATAMIENTO (Tabla I)

La tabla I nos muestra la homogeneidad en cuanto a la indicación del tratamiento entre las 139 pacientes que recibieron el protocolo con agonistas de la GnRH, y las 135 pacientes que recibieron el protocolo con antagonistas de la GnRH.

Tabla I: Indicación del tratamiento.

	AGONISTAS (n=139)	ANTAGONISTAS (n=135)
Factor masculino	81 (58,2%)	65 (48,1%)
Factor tubárico	10 (7,1%)	17 (12,6%)
SOP	4 (2,8%)	5 (3,7%)
Endometriosis	1 (0,7%)	5 (3,7%)
EOD	30 (21,6%)	36 (26,7%)
Mixta	8 (5,7%)	4 (3,0%)
Otra causa	5 (3,6%)	3 (2,2%)

N.S.

VARIABLES CLÍNICAS Y DE ESTIMULACIÓN DE LOS CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE EN PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON AGONISTAS DE LA GnRH COMPARADAS CON LOS CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE EN PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON ANTAGONISTAS (tabla II)

La tabla II nos muestra la homogeneidad de edad entre las 139 pacientes que recibieron el protocolo con agonistas de la GnRH, y las 135 pacientes que recibieron el protocolo con antagonistas de la GnRH.

Se comparan distintas variables clínicas y resultados tras ser sometidas todas ellas a desarrollo folicular múltiple (DFM) con FSHr.

El tiempo de duración de la estimulación ovárica en los ciclos no cancelados es menor en el grupo de las pacientes que recibieron protocolo de antagonistas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

No hay diferencia en cuanto al número de folículos mayores de 17 mm el día de la administración de hCG.

El nivel de estradiol sérico el día de la administración de hCG alcanza mayores niveles en el grupo que recibió el protocolo con agonistas, aunque sin llegar a la significación estadística.

La dosis total de FSHr y LHr empleada hasta el día de la administración de la hCG, así como la dosis de FSHr administrada los tres primeros días es similar en ambos grupos.

Tabla II: Variables clínicas y de estimulación de los ciclos de DFM con protocolo de agonista largo y antagonista.

VARIABLES CLÍNICAS	AGONISTAS (n=139)	ANTAGONISTAS (n=135)
Edad (años)	33,2 ± 4,1 (18-40)	32,6 ± 3,8 (22-40)
Días estimulación (ciclos no cancelados)	11,4 ± 2,2 (5-18)	10,0 ± 2,3 * (4 -16)
Nº folículos >17 mm (ciclos no cancelados)	6,4 ± 3,1 (1-16)	6,2 ± 3,3 (1-16)
Dosis total FSHr (UI) (ciclos no cancelados)	2619,4 ± 1278,4 (800 - 6900)	2402,5 ± 1548,4 (850 - 6300)
Estradiol sérico (día hCG) pg/mL (ciclos no cancelados)	2497,7 ± 1731,0 (459 - 6929)	1468,2 ± 1540,5 (417 - 6830)
LHr ampollas	12,6 ± 6,8 (2 -31) n=46	11,0 ± 6,8 (2 - 32) n=50
Dosis tres primeros días (FSHr)	743,6 ± 201,5 (450-1350)	774,4 ± 196,5 (450-1450)

*p<0,001

VARIABLES DE LABORATORIO DE LOS CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE EN PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON AGONISTAS COMPARADAS CON LAS PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON ANTAGONISTAS (Tabla III)

No encontramos diferencias en el número de ovocitos por punción, ni en el porcentaje de ovocitos en metafase II, ni en el porcentaje de ovocitos fecundados entre pacientes que recibieron protocolo con agonistas y pacientes que recibieron protocolo con antagonistas.

Existe un mayor porcentaje de fallo de fecundación total en el grupo que recibió protocolo con antagonistas sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la calidad y el grado de división embrionaria no presentan diferencias entre ambos grupos, y consecuentemente el número de pacientes con transferencia embrionaria tras punción folicular y el número de embriones transferidos es también comparable entre pacientes de ambos grupos.

El porcentaje de desarrollo embrionario hasta blastocisto de los embriones no transferidos tampoco presenta diferencias entre los dos grupos de pacientes.

Tabla III: Variables de laboratorio de los ciclos de DFM.

VARIABLES LABORATORIO		AGONISTAS	ANTAGONISTAS
Nº ciclos puncionados		118	111
Nº ciclos con transferencia		72,7% (101/139)	63,0% (85/135)
Nº ovocitos por punción		8,9 ± 4,9 (1-32)	8,2 ± 4,1 (1 -19)
% ovocitos metafase II		78,3 ± 23,0 (20-100)	77,2 ± 23,6 (20-100)
% ovocitos fecundados/ ovocitos microinyectados		69,0 ± 32,7 (0 -100)	65,0 ± 36,5 (0 -100)
Tasa de punciones con fallo total de fecundación		14,4% (17/118)	23,4% (26/111)
% emb calidad	(tipo I)	29,2% (73/250)	35,9% (83/231)
	(tipo II)	10,8% (27/250)	9,1% (21/231)
% emb >4 células		74,7% (186/250)	72,7% (168/231)
% transferencia tras punción		85,6% (101/118)	76,6% (85/111)
Nº embriones por transferencia		2,1 ± 1,0 (1-3)	2,0 ± 1,1 (1-3)
% embriones no transferidos con desarrollo hasta blastocisto		14,7% (5/34)	14,3% (6/42)

N.S.

INDICACIÓN DEL TRATAMIENTO. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN Y RESULTADO FINAL (EMBARAZO O NO) (tabla IV)

La tabla IV nos muestra la homogeneidad en cuanto a la indicación del tratamiento entre las pacientes que recibieron el protocolo con agonistas de la GnRH, y quedaron embarazadas y las pacientes que recibieron el protocolo con antagonistas de la GnRH. y quedaron embarazadas. Así mismo también existe homogeneidad en la indicación del tratamiento entre las pacientes que recibieron un protocolo u otro y que no quedaron embarazadas.

Tabla IV: Indicación del tratamiento. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no).

	AGONISTAS		ANTAGONISTAS	
	GESTACIONES (n=33)	NO GESTACIONES (n=106)	GESTACIONES (n=19)	NO GESTACIONES (n=116)
Factor masculino	23 (69,7%)	58 (54,7 %)	13 (68,4%)	52 (44,8%)
Factor tubárico	0	10 (9,4%)	3 (15,8%)	14 (12,1%)
SOP	2 (6,1%)	2 (1,9%)	0	5 (4,3%)
Endometriosis	0	1 (0,9%)	0	5 (4,3%)
EOD	8 (24,2%)	22 (20,7%)	2 (10,5%)	34 (29,3%)
Mixta	0	8 (7,5%)	0	4 (3,4%)
Otra causa	0	5 (4,7%)	1 (5,2%)	2 (1,7%)

N.S.

VARIABLES CLÍNICAS Y DE ESTIMULACIÓN DE LOS CICLOS DE DFM CON PROTOCOLO DE AGONISTA LARGO Y ANTAGONISTA. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN Y RESULTADO FINAL (EMBARAZO O NO) (tabla V)

La tabla V nos muestra la homogeneidad de edad entre las pacientes que recibieron el protocolo con agonistas de la GnRH, y quedaron embarazadas y las pacientes que recibieron el protocolo con antagonistas de la GnRH. y quedaron embarazadas así como la homogeneidad de las pacientes que no quedaron embarazadas tras recibir un protocolo u otro. Se comparan distintas variables clínicas y resultados tras ser sometidas todas ellas a desarrollo folicular múltiple (DFM) con FSHr.

El tiempo de duración de la estimulación ovárica en los ciclos no cancelados es menor en el grupo de las pacientes que recibieron protocolo de antagonistas y no quedaron embarazadas en comparación con las pacientes que recibieron protocolo de agonistas y no quedaron embarazadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

No hay diferencia en cuanto al número de folículos mayores de 17 mm el día de la administración de hCG.

El nivel de estradiol sérico el día de la administración de hCG alcanza mayores niveles en el grupo que recibió el protocolo con agonistas y que quedaron o no embarazadas en comparación con el grupo que recibió el protocolo con antagonistas, aunque sin llegar a la significación estadística.

La dosis total de FSHr y LHr empleada hasta el día de la administración de la hCG, así como la dosis de FSHr administrada los tres primeros días es similar en ambos grupos.

Tabla V: Variables clínicas y de estimulación de los ciclos de DFM con protocolo de agonista largo y antagonista. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no).

VARIABLES CLÍNICAS	AGONISTAS		ANTAGONISTAS	
	Gestaciones (n=33)	No gestaciones (n=106)	Gestaciones (n=19)	No gestaciones (n=116)
Edad (años)	32,2 ± 4,3 (18-40)	33,5 ± 4,0 (18-40)	31,8 ± 3,0 (25-38)	32,8 ± 3,9 (22-40)
Días estimulación (ciclos no cancelados)	11,3 ± 1,6 (8-14)	11,4 ± 2,6 (5-18)	10,6 ± 1,8 (8-14)	9,9 ± 2,3 * (4-16)
Nº folículos >17 mm (ciclos no cancelados)	7,5 ± 2,4 (3-14)	6,1 ± 3,3 (1-16)	7,3 ± 3,1 (1-16)	6,0 ± 3,3 (1-16)
Dosis total FSHr (UI) (ciclos no cancelados)	2478,9 ± 1060,9 (800 - 4950)	2663,5 ± 1341,1 (962 - 6900)	2120,5 ± 935,7 (1000 - 3900)	2445,3 ± 1620,1 (850 - 6300)
Estradiol sérico (día hCG) pg/mL (ciclos no cancelados)	3342,3 ± 1733,5 (794 - 6356)	2808,2 ± 1731,8 (459 - 6929)	1397,0 ± 1028,4 (812-3205)	1474,4 ± 1621,2 (417-6830)
Dosis tres primeros días (FSHr)	689,1 ± 196,0 (450-1125)	760,7 ± 201,1 (450-1350)	694,1 ± 141,2 (450-1050)	786,8 ± 201,3 (450-1450)

*p<0,001 agonistas, no gestaciones vs antagonistas, no gestaciones

VARIABLES DE LABORATORIO DE LOS CICLOS DE DFM. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN Y RESULTADO FINAL (EMBARAZO O NO) (tabla VI)

No encontramos diferencias en el número de ovocitos por punción, ni en el porcentaje de ovocitos en metafase II, ni en el porcentaje de ovocitos fecundados entre pacientes que recibieron protocolo con agonistas y quedaron embarazadas y pacientes que recibieron protocolo con antagonistas y quedaron embarazadas así como tampoco encontramos diferencias entre las pacientes que no quedaron embarazadas y recibieron uno u otro protocolo.

La calidad y el grado de división embrionaria no presentan diferencias entre los diferentes grupos, y consecuentemente el número de embriones transferidos es también comparable entre pacientes de los diferentes grupos.

El porcentaje de desarrollo embrionario hasta blastocisto de los embriones no transferidos tampoco presenta diferencias entre los diferentes grupos de pacientes.

Tabla VI: Variables de laboratorio de los ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no).

VARIABLES LABORATORIO		AGONISTAS		ANTAGONISTAS	
		Gestaciones (n=33)	No gestaciones (n=106)	Gestaciones (n=19)	No gestaciones (n=116)
Nº ovocitos por punción		9,0 ± 3,9 (1-16)	8,9 ± 5,3 (1-32)	9,4 ± 2,9 (6 -17)	7,9 ± 4,3 (1 -19)
% ovocitos metafase II		79,0 ± 20,5 (30-100)	78,1 ± 24,3 (20-100)	86,7 ± 22,1 (25-100)	74,8 ± 24,0 (20-100)
% ovocitos fecundados/ ovocitos microinyectados		77,6 ± 25,8 (20 -100)	65,4 ± 35,6 (0 -100)	84,8 ± 20,8 (42 -100)	60,8 ± 37,8 (0 -100)
% emb calidad	(tipo I)	35,6% (32/90)	25,6% (41/160)	40,3% (25/62)	33,7% (57/169)
	(tipo II)	13,3% (12/90)	9,4% (15/160)	4,8% (3/62)	10,1% (17/169)
% emb >4 células		85,6% (77/90)	66,9% (107/160)	79,0% (49/62)	69,2% (117/169)
Nº embriones por transferencia		2,4 ± 1,0 (0-3)	2,0 ± 1,0 (0-3)	2,6 ± 0,9 (0-3)	1,9 ± 1,2 (0-3)
% embriones no transferidos con desarrollo hasta blastocisto		27,3% (3/11)	8,0% (2/25)	27,8% (5/18)	3,0% (1/33)

N.S.

VARIABLES DE EMBARAZO DE LOS CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE EN PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON AGONISTAS COMPARADAS CON LAS PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON ANTAGONISTAS (Tabla VII)

Al analizar el porcentaje de embarazo entre los dos grupos estudiados observamos que al considerarlo por ciclo es inferior en el grupo de las pacientes que recibieron protocolo con antagonistas respecto a las pacientes que recibieron protocolo con agonistas. Cuando el cálculo se realiza sobre los ciclos con punción o con transferencia embrionaria, la tasa de embarazo del protocolo con antagonistas sigue siendo inferior a la de las pacientes que recibieron protocolo con agonistas, aunque asciende progresivamente. En ningún caso estas diferencias alcanzaron la significación estadística.

Tampoco puede apreciarse diferencias significativas respecto a la tasa de implantación embrionaria entre ambos grupos de pacientes.

La tasa de embarazo múltiple y el porcentaje de los embarazos finalizados en aborto es mayor entre las pacientes que recibieron protocolo con antagonistas sin alcanzar significación estadística.

Tabla VII: Variables de embarazo de los ciclos de DFM.

VARIABLES DE EMBARAZO	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
% gestación por ciclo	23,7% <i>(33/139)</i>	14,1% <i>(19/135)</i>
% gestación por punción	27,9% <i>(33/118)</i>	17,1% <i>(19/111)</i>
% gestación por transferencia	32,7% <i>(33/101)</i>	22,3% <i>(19/85)</i>
Tasa de implantación global	28,4%	23,4%
% embarazos múltiples	27,2% <i>(9/33)</i>	42,1% <i>(8/19)</i>
% abortos	3,0% <i>(1/33)</i>	15,8% <i>(3/19)</i>

N.S.

EFFECTOS ADVERSOS DE LA ESTIMULACIÓN DE LOS CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE EN PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON AGONISTAS COMPARADAS CON LAS PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO CON ANTAGONISTAS (Tabla VIII)

Las pacientes sometidas a desarrollo folicular múltiple mediante protocolo con agonistas para técnicas FIV presentan una tasa de cancelación similar a las pacientes sometidas a desarrollo folicular múltiple mediante protocolo con antagonistas.

La realización de maniobras de *coasting* se realiza con mayor frecuencia en el grupo de pacientes que recibieron protocolo con agonistas aunque sin alcanzar significación estadística.

Cuando analizamos la frecuencia de la aparición de embarazos múltiples, uno de los principales efectos adversos del tratamiento con gonadotrofinas en el desarrollo folicular múltiple, se comprueba que no existen diferencias significativas entre ambos protocolos, pero es más prevalente en el grupo de pacientes que recibieron protocolo con antagonistas, obteniéndose en este grupo 6 gestaciones gemelares y 2 triples vs. 9 gemelares y ninguna gestación triple en el grupo que recibió protocolo de agonistas.

Tabla VIII: Efectos adversos de la estimulación de los ciclos de DFM en pacientes que recibieron protocolo con agonistas comparadas con las pacientes que recibieron protocolo con antagonistas.

VARIABLES ESTIMULACIÓN	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
Ciclos cancelados	15,1% (21/139)	17,7% (24/135)
% Coasting	14,4% (17/118)	4,5% (5/111)
% embarazos múltiples	27,2% (9/33)	42,1% (8/19)

N.S.

VARIABLES CLÍNICAS, DE LABORATORIO Y RESULTADOS DE LAS PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO DE AGONISTA LARGO COMPARADAS CON LAS PACIENTES QUE RECIBIERON PROTOCOLO DE ANTAGONISTA Y CUYOS LÍQUIDOS FOLICULARES CLAROS FUERON ANALIZADOS (Tabla IX)

En esta tabla comparamos los datos clínicos de las pacientes tratadas con protocolo de agonista largo y los datos de las pacientes que tratamos con protocolo de antagonistas, así como de los ciclos de DFM realizados en ellas y cuyos líquidos foliculares claros fueron analizados.

No existen diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la edad.

Los días de duración de la estimulación ovárica y dosis total de FSHr durante el protocolo de DFM y hasta la administración de hCG no son diferentes entre las pacientes de ambos grupos.

Los niveles de estradiol sérico el día de la administración de hCG tampoco presentan diferencias entre ambos grupos.

No existe ningún caso de *coasting* en el grupo de pacientes que recibieron protocolo con antagonistas.

Tabla IX: Variables clínicas y de estimulación de los ciclos de pacientes tratadas con agonistas y antagonistas y cuyos líquidos foliculares claros fueron analizados.

VARIABLES CLÍNICAS Y DE ESTIMULACIÓN	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
Líquido folicular claro (LFC)	53	38
Edad (años)	33,0 ± 4,8 (18 - 40)	32,4 ± 3,6 (22 - 39)
Días de estimulación	11,6 ± 2,1 (7 -18)	10,8 ± 1,8 (8 -14)
Dosis total FSHr (UI)	2546,9 ± 1304,4 (1137 - 6900)	2612,8 ± 2223,3 (1000 -4650)
Estradiol sérico (día de hCG) pg/ml	2371 ± 2053 (459 - 6356)	1830 ± 1391 (489 - 6136)
% Coasting	13,2% (7/53)	0

N.S.

NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LÍQUIDO FOLICULAR DE CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE. COMPARACIÓN ENTRE PROTOCOLO CON AGONISTA LARGO Y ANTAGONISTA (Tabla X)

Al realizar el estudio comparativo entre los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de folículos con ovocito maduro procedentes de pacientes sometidas a DFM con protocolo de agonista largo para ICSI y en líquido folicular de folículos con ovocito maduro procedentes de pacientes sometidas igualmente a DFM para ICSI con protocolo de antagonista, no se encuentran diferencias significativas en ninguna de las hormonas evaluadas.

Estradiol, progesterona, testosterona, ofrecen unos niveles en líquido folicular muy semejantes en ambos grupos de pacientes. Igualmente, los rangos de valores máximos y mínimos para cada hormona también son similares entre ambos grupos de pacientes.

Tabla X: Niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre protocolo con agonista largo y antagonista.

HORMONAS ESTEROIDAS	AGONISTAS (n=53)	ANTAGONISTAS (n=38)
Estradiol pg/mL	554.763 ± 326.778 (76.200 – 1.431.200)	445.357 ± 245.010 (5.496 – 1.462.000)
Progesterona ng/mL	12.992 ± 4.622 (1.424 -28.040)	12.502 ± 4.927 (816-22.124)
Testosterona ng/mL	5,2 ± 1,5 (1,8-12,4)	5,1 ± 1,1 (2,6-8,9)

N.S.

NIVELES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LÍQUIDO FOLICULAR DE CICLOS DE DFM. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN Y RESULTADO FINAL (EMBARAZO O NO) (tabla XI)

Al realizar el estudio comparativo entre los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de folículos con ovocito maduro procedentes de pacientes sometidas a DFM con protocolo de agonista largo para ICSI y que quedaron embarazadas y en líquido folicular de folículos con ovocito maduro procedentes de pacientes sometidas igualmente a DFM para ICSI con protocolo de antagonista y que quedaron embarazadas, no se encuentran diferencias significativas en ninguna de las hormonas evaluadas. Tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas si comparamos ambos protocolos de estimulación en las pacientes que no quedaron embarazadas.

Estradiol, progesterona, testosterona, ofrecen unos niveles en líquido folicular muy semejantes en los diferentes grupos de pacientes. Igualmente, los rangos de valores máximos y mínimos para cada hormona también son similares en los diferentes grupos de pacientes.

Tabla XI: Niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no).

HORMONAS ESTEROIDEAS	AGONISTAS		ANTAGONISTAS	
	Gestaciones (n=15)	No gestaciones (n=38)	Gestaciones (n=6)	No gestaciones (n=32)
Estradiol pg/mL	494.334 ± 299.552 (95240 – 1181600)	577.629 ± 337.566 (76200 - 1431200)	431.960 ± 208.392 (289520 -446520)	438.466 ± 263.403 (5496 - 1462000)
Progesterona ng/mL	13.517 ± 4.620 (2700-21180)	12.794 ± 4.671 (1424-28040)	11.591 ± 5.351 (4612- 19280)	12.573 ± 5.200 (816- 22124)
Testosterona ng/mL	5,0 ± 1,0 (3,8 - 7,6)	5,2 ± 1,7 (1,8 - 12,4)	4,2 ± 1,2 (2,6 -5,3)	5,4 ± 1,0 (3,9 - 8,9)

N.S.

NIVELES DE HORMONAS PROTEICAS EN LÍQUIDO FOLICULAR DE CICLOS DE DESARROLLO FOLICULAR MÚLTIPLE. COMPARACIÓN ENTRE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (Tabla XII)

Tampoco encontramos diferencias significativas al comparar los niveles de distintas hormonas proteicas en el líquido folicular de folículos con ovocito maduro procedentes de pacientes sometidas a DFM con protocolo de agonista largo y pacientes sometidas a DFM para ICSI con protocolo de antagonistas.

FSH y LH presentan en ambos grupos de pacientes niveles en LF comparables, tanto en sus valores medios como en los rangos de máximos y mínimos.

Tabla XII: Niveles de hormonas proteicas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre agonistas y antagonistas.

HORMONAS PROTEICAS	AGONISTAS (n=53)	ANTAGONISTAS (n=38)
FSH mUI/mL	$4,4 \pm 3,6$ (0,5 -15,1)	$3,7 \pm 2,4$ (0,8 -10,3)
LH mUI/mL	$0,2 \pm 0,2$ (0,1 -1,6)	$0,5 \pm 0,5$ (0,1 -2,1)
PRL ng/mL	$55,9 \pm 25,9$ (22,5-144,8)	$44,4 \pm 15,0$ (22,5-93,5)

N.S.

NIVELES DE HORMONAS PROTEICAS EN LÍQUIDO FOLICULAR DE CICLOS DE DFM. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN Y RESULTADO FINAL (EMBARAZO O NO) (tabla XIII)

No encontramos diferencias significativas al comparar los niveles de distintas hormonas proteicas en el líquido folicular de folículos con ovocito maduro procedentes de pacientes sometidas a DFM con protocolo de agonista largo y que quedaron embarazadas y pacientes sometidas a DFM para ICSI con protocolo de antagonistas y que quedaron embarazadas. Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos de pacientes que no quedaron embarazadas y que recibieron uno u otro protocolo de estimulación.

FSH y LH presentan en los diferentes grupos de pacientes niveles en LF comparables, tanto en sus valores medios como en los rangos de máximos y mínimos.

Tabla XIII: Niveles de hormonas proteicas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no).

HORMONAS PROTEICAS	AGONISTAS		ANTAGONISTAS	
	Gestaciones (n=15)	No gestaciones (n=38)	Gestaciones (n=6)	No gestaciones (n=32)
FSH mUI/mL	5,7 ± 5,5 (1,5 – 14,5)	4,0 ± 3,4 (0,5 – 15,1)	2,8 ± 1,9 (1,1 – 6,6)	4,0 ± 2,6 (0,8– 10,3)
LH mUI/mL	0,2 ± 0,1 (0,1-0,5)	0,2 ± 0,2 (0,1-1,6)	0,8 ± 0,4 (0,2-1,5)	0,4 ± 0,4 (0,1-2,1)
PRL ng/mL	53,0 ± 29,1 (29,0-136,4)	57,1 ± 24,8 (22,5-144,8)	43,9 ± 15,1 (25,2-70,4)	44,9 ± 15,2 (22,5-93,5)

N.S.

DISCUSIÓN

La esterilidad se define como la incapacidad para concebir tras un año de relaciones sexuales sin uso de anticoncepción. Afecta aproximadamente a un 15-20% de las parejas en edad fértil (Vanrell, 1999), estimándose que en España afecta a unas 600.000 parejas. La introducción de las técnicas de reproducción asistida ha aumentado las posibilidades de tratamiento efectivo, convirtiéndose en una opción fundamental para las parejas estériles. Se define como reproducción asistida al empleo de tecnología altamente especializada que sustituye al contacto sexual para que la fecundación ocurra. No está indicada en todos los casos de esterilidad, ni constituye la solución a todos los problemas de la misma, pero permite la obtención de embarazo en casos considerados previamente como intratables, y sus indicaciones y aceptación son cada vez mayores, por lo que se utiliza con mayor frecuencia. Su empleo ha permitido profundizar en el conocimiento de fenómenos naturales como la foliculogénesis, ovulación, fecundación, función del cuerpo lúteo, implantación, etc, y mejorar los métodos tradicionales de tratamiento (Speroff et al., 2000).

Para llevar a cabo las técnicas de reproducción asistida de FIV o ICSI es necesario el uso de un tratamiento de estimulación de la ovulación en la mujer que consiga un desarrollo folicular múltiple que permita la obtención de un mayor número de ovocitos en estadios madurativos apropiados para ser fecundados. Dichos protocolos de estimulación presentaron desde su inicio picos prematuros de LH, los cuales provocaban la "luteinización" prematura, conduciendo a la cancelación ó fracaso de los ciclos de tratamiento de reproducción asistida. Hasta un 25% de los ciclos se cancelaban antes del proceso de la recuperación ovocitaria por este motivo (Loumaye et al., 1990).

A mediados de los 80 se desarrollaron protocolos de estimulación de la ovulación que evitaban este inconveniente. Se basaban en el trabajo pionero de Fleming et al. (1982) utilizando agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para inducir la insensibilización de las células gonadotropas (Porter et al., 1984; Fleming et al., 1985). El régimen ha tenido mucho éxito y se ha convertido en el tratamiento estándar para la mayoría de

los ciclos de reproducción asistida (Hughes et al., 1992). Aunque muy efectivo, el tratamiento con agonistas de GnRH sin embargo tiene varios inconvenientes.

En primer lugar, debe administrarse con antelación a la estimulación para evitar la fase de “flare-up” que puede durar desde unos pocos días a una semana; segundo, cuando la desensibilización se obtiene las concentraciones de estradiol en suero son muy bajas y los síntomas menopáusicos frecuentes; y tercero, si no se usa una preparación depot, el agonista de la GnRH debe administrarse diariamente durante 2-4 semanas.

Lo anterior, ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos que no presenten dichos inconvenientes, utilizándose los antagonistas de la GnRH. Estos proporcionan una inmediata supresión de la secreción de LH, por lo que se administran unos días antes de la administración de la gonadotropina corionica humana (hCG) (Frydman et al., 1992; Reismann et al., 2000; Huirne and Lambalk, 2001). Además, la dosis acumulativa de gonadotropinas y la incidencia del síndrome de la hiperestimulación ovárica se reduce cuando se comparan ciclos con antagonistas con ciclos de agonistas de la GnRH (Albano et al., 2000; Borm and Mannaerts, 2000; Chililik and Acosta, 2001; Felderbaum and Diedrich, 2002; Howles, 2002).

Existen actualmente dos antagonistas de GnRH, cetrorelix (Cetrotide; Serono Laboratorios SA, Aubonne, Switzerland) y ganirelix (Orgalutran; Organon Laboratorios, Oss, The Netherlands), habiéndose comprobado que son efectivos y seguros, estando disponibles para uso clínico en varios países, incluyendo la Unión Europea y USA (Albano et al., 2000; Borm and Mannaerts, 2000; Felberbaum et al., 2000; Olivennes et al., 2000; European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001; Ludwing et al., 2001).

Tras los primeros estudios Fase I y II, que demuestran la eficacia y la seguridad de los antagonistas de la GnRH empleados para la prevención del pico de LH, surgen los primeros trabajos fase III que intentan comparar la eficacia entre los dos protocolos: agonistas y antagonistas. Los primeros fueron

los de Albano y Olivenness en el 2000. Siguen los tres grandes estudios multicéntricos: el primero que fue el Europeo de Mannaerts y Borm (2000), el segundo, el norteamericano de Fluker (2001) y el tercero, el de Europa/Oriente medio de Felberbaum y cols. en el 2001.

En estos estudios además de corroborar su seguridad y eficacia, se demuestra que con los antagonistas se requieren menos dosis de gonadotropinas, menos días de estimulación y existe menos riesgo de hiperestimulación. Los resultados medios en cuanto a la duración del tratamiento fueron de 3 semanas menos con antagonista, con una media de 1,5 días menos de estimulación, y 300 UI menos de FSH empleadas (European Orgalutran Study Group, 2000). A pesar de mostrar menor número de ovocitos y embriones, las tasas de gestación e implantación, aunque ligeramente inferiores, no muestran diferencias estadísticamente significativas. Los niveles de estradiol fueron significativamente inferiores, con la aparición de menos folículos pequeños. Hay que recalcar, que si seguimos su cronología los porcentajes de embarazo fueron mejorando en el tiempo, y que dentro del estudio europeo, que fue el que registró tasas más bajas, si consideramos los grupos con experiencia previa en el manejo de antagonistas la tasa de embarazo fue mayor con los antagonistas (24% frente a 23,6%); no ocurrió lo mismo con los centros sin experiencia en los que esta tasa fue sensiblemente superior con los agonistas (27% frente al 16%). Esto explicaría las diferencias encontradas, así como la necesidad de pasar por una curva de aprendizaje. Por otra parte la rigidez en el día de inicio y en las pautas de inhibición y estimulación en este tipo de estudios fase III podrían ser los responsables de esta tendencia a la baja para los antagonistas.

Con posterioridad aparecen dos metaanálisis, que pretenden a través de la agrupación de trabajos con una similar metodología y un correcto desarrollo, constatar los dos puntos más debatidos de los antagonistas que son básicamente la tasa de embarazos y la seguridad en cuanto a riesgo de hiperestimulación ovárica. Uno de ellos (Al-Inany and Alboulgar., 2002), encargado por la prestigiosa librería Cochrane, analiza conjuntamente estos 5 estudios en fase III que hemos mencionado y aprecia diferencias ya

significativas en la tasa de embarazos a favor de los agonistas, no encontrando menor tasa de hiperestimulación ovárica con los antagonistas. En este estudio, el poder estadístico estaba dominado por los tres estudios multicéntricos que empleaban ganirelix, y concretamente por el europeo que es el que más casos aporta (399 casos), que fue el primero y el de resultados más desfavorables para los antagonistas.

El segundo metaanálisis es publicado por Ludwing (Ludwing et al., 2001) estudiando por separado los ciclos realizados con ganirelix y cetrorelix. En principio, cuando calcula la ODS ratio para las tasas de embarazo entre agonistas y antagonistas, el resultado no es significativo, pero vuelve a mostrar una tendencia a favor de los agonistas. Sin embargo, al analizar por separado los dos antagonistas que existen comercializados, con cetrorelix se obtiene una OR no significativa, mientras que con ganirelix, si se obtiene una relación claramente desfavorable (0,76). Respecto al posible papel protector de los antagonistas en el desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica, los hallazgos vuelven a ser similares. En conjunto los antagonistas demuestran una tendencia no significativa a disminuir este síndrome.

Como vemos, los resultados son controvertidos, ya que los trabajos no son realmente homogéneos para poder ser comparados. Unos emplean como agonista leuprolide, otros tryptorelina y otros buserelina, y por otro lado unos estimulan solo con FSH-r (los tres grandes multicéntricos junto con ganirelix), otros con HMG y otros con pautas combinadas. Con estas diferencias metodológicas es imposible sacar conclusiones sólidas.

Estos estudios y discusiones que siguieron tras su publicación han sido revisados (Olivennes et al., 2002) y se concluyó que era necesario realizar más estudios controlados aleatorizados antes de poder establecer unas conclusiones válidas.

Entre los factores que pueden estar implicados en las variaciones comentadas se encuentran: diferente calidad folicular o variaciones en la receptividad endometrial. Se ha descrito que la receptividad endometrial y la

implantación se encuentran alteradas, sobre todo en los ciclos donde la hiperestimulación ovárica consigue elevadas concentraciones de estradiol y progesterona (Burns et al., 1994). La elevación prematura de los niveles de progesterona el día de la administración de hCG observada en algunas pacientes sometidas a desarrollo folicular múltiple es un punto de discusión pues mientras algunos autores lo relacionan con reducción de la tasa de gestación (Silveberg et al., 1994), hay quienes no encuentran diferencias significativas (Hoffman et al., 1996) y otros hablan de que, al contrario, la prematura luteinización con elevación de progesterona en suero podría ser un parámetro de éxito en un ciclo de desarrollo folicular múltiple con fecundación “in vitro” y posterior transferencia embrionaria (Doldi et al., 1999). Venetis et al. (2007) han realizado recientemente una revisión sistemática y metaanálisis que incluye 12 estudios concluyendo que no existe una relación estadísticamente significativa entre la elevación de progesterona y las tasas de embarazo.

Respecto a la calidad folicular, comentar que para que tenga lugar un adecuado desarrollo folicular y esteroidogénesis, es necesaria la presencia de distintos esteroides, péptidos, polipéptidos y factores de crecimiento que medien o potencien la acción de las gonadotropinas a nivel folicular. Nuestro grupo demostró la importancia en la calidad folicular tras desarrollo folicular múltiple de los niveles intrafolículos de hormonas esteroideas (Jimena et al., 1992a), cortisol (Jimena et al., 1992b), CA125 (Jimena et al., 1993) e insulina y factor de crecimiento insulín-like (IGF-I) (Jimena et al., 1992a). Son escasos los estudios que han analizado la calidad folicular de los folículos obtenidos con ambos regímenes de estimulación de la ovulación. Se ha sugerido que pacientes estimuladas con antagonistas presentan niveles de esteroides y factores de crecimiento distintos a las estimuladas con agonistas (García-Velasco et al., 2001). Por otro lado, las células de la granulosa procedentes de pacientes estimuladas con antagonistas difieren funcionalmente de las que provienen de folículos estimulados con agonistas (Minaretzis et al., 1995), no estando claro si la calidad folicular que se obtiene con estos protocolos de estimulación es similar o diferente.

Por todo ello, el objetivo de nuestro estudio fue comparar los resultados clínicos y de calidad folicular, obtenidos en los ciclos de ICSI mediante estimulación ovárica con el tratamiento de antagonista de la GnRH (cetorelix o ganirelix) versus el habitual de agonistas de la GnRH (acetato de leuprorelina) mediante protocolo largo. El estudio de distintos parámetros clínicos y de laboratorio de FIV, y el análisis del líquido folicular, nos va a aportar nuevos datos que ayuden al tratamiento de la esterilidad.

A. ASPECTOS CLÍNICOS

En primer lugar, coincidiendo con lo descrito en la literatura (Albano et al., 2000; European Orgalutran Study Group, 2000; European-Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001; Olivennes et al., 2000) hemos observado una menor duración de la estimulación con FSHr en el grupo de pacientes que recibieron el protocolo de antagonistas de la GnRH (tabla II), con una diferencia estadísticamente significativa; observamos menores dosis de FSHr total administrada en el grupo de los antagonistas, sin llegar a ser esta diferencia estadísticamente significativa.

Aunque sin llegar a la significación estadística, hemos observado niveles séricos de estradiol el día de la administración de la hCG mas elevados en el grupo de pacientes que recibieron el protocolo largo con agonistas de la GnRH, coincidiendo igualmente con lo descrito hasta ahora en la literatura (Albano et al., 2000; European Orgalutran Study Group, 2000; European-Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001; Olivennes et al., 2000; Ludwing et al., 2000; Al-Inany and Aboulghar, 2002). Los antagonistas de la GnRH parecen inducir un patrón de crecimiento folicular y maduración ovocitaria diferente. Estudios previos (Albano et al., 2000; Ludwing et al., 2000; The European Orgalutran Study Group et al., 2000) sugieren que los antagonistas dan lugar a un patrón diferente de crecimiento folicular, con menos folículos pequeños en comparación con los agonistas y por tanto un menor nivel de estradiol, aunque sin llegar esto a afectar el desarrollo folicular.

En lo que respecta al objetivo principal del uso de antagonistas, que es evitar la aparición de un pico prematuro de LH, nuestro estudio viene a apoyar lo que otros muchos ya han aportado (Al-Inany and Aboulghar, 2002), y es la falta de diferencias en cuanto a la capacidad de prevención del pico prematuro de LH entre los antagonistas y los agonistas de la GnRH, ya que no se llegó a cancelar ningún ciclo por este motivo en ninguno de los dos grupos.

B. CALIDAD EMBRIONARIA Y TASAS DE GESTACIÓN

No encontramos diferencias entre las pacientes que recibieron protocolo largo con agonistas de la GnRH y las pacientes que recibieron antagonistas de la GnRH al analizar el número de folículos > 17 mm., de ovocitos recuperados y de metafases II en ambos grupos de pacientes. Tampoco encontramos diferencias al analizar la calidad de los embriones obtenidos y su velocidad de división (tabla III), coincidiendo con lo descrito en la literatura (Albano et al., 2000; European Orgalutran Study Group, 2000; European-Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001; Olivennes et al., 2000). Después de transferir un número similar de embriones en ambos grupos, el porcentaje de embriones no transferidos que alcanzaron un desarrollo hasta blastocisto fue también equivalente. Todo esto nos hace pensar que los ovocitos conseguidos tras DFM en pacientes que reciben protocolo largo con agonistas de la GnRH y que se fecundan, son de buena calidad y tienen un potencial de desarrollo comparable al de pacientes que reciben protocolo con antagonistas de la GnRH.

Esta idea es reforzada por el hecho de no existir diferencias significativas al comparar las tasas de gestación entre ambos grupos (tabla VII) coincidiendo con los hallazgos de otros autores (Albano et al., 2000; European Orgalutran Study Group, 2000; European-Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001; Olivennes et al., 2000). Tampoco encontramos diferencias significativas en la tasa de implantación ni en el porcentaje de embarazos múltiples entre ambos grupos (tabla VII).

No obstante, en general existe una tendencia a una menor tasa de embarazos en las pacientes que reciben protocolo con antagonistas, descrita ya en estudios previos (Albano et al., 2000; European Orgalutran Study Group, 2000; European-Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Fluker et al., 2001; Olivennes et al., 2000). Se ha responsabilizado esta leve disminución de la tasa de embarazos a efectos indeseables directos del antagonista sobre tejidos extrahipofisarios como el folículo, el ovocito, las trompas o el endometrio. Estos potenciales efectos solo se han demostrado *in vitro* y con dosis altas de antagonista. Kol y col. (1999) demostraron que la disminución de la tasa de implantación tras una dosis alta de ganirelix en un protocolo de dosis múltiple, que fue descrito en ciclos en fresco (The ganirelix dose-finding study group, 1998), no se observaba en ciclos de criopreservación. Esto también demuestra que, en caso de haber algún efecto, no parece afectar a la supervivencia ni al potencial desarrollo de ovocitos y embriones.

En programas de donación de ovocitos, los resultados obtenidos con embriones provenientes de ciclos de antagonista son similares a los obtenidos cuando los ovocitos provienen de ciclos de agonista (Bodri et al, 2006). El hecho de que embriones que se han obtenido tras el uso de antagonistas de la GnRH durante la estimulación, al ser transferidos a endometrios formados mediante terapia hormonal sustitutiva no modifiquen las tasas de gestación en receptoras de ovocitos, debe hacernos pensar que quizá, en el resto de las pacientes, las alteraciones séricas que este tipo de fármacos produce o el fármaco por si mismo actúan de forma deletérea sobre el endometrio y ésta sea la causa de la menor tasa de gestación existente. Los estudios publicados hasta ahora muestran resultados contradictorios. Así Kolibianakis y colaboradores (2002) en un estudio prospectivo encuentran un mayor grado de madurez histológica endometrial en el momento de la punción ovárica cuanto más tarde se añade el antagonista durante el protocolo de hiperestimulación ovárica controlada. Por el contrario Saadat y colaboradores (2004) no encuentran diferencia alguna en la madurez endometrial en el momento de la punción ovárica entre dos grupos de donantes en cuya hiperestimulación ovárica controlada se usaron agonistas o

antagonistas de la GnRh. Deben plantearse nuevos estudios de receptividad endometrial que aclaren la influencia del antagonista sobre el endometrio.

C. CALIDAD FOLICULAR

Por todas las razones analizadas anteriormente hemos considerado importante estudiar la calidad folicular mediante el análisis de distintas hormonas esteroideas y proteicas en LF en pacientes que recibieron el protocolo largo de agonistas de la GnRH y compararla con sus correspondientes variables en pacientes que recibieron el protocolo con antagonistas de la GnRH.

Debido a que no se obtuvieron líquidos foliculares adecuados para el análisis hormonal en todas las pacientes, analizamos si las variables clínicas eran homogéneas entre las pacientes de ambos protocolos en las que obtuvimos líquidos foliculares adecuados para el estudio hormonal, obteniendo que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tiempo de estimulación, dosis de FSHr total administrada ni en los niveles de estradiol sérico de las pacientes que recibieron protocolo largo de agonistas de la GnRH y cuyos líquidos fueron analizados, comparadas con las que recibieron protocolo de antagonistas de la GnRH y cuyos líquidos foliculares fueron analizados (tabla IX).

C.1 Estradiol

Como hemos comentado anteriormente, se ha descrito una estrecha relación entre composición del líquido folicular y la calidad folicular (Molina, 1990; Jimena, 1993). Dentro de las hormonas esteroideas fundamentales en la fisiología folicular se encuentra el estradiol. Resultados obtenidos previamente por distintos autores (Thibault, 1977; Entman et al., 1987; Lee et al., 1987; Wransby et al., 1981; Fishel et al., 1983; Imoedenhe y Sigue, 1988; Liu et al., 1986; Tarlatzis et al., 1993; Suchanek et al., 1994; Driancourt y Thuel, 1998; Teissier et al., 2000) entre los que nos encontramos (Molina, 1990; Montero et

al., 1990; Jimena, 1993) han determinado la capacidad de los niveles de estradiol para predecir la madurez y fecundabilidad del ovocito correspondiente. Hay incluso otros autores que relacionan la capacidad de síntesis de estradiol por las células del cúmulo cultivadas con el resultado de las técnicas de reproducción asistida, siendo la concentración de estradiol significativamente mayor en los casos en los que se consigue embarazo (Gregory, 1998).

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, en los niveles de estradiol en LF de folículos con ovocitos maduros procedentes de mujeres que recibieron protocolo de antagonistas de la GnRH en comparación con las que recibieron el protocolo largo de agonistas de la GnRH, resultado que coincide con el descrito por Fornaro et al. (2007). Tampoco hemos hallado diferencias en el análisis de dicho líquido entre pacientes que quedaron gestantes versus no embarazadas. García-Velasco et al. (2001) encontró valores séricos y foliculares de estradiol significativamente más bajos en el grupo tratado con antagonistas sugiriendo un posible papel directo de estos fármacos en la producción de estradiol en el ovario, aunque sin llegar a afectar el desarrollo folicular. Ese estudio admite limitaciones; en primer lugar, es un estudio observacional, no randomizado, a diferencia de nuestro estudio que es randomizado y tiene una mayor potencia (el doble de casos) y en segundo lugar, utiliza dos regímenes diferentes de estimulación con FSH en ambos grupos; el grupo de antagonistas de la GnRH recibió inicialmente menos dosis, lo cual, como señala Blumenfeld (2002), se puede relacionar con la concentración de estradiol folicular y podría condicionar la diferencia en concentración de estradiol en líquido folicular hallada en dicho trabajo lo que puede explicar la discrepancia con nuestros resultados. Por otra parte, al analizar el resto de resultados obtenidos por García-Velasco et al. (2001) observamos como éstos son superponibles, excepto en el número de ovocitos recuperados en el grupo tratado con análogos de la GnRH donde dicho número duplica llamativamente al que nosotros obtenemos, existiendo una gran disparidad con el valor de la misma variable en el grupo de antagonistas de la GnRH. Son las variables estradiol sérico y folicular del estudio de García-Velasco et al. (2001) las que difieren sustancialmente de nuestros resultados y permiten a dichos autores encontrar diferencias significativas. Esto,

probablemente ocurrió porque el grupo de pacientes del estudio de García-Velasco no tenía las mismas características basales que nuestra cohorte. Probablemente el pool de líquido folicular obtenido tras una estimulación que ha desarrollado de media 16 ovocitos tenga concentraciones de estradiol sérico y folicular mayores que si el número de ovocitos es menor.

C.2 Progesterona

Nuestros resultados indican que los niveles de progesterona de folículos con ovocitos maduros tras DFM en mujeres que recibieron protocolo largo de agonistas de la GnRH son similares a los observados en mujeres que recibieron protocolo de antagonistas de la GnRH en iguales circunstancias.

Se ha descrito una relación directa entre los niveles de progesterona en LF, la madurez del ovocito correspondiente (Kreiner et al., 1987; Entman et al., 1987; Droesh et al., 1988; Botero-Ruiz et al., 1984; Liu et al., 1986; Lee et al., 1987; Reinthaller et al., 1987; Stone et al., 1988; Inaudi et al., 1995; Andreani et al., 1997; Teissier et al., 2000) y la fecundación de éste (Molina, 1990; Montero et al., 1990; Jimena, 1993; Wransby et al., 1981; Fishel et al., 1983; Ben-rafael et al., 1987; Reinthaller et al., 1987; Franchimont et al., 1989; Mendoza et al., 1999; Teissier et al., 2000). Incluso hay autores que han descrito una relación entre dichas concentraciones y la tasa de división embrionaria (Ben-rafael et al., 1987) o la tasa de gestación (Basuray et al., 1988).

Como vemos, la producción de progesterona se encuentra directamente relacionada con el estado funcional del ovocito, siendo sus concentraciones un factor predictivo importante del desarrollo folicular, maduración ovocitaria, y por tanto, de calidad folicular (Hsu y Hsueh, 1997).

La comentada disminución de LH a nivel sérico que provocan los antagonistas podría traducirse en unos niveles inferiores de progesterona a nivel folicular en pacientes tratadas con estos fármacos, circunstancia que nuestro estudio demuestra que no ocurre al igual que otros autores, como Minaretzis et al. (1995a), que observaron niveles de progesterona en líquido folicular similares en ambos grupos, sugiriendo que la administración in vivo de agonistas de la GnRH y antagonistas de la GnRH parece tener efectos similares

sobre la producción de progesterona. La normalidad de su concentración en folículos con ovocitos maduros de mujeres que recibieron protocolo largo de agonistas de la GnRH así como las que recibieron protocolo de antagonistas de la GnRH, indica que estos folículos tiene una calidad similar.

En una reciente revisión Cochrane publicada (Mochtar et al, 2007), la adición de LH a los protocolos de estimulación no ha demostrado aumentar la tasa de embarazo en FIV/ICSI. Esta conclusión se repite al analizar específicamente el subgrupo en el que la estimulación se realizó con antagonistas de la GnRH, lo cual parece sugerir que la mencionada disminución de LH no modifica negativamente las tasas de embarazo.

Al igual que nosotros Velasco et al. (2001) tampoco aprecia diferencias significativas en los niveles de progesterona según la pauta administrada, si bien refiere menores niveles de progesterona en las pacientes que recibieron protocolo de antagonistas de la GnRH en comparación con las pacientes que recibieron protocolo de agonistas de la GnRH. Este resultado apoyaba un estudio previo que sugería un mejor desarrollo de los ovocitos que provenían de folículos con altos niveles de progesterona (Mendoza et al., 1999). Sin embargo nuestros resultados no apoyan esta sugerencia al no encontrar diferencias en los niveles de progesterona en líquido folicular entre las pacientes que recibieron ambos protocolos y quedaron embarazadas.

C.3 Testosterona

Unos niveles bajos de testosterona en LF se han asociado con una correcta maduración (Driancourt y Thuel, 1998; Teissier et al., 2000) y fecundabilidad ovocitaria (Jimena, 1993; Botero-Ruiz et al., 1984; Uehara et al., 1985; Teissier et al., 2000). Previamente otros estudios publicados describen niveles de testosterona en LF disminuidos en ciclos estimulados en comparación con ciclos naturales (Enien et al., 1995). También se han relacionado niveles elevados de testosterona en LF con el incremento de anomalías ovocitarias (De Sutter et al., 1991; Uehara et al., 1985).

Nuestros resultados indican que los niveles de testosterona de folículos con ovocitos maduros tras DFM en mujeres que recibieron protocolo largo de

agonistas de la GnRH son similares a los observados en mujeres que recibieron protocolo de antagonistas de la GnRH en iguales circunstancias, lo que coincide con lo descrito anteriormente en la literatura (Garcia-Velasco et al., 2001). Igualmente no encontramos diferencias en los niveles de testosterona entre las pacientes que quedaron embarazadas y las pacientes que no quedaron embarazadas.

C.4 Hormonas hipofisarias

Con relación a los niveles de hormonas hipofisarias en LF, se ha demostrado un aumento significativo de los niveles de LH en los folículos cuyos ovocitos se fecundaban (Jimena, 1993), así como una relación positiva entre dichos niveles y las tasas de fecundación y gestación (Imoedenhe y Sigue, 1988). Por tanto, los niveles de LH en LF serían capaces de predecir la calidad folicular, señalando la exposición adecuada del folículo preovulatorio a la LH para la reanudación de la meiosis.

La FSH en LF no diferencia los ovocitos capaces de fecundar de aquellos que no se fecundan en ciclos estimulados con citrato de clomifeno/hMG (Stone et al., 1988; Molina, 1990), sin embargo, Laufer et al. (1984) encontraron en ciclos estimulados con hMG/hCG niveles de FSH mayores en LF de ovocitos que se fecundaban que en los que no lo hacían.

Lindner et al. (1988) refieren niveles significativamente más elevados de Prolactina en LF correspondientes a ovocitos fecundados que en aquellos asociados a ovocitos no fecundados, concluyendo que dicha hormona puede ser un parámetro adicional de calidad folicular en LF. Sin embargo, nuestro grupo (Molina, 1990) no observó relación entre la prolactina presente en LF y el resultado de la fecundación *in vitro*.

Como vemos existen grandes discrepancias sobre el valor de los niveles de hormonas hipofisarias y la calidad ovocitaria o la posibilidad de gestación.

Nuestros resultados indican que los niveles de hormonas hipofisarias de folículos con ovocitos maduros tras DFM en mujeres que recibieron el protocolo largo con agonistas de la GnRH son similares a los observados en mujeres que recibieron el protocolo con antagonistas en iguales circunstancias. Tampoco

encontramos diferencias en los niveles de hormonas hipofisarias entre las pacientes que quedaron embarazadas y las pacientes que no quedaron embarazadas en ambos protocolos.

Según lo estudiado hasta ahora pensamos que el ambiente endocrino de los folículos que llegan a madurar tras DFM en mujeres que reciben protocolo largo de agonistas de la GnRH así como las que reciben protocolo de antagonistas de la GnRH es similar.

CONCLUSIONES

1. Los antagonistas de la GnRH son eficaces para prevenir picos de LH y mantienen tasas adecuadas de gestación.

2. Su tolerancia y aceptabilidad es buena, con menos días de estimulación. El periodo total de estimulación es más corto que con el protocolo largo de agonistas de la GnRH, lo que hace que el procedimiento sea más fácil de aceptar por las pacientes.

3. Los embriones obtenidos en ambos grupos parecen de similar calidad, tanto en su desarrollo "in vitro" cómo en su capacidad para conseguir gestaciones.

4. El ambiente hormonal de los folículos obtenidos tras DFM mediante protocolo de antagonistas de la GnRH es similar al existente tras protocolo largo de agonistas de la GnRH, no alterándose la calidad ovocitaria y por tanto, la calidad embrionaria.

5. Creemos por tanto que es necesario plantear estudios de receptividad endometrial que aclaren si la tendencia a una menor tasa de embarazo en las pacientes que reciben protocolo de antagonistas se debe a una posible influencia negativa del antagonista sobre el endometrio.

BIBLIOGRAFÍA

Aboulghar M, Evers JH, Al-Inany H. Intra-venous albumin for preventing severe ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(2):CD001302. Review.

Abuzeid MI, Sasy MA. Elevated progesterone levels in the late follicular phase do not predict success of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1996; 65:981-5.

Acien P, Burford G, Irvine L, Shaw RW. CA-125 en fisiología y patología benigna y maligna ginecológica: Revisión de la literatura y aportación de resultados propios. *Rev Esp Obst* 1988; 47: 425-52.

Akande VA, Fleming CF, Hunt LP, Keay SD, Jenkins JM. Biological versus chronological ageing of oocytes, distinguishable by raised FSH levels in relation to the success of IVF treatment. *Hum Reprod* 2002; 17:2003-8.

Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M. Addition of GnRH antagonist in cycles of poor responders undergoing IVF. *Hum Reprod* 2000; 15:2145-7.

Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M. Comparison of agonistic flare-up-protocol and antagonistic multiple dose protocol in ovarian stimulation of poor responders: results of a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2001; 16:868-70.

Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmuller-Winzen H, Engel J, Diedrich K et al. 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, J, Smitz J, Camus M, Riethmüller-Winzen H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997; 67:917-22.

Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17:874-85.

Almog B, Rimon E, Yovel I, Bar-Am A, Amit A, Azem F. Vertebral osteomyelitis: a rare complication of transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval. *Fertil Steril* 2000; 73:1250-2.

Al-Shawaf T, Dave R, Harper J, Linehan D, Riley P, Craft I. Transfer of embryos into the uterus: how much do technical factors affect pregnancy rates? *J Assist Reprod Genet* 1993; 10:31-6.

Al-Shawaf T, Zosmer A, Hussain S, Tozer A, Panay N, Wilson C et al. Prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome in IVF with or without ICSI and embryo transfer: a modified "coasting" strategy based on ultrasound for identification of high-risk patients. *Hum Reprod* 2001; 16:24-30.

Amato G, Izzo A, Tucker A, Bellastella A. Insulin-like growth factor binding protein-3 reduction in follicular fluid in spontaneous and stimulated cycles. *Fertil Steril* 1998; 70:141-4.

Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:1227-34.

Andersen CY. Levels of steroid-binding proteins and steroids in human preovulatory follicle fluid and serum as predictors of success in in vitro fertilization-embryo transfer treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1375-81.

Andreani CL, Diotallevi L, Lazzarin N, Pierro E, Giannini P, Lanzone A, Capitanio P, Mancuso S. The cellular activity of different sized follicles in cycles treated with gonadotrophin-releasing hormone analogue. *Hum Reprod* 1997; 12:89-94.

Antczak M, Van Blerkom J. The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial like cell population. *Hum Reprod* 2000; 15: 2306-18.

Arnot AM, Vandekerckhove P, DeBono MA, Rutherford AJ. Follicular volume and number during in-vitro fertilization: association with oocyte developmental capacity and pregnancy rate. *Human Reprod* 1995; 10:256-61.

Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A et al. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Human Reprod* 1994; 9: 902-6.

Balakier H, Stronell RD. Colour Doppler assessment of folliculogenesis in in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 1994; 62:1211-16.

Balash J, Vidal E, Penarrubia J, Casamitjana R, Carmona F, Creus M et al. Suppression of LH during ovarian stimulation: analysing threshold values and effects on ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod* 2001; 16:1636-43.

Baranao RI, Dain L, Palak de Fried E, Rumi LS. Human granulosa cells express HLA-DR

antigen and are capable of synthesizing interleukin-1. *Horm Metab Res* 1995; 27:495-8.

Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM et al. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995; 10:3243-7.

Barroso G, Oehninger S, Monzo A, Kolm P, Gibbons WE, Muasher SJ. High FSH:LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3: impact on follicular development and IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:499-505.

Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18:258-63.

Basuray R, Sachdeva S, Rawlins RG, Henig I, Sachdeva S, Tummon I et al. High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for in vitro fertilization as a predictor of possible pregnancy. *Fertil Steril* 1988; 49: 1007-11.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996; 11:2217-22.

Bayer SR, Shelton S, Armant D. Spectrophotometric absorbance of follicular fluid: a predictor of oocyte fertilizing capacity. *Fertil Steril* 1988; 49: 442-6.

Becker E Jr., Lev-Toaff AS, Kaufman EP, Halpem EJ, Edelweiss MI, Kurtz AB. The added value of transvaginal sonohysterography over transvaginal sonography alone in women with known or suspected leiomyoma. *J Ultrasound Med* 2002; 21:237-47.

Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Ludwig M, Felberbaum RE, Diedrich K et al. Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4186-92.

Bellin ME, Ax RL, Laufer N, Tarlatzis BC, DeCherney AH, Feldberg D et al. Glycosaminoglycans in follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization and their relationship to cumulus expansion fertilization and development. *Fertil Steril* 1986; 45:244-9.

Bellin ME, Veldhuis JD, Ax RL. Follicular fluid glycosaminoglycans inhibit degradation of low-

density lipoproteins and progesterone production by porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1987; 37:1179-84.

Bennett S, Waterstone J, Parsons J, Creighton S. Two cases of cervical pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer to the lower uterine cavity. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10:100-3.

Bennett SJ, Waterstone JJ, Cheng WC, Parsons J. Complications of transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration: a review of 2670 consecutive procedures. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10:72-7.

Ben-Rafael Z, Meloni F, Srauss JF, Blasco L, Mastroianni L Jr, Flickinger GL. Relationship between polypronuclear fertilization and follicular fluid hormones in gonadotropin-treated women. *Fertil Steril* 1987; 47:284-8.

Berger MA, Laufer N, Lewin A, Navot D, Rabinowitz R, Eisenberg S et al. Cholesterol and steroid levels in human follicular fluids of human menopausal gonadotropin-induced cycles for in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4:30-3.

Bergh C, Hillensjo T, Nilsson L. Sonographic evaluation of the endometrium in in vitro fertilization IVF cycles. A way to predict pregnancy? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 71:624-8.

Berkane N, Bringer J, Hedon B et al. Significance of growth factor (GF) in follicular fluid. Correlation with pregnancy rates. En: VIth World Congress In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, Jerusalem, April 2-7; 1989. p.28.

Blaschuk OW and Farookhi R. Estradiol stimulate cadherin expression in rat granulosa cells. *Dev Biol* 1989; 136: 564-7.

Blumenfeld Z. Confirmation needed for follicular fluid estradiol levels in different ovarian stimulation protocols. *Hum Reprod* 2002; 17:1671.

Bodri D, Vernaev V, Guillen JJ, Vidal R, Figueras F, Coll O. Comparison between a GnRH antagonist and a GnRH agonist flare-up protocol in oocyte donors: a randomized clinical trial. *Hum Reprod* 2006; 21:2246-51.

Borm G, Mannaerts B. Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre

trial. The European Orgalutran Study Group. *Hum Reprod* 2000; 15:1490-8.

Botero-Ruiz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1984; 41: 820-4.

Boundelle M, Aytoz A, Van Assche, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:781-2.

Boundelle M, Desmyttere S, Buysse A, Van Assche E, Schietecatte J, Devroey P et al. Prospective follow-up study of 55 children born after subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9:1765-9.

Boundelle M, Joris H, Hofmans K, Liebaers I, Van Steirteghem A. Mental development of 201 ICSI children at 2 years of age. *Lancet* 1998; 351:1553.

Boundelle M, Legein J, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P et al. Prospective follow-up study of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11:1558-64.

Bourgain C, Smitz J, Camus M, Erard P, Devroey P, Van Steirteghem AC et al. Human endometrial maturation is markedly improved after luteal supplementation of gonadotrophin-releasing hormone analogue/human menopausal gonadotrophin stimulated cycles. *Hum Reprod* 1994; 9:32-40.

Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1998; 351:1529-34.

Branigan EF, Estes MA. Minimal stimulation IVF using clomiphene citrate and oral contraceptive pill pretreatment for LH suppression. *Fertil Steril* 2000; 73:587-90.

Braude P, Rowell P. Assisted conception. III—problems with assisted conception. *Br Med J* 2003; 327:920-3.

Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7:581-90.

Bukulmez O, Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod Update* 2000; 6:1-15.

Burger HG, Igarashi M. Inhibin: definition and nomenclature. *J Clin Endo Metab* 1988; 66:885-6.

Burns WN, Witz CA, Klein NA, Silverberg KM, Schenken RS. Serum progesterone concentrations on the day after human chorionic gonadotropin administration and progesterone/oocyte ratios predict in vitro fertilization/embryo transfer outcome. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11:17-23.

Bushmeyer SM, Bellin ME, Bratmeier SA, Boehm SK, Kabajad CL. Relationship between bovine follicular fluid glycosaminoglycans and steroids. *Endocrinology* 1985; 117: 879-89.

Bustillo M, Stern JJ, Coulam CB. Serum progesterone at the time of human chorionic gonadotrophin does not predict pregnancy in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10:2862-7.

Butler SA. hCG—mass units, molar conversions, and the standardization of biologic units. *Fertil Steril* 2003; 80:1533.

Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Tuomi T, Hovatta O, Sieberg R et al. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3135-9.

Buyalos RP, Daneshmand S, Brzechffa PR. Basal estradiol and follicle-stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. *Fertil Steril* 1997; 68:272-7.

Campbell S, Bourne TH, Waterstone J, Reynolds KM, Crayford TJ, Jurkovic J et al. Transvaginal colour blood flow imaging of the periovulatory follicle. *Fertil Steril* 1993; 60: 433-8.

Campo SM, Rogers PA, Findlay JK. Sex-hormone-binding globulin in human follicular fluid and serum at the time of oocyte recovery. *Reprod Fertil Dev* 1989; 1: 289-97.

Canipari R. Oocyte-granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 279-89.

Carson R, Zhang Z, Hurchinson LA. Growth factor in ovarian function. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 735-52.

Casado M, Egozcue J. Documento sobre donación de ovocitos. Barcelona: Grupo de Opinión del Observatori de Bioètica i Dret-Parc Científic de Barcelona; 2001.

Castilla JA, Clavero A, Expósito A, Expósito AI, Suárez I, Samaniego F. Apoptosis y estrés oxidativo en células de la granulosa de mujeres sometidas a desarrollo folicular múltiple con niveles elevados de FSH sérica basal. *Rev Iber Fert* 2000; 17: 29-36.

Cedars MI, Surey E, Hamilton F, Lapolt P, Meldrum DR. Leuprolide acetate lowers circulating bioactive luteinizing hormone and testosterone concentrations during ovarian stimulation for oocyte retrieval. *Fertil Steril* 1990; 53:627-31.

Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine. 2001 assisted reproductive technology success rates. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA, 2003.

Chang P, Kenley S, Burns T, Denton G, Currie K, DeVane G et al. Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (Ovidrel) to urinary hCG (Profasi) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2001; 76:67-74.

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

Check JH, Nowroozi K, Choe J, Lurie D, Dietterich C. The effect of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in donor oocyte-embryo transfer cycle. *Fertil Steril* 1993; 59:72-5.

Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *New Engl J Med* 1999; 341:1624.

Chillik C, Acosta A. The role of LHRH agonists and antagonists. *Reprod Biomed Online* 2001; 2:120-8.

Chui K, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization program: a preliminary study. *Hum Reprod* 1997; 12: 191-6.

Cioffi JA, Van Blerkom J, Kuijper JL et al. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:467-72.

Claman P, Domingo M, Garner P, Leader A, Spence JEH. Natural cycle in vitro fertilization-embryo transfer at the University of Ottawa: an inefficient therapy for tubal infertility. *Fertil*

Steril 1993; 60:298-302.

Coccia ME, Becattini C, Bracco GL, Scarselli G. Acute abdomen following dermoid cyst rupture during transvaginal ultrasonographically guided retrieval of oocytes. *Hum Reprod* 1996; 11:1897-9

Corfman RS, Milad MP, Bellavance TL, Ory SJ, Erickson LD, Ball GD. A novel ovarian stimulation protocol for use with the assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1993; 60:864-70.

Coreleu B, Barri PN, Carreras O, Martinez F, Parriego M, Hereter L et al. The influence of the depth of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF: a controlled, ultrasound guided-study. *Hum Reprod* 2002; 17: 341-6.

Coreleu B, Barri PN, Carreras O, Martinez F, Veiga A, Balasch J. The usefulness of ultrasound guidance in frozen-thawed embryo transfer: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 2002; 17: 2885-90.

Coreleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Martinez F, Belil I et al. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15:616-20.

Csemiczky G, Harlin J, Fried G. Predictive power of clomiphene citrate challenge test for failure of in vitro fertilization treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:954-61.

Damarío MA, Goudas VT, Session DR, Hammitt DG, Dumesic DA. Crinone 8% vaginal progesterone gel results in lower embryonic implantation efficiency after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1999; 72:830-6.

Daya S. Follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000061, 2000.

Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001299, 2000.

Daya S. Methodologic pitfalls in assessing the efficacy of recombinant follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin in assisted reproduction. *Fertil Steril* 2003; 80:1100-4.

De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschlag E, Holzgreve W, Schneider HP. Prospective evaluation of the Ultrasound appearance of the endometrium in a cohort of 1,186 infertile women. *Fertil Steril* 2000; 73:106-13.

De Jong D, Macklon NS, Eijkemans MJ, Mannaerts BM, Coelingh Bennink HJ, Fauser BC. Dynamics of the development of multiple follicles during ovarian stimulation for in vitro fertilization using recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon) and various doses of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (Orgalutran/Antagon). *Fertil Steril* 2001; 75:688-93

De Los Santos MJ, Anderson DJ, Racowsky C, Remohi J, Pellicer A, Hill JA. Expresión del sistema del Fas/Fas Ligando (Fas-FasL) y de bcl-2 en células y fluidos de ovarios humanos estimulados con gonadotrofinas. *Rev Iber Fert* 2000; 17: 37-42.

De Neubourg D, Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Elseviers M. Single top quality embryo transfer as a model for prediction of early pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2004; 19:1476-9.

De Sutter P, Dhont M, Vanluchene E, Vandekerckhove D. Correlations between follicular fluid steroid analysis and maturity and cytogenetic analysis of human oocytes that remained unfertilized after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991; 55: 958-63.

De Vos A, Van Steirteghem A. Assisted reproduction techniques for male factor infertility: current status of intracytoplasmic sperm injection. En Peter R. Brinsden eds. *A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Second edition. Carnforth, UK: Parthenon Publishing; 1999. p. 219-36.

De Ziegler D, Jaaskelainen AS, Brioschi PA, Fanchin R, Bulletti C. Synchronization of endogenous and exogenous FSH stimuli in controlled ovarian hyperstimulation (COH). *Hum Reprod* 1998; 13:561-4.

Dehennin L, Jondet M, Scholler R. Androgen and 19 norsteroid profiles in human preovulatory follicles from stimulated cycles: an isotope dilution-mass spectrometric study. *J Steroid Biochem* 1987; 26: 399-405.

D'Entremont A. *Diez temas de demografía*, Madrid: Eiuinsa; 2001.

Diamond MP, Hill GA, Webster BW, Herbert CM, Rogers BJ, Osteen KG et al. Comparison of human menopausal gonadotropin, clomiphene citrate, and combined human menopausal gonadotropin-clomiphene citrate stimulation protocols for in vitro fertilization. *Fertil Steril*

1986; 46:1108-12.

Diamond MP, Webster BW, Carr RK, Wentz AC, Osteen KG. Human follicular fluid insulin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 990-2.

Dicker D, Ashkenazi J, Feldberg D, Levy T, Dekel A, Ben-Rafael Z. Severe abdominal complications after transvaginal ultrasonographically guides retrieval of oocytes of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1993 Jun; 59:1313-5.

Dicker D, Goldman JA, Levy T, Feldberg D, Ashkenazi J. The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1992; 57:597-600.

Dickey RP, Olar TT, Curole DN, Taylor SN, Rye PH. Endometrial pattern and thickness associated with pregnancy outcome after assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 1992; 7:418-21.

Dickey RP, Taylor SN, Rye PH, Lu PY. Future use of clomiphene in ovarian stimulation. A role for clomiphene in the 21st century? *Hum Reprod* 1998; 13:2361-2.

Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, al-Hasani S, Reissmann T et al. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994; 9:788-91.

Dimitry ES, Oskarsson T, Conaghan J, Margara R, Winston RM. Beneficial effects of a 24h delay in human chorionic gonadotrophin administration during in-vitro fertilization treatment cycles. *Hum Reprod* 1991; 6:944-6.

Ditkoff EC, Plumb J, Selick A, Sauer MV. Anesthesia practices in the United States common to in vitro fertilization (IVF) centers. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:145-7.

Doldi N, Marsiglio E, Destefani A, Gessi A, Merati G, Ferrari A. Elevated serum progesterone on the day of HCG administration in IVF is associated with a higher pregnancy rate in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1999; 14:601-5.

Dor J, Ben-Shlomo I, Levran D, Rudak E, Yunish M, Mashiach S. The relative success of gonadotropin-releasing hormone analogue, clomiphene citrate, and gonadotropin in 1,099 cycles of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 58:986-90.

Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum Reprod* 1995; 10:2960-4.

Driancourt MA, Thuel B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38: 345-62.

Droesch K, Rosenwaks Z, Fulgham DL, Alexander NJ, Liu AC. Distribution of T cell subsets in follicular fluid. *Fertil Steril* 1988; 83: 599-603.

Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS. The correlation between follicular measurements, oocyte morphology and fertilization rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1995; 64:787-90.

Dumoilin JM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RC, van Wissen LC et al. Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 2001; 16:306-12.

Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignoul-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen JM et al. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000; 15:402-9.

Ectors FJ, Vanderzwalmen P, Van Hoeck J, Nijs M, Verhaegen G, Delvique A et al. Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1997; 12: 2002-5.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984; 1:3-23.

Edwards RG, Lobo R, Bouchard P. Time to revolutionize ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1996; 11:917-9.

Edwards RG. Follicular fluid. *J Reprod Fert* 1974; 37: 189-219.

Egbase PE, Sharhan MA, Grudzinskas JG. Early unilateral follicular aspiration compared with coasting for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 1999; 14: 1421-5.

El-Nemr A, Bhide M, Khalifa Y, Al-Mizyen E, Gillott C, Lower AM et al. Clinical evaluation of three different gonadotrophin-releasing hormone analogues in an IVF programme: a

prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 103:140-5.

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.

Engel JB, Ludwig M, Felberbaum R, Albano C, Devroey P, Diedrich K. Use of Cetrorelix in combination with clomiphene citrate and gonadotrophins: a suitable approach to 'friendly IVF'?. *Hum Reprod* 2002; 17:2022-6.

Engel W, Murphy D, Schmid M. Are there genetic risks associated with microassisted reproduction? *Hum Reprod* 1996; 11:2359-70.

Englert Y, Puissant F, Camus M, Van Hoeck J, Leroy F. Clinical study on embryo transfer after human in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; 3:243-6.

Engmann L, Maconochie N, Tan SL, Bekir J. Trends in the incidence of births and multiple births and the factors that determine the probability of multiple birth after IVF treatment. *Hum Reprod* 2001; 16:2598-605.

Enien WM, el Sahwy S, Harris CP, Seif MW, Elstein M. Human chorionic gonadotrophin and steroid concentrations in follicular fluid: the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and natural in-vitro fertilization cycles. *Human Reprod* 1995; 10: 2840-4.

Entman SS, Maxson WS, Bradley CA, Osteen K, Webster BW, Vallghn WK et al. Follicular fluid transferrin levels in preovulatory human follicles. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4: 98-102.

Esposito MA, Barnhart KT, Coutifaris C, Patrizio P. Role of periovulatory luteinizing hormone concentrations during assisted reproductive technology cycles stimulated exclusively with recombinant follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2001; 75:519-24.

European and Middle East Orgalutran Study Group Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2001; 16, 644-51.

European Society for Human Reproduction and Embryology. Assisted reproduction by intracytoplasmic sperm injection: a survey on the clinical experience in 1994 and the children born after ICSI, carried out until December 1993. *Hum Reprod* 1998; 17:37-46.

Evans MI, Dommergues M, Wapner RJ, Goldberg JD, Lynch L, Zador IE et al. International collaborative experience of 1789 patients having multifetal pregnancy reduction: A plateauing of risk and outcome. *J Soc Gynecol Invest* 1996; 3:23-6.

Fachinetti F, Artini PG, Monaco M, Volpe A, Genazzani AR. Oocytes fertilization in vitro is associated with high follicular immunoreactive beta-endorphin levels. *J Endocrinol Invest* 1989; 12: 693-8.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson J. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7:1342-6.

Fahy UM, Cahill DJ, Wardle PG, Hull MG. In-vitro fertilization in completely natural cycles. *Hum Reprod* 1995; 10:572-5.

Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM, Olivennes F, de Ziegler D, Frydman R. New look at endometrial echogenicity: objective computer-assisted measurements predict endometrial receptivity in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 74:274-81.

Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R. Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. *Fertil Steril* 2003; 79:316-21.

Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Righini C, de Ziegler D, Frydman R. Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2003; 79:585-9.

Fanchin R, de Ziegler D, Taieb J, Hazout A, Frydman R. Premature elevation of plasma progesterone alters pregnancy rates of in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1993; 59:1090-4.

Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Ferreira AL, de Ziegler D, Frydman R. Consequences of premature progesterone elevation on the outcome of in vitro fertilization: insights into a controversy. *Fertil Steril* 1997; 68:799-805.

Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R. Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2003; 18:2698-703.

Fasouliotis SJ, Laufer N, Sabbagh-Ehrlich S, Lewin A, Hurwitz A, Simon A. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-antagonist versus GnRH-agonist in ovarian stimulation of poor responders undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:455-60.

Fateh M, Ben-Rafael Z, Benavida CA, Mastroiani L, Flickinger GL. Cortisol levels in human FF. *Fertil Steril* 1989; 51: 538-41.

Fauser BC, de Jong D, Olivennes F, Wramsby H, Tay C, Itskovitz-Eldor J et al. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:709-15.

Fauser BC. Follicular development and oocyte maturation in hypogonadotrophic women employing recombinant follicle-stimulating hormone: role of oestradiol. *Hum Reprod Update* 1997; 3:101-8.

Felberbaum RE, Albano C, Ludwig M, Riethmuller-Winzen H, Grigat M, Devroey P et al. Ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the GnRH antagonist cetrorelix according to the multiple dose protocol: a prospective uncontrolled phase III study. *Hum Reprod* 2000; 15:1015-20.

Felberbaum R, Diedrich K. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists: will they replace the agonists? *Reprod Biomed Online* 2002; 6:42-53.

Fernandez ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2000; 15:1211-6.

Fernandez H, Coste J, Job-Spira N. Controlled ovarian hyperstimulation as a risk factor for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991; 78:656-9.

Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril* 1999; 71:405-14.

Fisch B, Goldberg I, Ovadia J, Tadir Y. Physicochemical properties of follicular fluid and their relation to in vitro fertilization (IVF) outcome. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1990; 7: 67-73.

Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Rinaldi L. Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). *Hum Reprod* 1991; 6:124-30.

Fishel SB, Edwards RG, Walters DE. Follicular steroids as a prognosticator of successful fertilization of human oocytes in vitro. *J Endocrinol* 1983; 99:335-9.

Fleming R, Adam AH, Barlow DH et al. A new systematic treatment for infertile women with abnormal hormone profiles. *Br J Obst Gyn* 1982; 89:80-3.

Fleming R, Chung CC, Yates RW, Coutts JR. Purified urinary follicle stimulating hormone induces different hormone profiles compared with menotrophin, dependent upon the route of administration and exogenous luteinizing hormone activity. *Hum Reprod* 1996; 11:1854-8.

Fleming R, Haxton MJ, Hamilton MPR, McCune GS, Black WP, Macnaughton MC, Coutts JRT. Successful treatment of infertile women with oligomenorrhea using a combination of an LHRH agonist and exogenous gonadotrophins. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92:369-73.

Fleming R, Rehka P, Deshpande N, Jamieson ME, Yates RW, Lyall H. Suppression of LH during ovarian stimulation: effects differ in cycles stimulated with purified urinary FSH and recombinant FSH. *Hum Reprod* 2000; 15:1440-5.

Fluker M, Grifo J, Leader A, Levy M, Meldrum D, Muasher SJ et al. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 2001; 75:38-45.

Fluker MR, Hooper WM, Yuzpe AA. Withholding gonadotropins ("coasting") to minimize the risk of ovarian hyperstimulation during superovulation and in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1999; 71: 294-301.

Fornaro F, Cobellis L, Mele D, Tassou A, Badolati B, Sorrentino S et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist/recombinant follicle-stimulating hormone versus gonadotropin-releasing hormone antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone on follicular fluid levels of adhesion molecules during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007; 87: 39-47.

Franchimont P, Hazee-Hagelstein MT, Hazout A, Frydman R, Schatz B, Demerlé F. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. I. Sex Steroids. *Fertil Steril* 1989; 52: 1006-11.

Franchimont P, Hazee-Hagelstein MT, Hazout A, Gysen P, Salax-Baroux J, Schatz B et al. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. III. Proteoglycans. *Biol Reprod* 1990; 43: 183-90.

Frattarelli JL, Leondires MP, Miller BT, Segars JH. Intracytoplasmic sperm injection increases embryo fragmentation without affecting clinical outcome. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17:207-12.

Fryman R, Cornel C, De Ziegler D et al., Spontaneous LH surges can be reliably prevented by the timely administration of GnRH antagonist (NAL-GLU) during the late follicular phase. *Hum Reprod* 1992; 7:930-3.

Fujiwara H, Honda T, Ueda M, Nakamura K, Yamada S, Maeda M et al. Laminin supresses progesterone production by human luteinizing granulosa cells via interaction with integrin $\alpha 6\beta 1$. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2122-8.

Fujiwara H, Hueda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Takakura K et al. Human leukocyte antigen-DR is a differentiation antigen for human granulosa cells. *Biol. Reprod* 1993a; 49: 705-15.

Fujiwara H, Maeda M, Ueda M, Fukuoka M, Yasuda K, Imai K et al. A differentiation-related molecule on the cell surface of human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993b; 76: 956-61.

Fujiwara T, Lambert-Messerlian G, Sidis Y, Leykin L, Isaacson K, Toth T et al. Analysis of follicular fluid hormone concentrations and granulosa cell mRNA levels for the inhibin-activin-follistatin system: relation to oocyte and embryo characteristics. *Fertil Steril* 2000; 74: 348-55.

Garcia JE, Padilla SL, Bayati J, Baramki TA. Follicular phase gonadotropin-releasing hormone agonist and human gonadotropins: a better alternative for ovulation induction in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 53:302-5.

Garcia-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.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73:1155-8.

Gardner DK, Pool TB, Lane M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Seminars Reprod Med* 2000; 18:205-18.

Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004; 81:551-3.

Gearon CM, Taylor AS, Forman RG. Factors affecting activation and fertilization of human oocytes following intracytoplasmic injection. *Hum Reprod* 1995; 10:896-902.

Gelety TJ, Pearlstone AC, Surrey ES. Short-term endocrine response to gonadotropin-releasing hormone agonist initiated in the early follicular, midluteal, or late luteal phase in normally cycling women. *Fertil Steril* 1995; 64:1074-80.

Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E, Joostens M, Eestermans W, Ryckaert G. ICSI and severe male-factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. *Hum Reprod* 1995; 10:484-6.

Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12:1635-41.

Givens CR, Schriock ED, Dandekar PV, Martin MC. Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration do not predict outcome in assisted reproductive cycles. *Fertil Steril* 1994; 62:1011-7.

Gocial B, Keye WR, Fein SH, Nardi RV. Subcutaneously administered Reprone in female patients undergoing in vitro fertilization is as effective and well tolerated as intramuscular menotropin treatment. Repronex SC, IVF Study Group. *Fertil Steril* 2000; 74:73-9.

Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Bukovsky I, Caspi E. Diagnostic hysteroscopy: its value in an in-vitro fertilization/embryo transfer unit. *Hum Reprod* 1992; 7: 1433-4.

Gonzales J, Lesourd S, Van Dreden P, Richard P, Lefèbvre G, Vauthier Brouzes D. Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9: 211-6.

Gonzalez M, García A, Nava E, Rosendo J, Gómez E. Modificaciones en los niveles de fosfatasa ácida folicular en relación con la madurez ovular en el humano. *Ginecol Obstet Mex* 1989; 57: 37-40.

Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988; 50:68-73.

Gordon UD, Harrison RF, Fawzy M, Hennelly B, Gordon AC. A randomized prospective assessor-blind evaluation of luteinizing hormone dosage and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2001; 75:324-31.

Gore-Langton RE and Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil E, Neill JD, editores. *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. New York: Raven Press; 1994.

Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994; 50:653-63.

Graigo SD. Multifetal Pregnancy reduction. In Penzias AS ed. *Multiple Pregnancy. Infertility and Reproductive Medicine. Clinics of North America*. 1998. W.B.Saunders Company. Philadelphia.

Gregory L. Ovarian markers of implantation potential in assisted reproduction. *Human Reprod* 1998; 13: 117-32.

Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod* 2000; 15:1592-6.

Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y et al. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 1996; 137: 1938-48.

Hammadeh ME, Braemert B, Altes S, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between ovarian stimulation regimen and cytokine concentration in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome of patients undergoing ICSI program. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43:12-20.

Harada T, Yoshida S, Katagiri C, Takao N, Ikenari T, Toda T et al. Reduced implantation rate associated with a subtle rise in serum progesterone concentration during the follicular phase of cycles stimulated with a combination of a gonadotrophin-releasing hormone agonist and gonadotrophin. *Hum Reprod* 1995; 10:1060-4.

Hardarson T, Lundin K, Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod* 2000; 15:1372-6.

Hargreave TB. Genetics and male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12:207-9.

Harlow CR, Jenkins JM, Winston RML. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. *Fertil Steril* 1997; 68: 48-53.

Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985; 70:11-7.

Hattori N, Ueda M, Fujiwara H, Fukuoka M, Maeda M, Mori T. Human luteal cells express leukocyte functional antigen (LFA)-3. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 78-84.

Hershlag A, Paine T, Kvapil G, Feng H, Napolitano B. In vitro fertilization intracytoplasmic sperm injection split: an insemination method to prevent fertilization failure. *Fertil Steril* 2002; 77:229-32.

Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P et al. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nature Med* 1999; 5:431-3.

Hoffman GE, Khoury J, Johnson CA, Thie J, Scott RT, Jr. Premature luteinization during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer has no impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 1996; 66:980-6.

Howles CM. The place of gonadotrophins-releasing hormone antagonists in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(Suppl 3):64-71.

Hsu SY, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis. An ovarian perspective. *Trends Endocrinol Metab* 1997; 8: 207-13.

Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 1992; 58:888-96.

Huirne JA, Lambalk CB. Gonadotropin-releasing hormone-receptor antagonists. *Lancet* 2000; 358:1793-803.

Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age-related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65:783-90.

Hurley VA, Osborn JC, Leoni MA, Leeton J. Ultrasound-guided embryo transfer: a controlled

trial. *Fertil Steril* 1991; 55:559-62.

Imoedenhe D, Shaw RW. Follicular fluid a-antitrypsin correlation with fertilizing capacity of oocytes. *Br J Obstet Gynecol* 1986; 93: 863-5.

Imoedenhe D, Sigue A. A study of intraovarian predictors of oocyte fertilization in vitro. IVth meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Barcelona, July 3-6; 1988, Abstr 217.

Inaudi P, Germond M, Senn A, De Grandi P. Timing of hCG administration in cycles stimulated for in vitro fertilization: specific impact of heterogeneous follicle sizes and steroid concentrations in plasma and follicle fluid on decision procedures. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9: 201-8.

INE. Indicadores Sociales (consultado 08/2003). Disponible en: <http://www.ine.es/daco/daco42/sociales/sociales.htm>

INE. Movimiento Natural de la Población (consultado 08/2003). Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np285.pdf>

Ingerslev HJ, Hojgaard A, Hindkjaer J, Kesmodel U. A randomized study comparing IVF in the unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate. *Hum Reprod* 2001; 16:696-702.

International Recombinant Human Chorionic Gonadotropin Study Group. Induction of ovulation in World Health Organization group II anovulatory women undergoing follicular stimulation with recombinant human follicle-stimulating hormone: a comparison of recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) and urinary hCG. *Fertil Steril* 2001; 75:1111-8.

Jamieson ME, Fleming R, Kader S, Ross KS, Yates RWS, Coutts JRT. In vivo and in vitro maturation of human oocytes: effects on embryo development and polyspermic fertilization. *Fertil Steril* 1991; 56:93-7.

Janssens RM, Lambalk CB, Vermeiden JP, Schats R, Bernards JM, Rekers-Mombarg LT et al. Dose-finding study of triptorelin acetate for prevention of a premature LH surge in IVF: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Hum Reprod* 2000; 15:2333-40.

Jaroudi K, Al-Hassan S, Al-Sufayan H, Al-Mayman H, Qeba M, Coskun S. Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization are complementary techniques in

management of unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:377-81.

Jimena P, Castilla JA, Peran F, Molina R, Ramírez JP, Acebal M et al. Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 1992a; 96:243-50.

Jimena P, Castilla JA, Peran F, Ramírez JP, Vergara F Jr, Molina R et al. Adrenal hormones in human follicular fluid. *Acta Endocrinol* 1992b; 127:120-4.

Jimena P, Castilla JA, Ramirez JP, Gil T, Acebal M, Molina R, Herruzo AJ. Follicular fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen and CA-125 levels in relation to in vitro fertilization and gonadotropin and steroid hormone concentrations. *Fertil Steril* 1993; 59:1257-60.

Jimena P. Marcadores intrafolliculares de la fertilización in vitro de ovocitos humanos en ciclos estimulados. [Tesis doctoral]. Granada (España): Universidad de Granada; 1993.

Johnson AL, Li Z, Tilly JL. Expression of c-myc and bcl-2 mRNA during ovarian follicle development. *Biol Reprod* 1993; 48 (Supl 1): 152.

Kan AK, Abdalla HI, Gafar AH, Nappi L, Ogunyemi BO, Thomas A et al. Embryo transfer: ultrasound-guided versus clinical touch. *Hum Reprod* 1999; 14:1259-61.

Keren-Tal I, Suh BS, Dantes A, Lindner S, Oren M, Amsterdam A. Involvement of p53 expression in cAMP-mediated apoptosis in immortalized granulosa cells. *Exp Cell Res* 1995; 218:283-95.

Khalifa E, Brzyski RG, Oehninger S, Acosta AA, Muasher SJ. Sonographic appearance of the endometrium: the predictive value for the outcome of in-vitro fertilization in stimulated cycles. *Hum Reprod* 1992; 7:677-80.

Kim J-M, Yoon Y-D, Tsang BK. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology* 1999; 140: 2307-17.

Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2742-5.

Kleinman D, Insler V, Leiberman JR, Glezerman M, Albotiano S, Potashnik G et al. Acid phosphatase levels in follicular fluid following induction of ovulation in vitro fertilization patients. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4: 181-4.

Klipstein S, Reindollar RH, Regan MM, Alper MM. Initiation of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix for in vitro fertilization cycles in which the lead follicle is >14 mm. *Fertil Steril* 2004; 81:714-5.

Knutzen V, Stratton CJ, Sher G, McNamee PI, Huang TT, Soto-Albors C. Mock embryo transfer in early luteal phase, the cycle before in vitro fertilization and embryo transfer: a descriptive study. *Fertil Steril* 1992; 57:156-62.

Kobayashi T, Oda T, Yoshimura Y, Takehara Y, Natori M, Nozawa S. Androstendione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1991; 56: 301-5.

Kol S, Lightman A, Hillensjo T, et al. High doses of gonadotrophin-releasing hormone antagonist in in-vitro fertilization cycles do not adversely affect the outcome of subsequent freeze-thaw cycles. *Hum Reprod* 1999; 14:2242-4.

Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002; 78: 1025-9.

Kolibianakis E, Zikopoulos K, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem A et al. Reproductive outcome of polycystic ovarian syndrome patients treated with GnRH antagonists and recombinant FSH for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:313-8.

Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Initiation of gonadotropin-releasing hormone antagonist on day 1 as compared to day 6 of stimulation: effect on hormonal levels and follicular development in in vitro fertilization cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5632-7.

Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Relationship between LH and oestradiol in IVF cycles before GnRH antagonist initiation. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:190-3.

Kolibianakis EM, Albano C, Kahn J, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC et al. Exposure to high levels of luteinizing hormone and estradiol in the early follicular phase of

gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles is associated with a reduced chance of pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 79:873-80.

Kovacs GT. Which factors are important for successful embryo transfer after in-vitro fertilization? *Hum Reprod* 1999; 14:2679.

Kreiner D, Hung-Ching L, Itskovitz J, Veeck L, Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil Steril* 1987; 48: 991-4.

Kubota T, Kamada S, Ohara M, Taguchi M, Sakamoto S, Shimizu Y et al. Insulin-like growth factor-II in follicular fluid of the patients with in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1993; 59:844-9.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999; 14:3077-9.

Laml T, Obruca A, Fischl F, Huber JC. Recombinant luteinizing hormone in ovarian hyperstimulation after stimulation failure in normogonadotropic women. *Gynecol Endocrinol* 1999; 13:98-103.

Langley MT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Reprod* 2001; 16:902-8.

Larizgoitia I, Estrada MD, García-Altés A. FSH-recombinant com a adjuvant en la reproducció assistida. Algunes dades sobre eficiència de l'FSH recombinant en relació amb l'FSH d'origen urinari. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques, Servei Català de la Salut, Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya; 2000. Informe N.º BR02/2000.

Lass A, Abusheikha N, Brinsden P, Kovacs GT. The effect of a difficult embryo transfer on the outcome of IVF. *Hum Reprod* 1999; 14:2417.

Lau CP, Ledger WL, Groome NP, Barlow DH, Muttukrishna S. Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte-cumulus culture medium. *Hum Reprod* 1999; 14: 2525-30.

Laufer N, Tarlatzis BC, DeCherney AH, Masters JT, Haseltine FP, MacLusky N et al. Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42: 366-71.

Lavie O, Margalioth EJ, Geva-Eldar T, Ben-Chetrit A. Ultrasonographic endometrial changes after intrauterine insemination: a comparison of two catheters. *Fertil Steril* 1997; 68:731-4.

Lavy G, Boyers SP, Decherney H. Hyaluronidase removal of cumulus oophorus increases in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1988; 5: 257-60.

Le Cottonnec JY, Loumaye E, Porchet HC, Beltrami V, Munafo A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between recombinant human luteinizing hormone and recombinant human follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 1998; 69:201-9.

Le Cottonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Munafo A. Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part I. Pharmacokinetics after intravenous administration to healthy female volunteers and comparison with urinary human luteinizing hormone. *Fertil Steril* 1998; 69:189-94.

Le Cottonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Munafo A. Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part II. Bioavailability of recombinant human luteinizing hormone assessed with an immunoassay and an in vitro bioassay. *Fertil Steril* 1998; 69:195-200.

Lee MS, Ben-Rafael Z, Meloni , Mastroianni JR, Flickinger GL. Relationship of human oocyte maturity, fertilization and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4:168-71.

Leone FP, Lanzani C, Ferrazzi E. Use of strict sonohysterographic methods for preoperative assessment of submucous myomas. *Fertil Steril* 2003; 79:998-1002.

Leony P, Killick SR, Robinson J, Maguiness SD. Transcervical embryo transfer as a risk factor for ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 1999; 72:305-9.

Leroy I, d'Acremont MF, Brailly-Tabard S, Frydman R, de Mouzon J, Bouchard P. A single injection of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist (Cetrorelix) postpones the luteinizing hormone (LH) surge: further evidence for the role of GnRH during the LH surge. *Fertil Steril* 1994; 62:461-7.

Lesny P, Killick SR, Robinson J, Raven G, Maguiness SD. Junctional zone contractions and embryo transfer: is it safe to use a tenaculum? *Hum Reprod* 1999; 14:2367-70.

Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, Robinson J, Maguiness SD. Embryo transfer-can we learn anything new from the observation of junctional zone contractions? *Hum Reprod* 1998; 13:1540-6.

Levrant D, Bider D, Yoness M, Yemini Z, Seidman DS, Mashiach S et al. A randomized study of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus subzonal insemination (SUZI) for the management of severe male-factor infertility. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:319-21.

Levy DP, Navarro JM, Schattman GL, Davis OK, Rosenwaks Z. The role LH in ovarian stimulation: exogenous LH: let's design the future. *Hum Reprod* 2000; 15:2258-65.

Licciardi F, Grifo JA, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relation between antibodies to *Chlamydia trachomatis* and spontaneous miscarriage following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9:207-10.

Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 64:991-4.

Lindheim SR, Cohen MA, Sauer MV. Ultrasound guided embryo transfer significantly improves pregnancy rates in women undergoing oocyte donation. *Int J Gynaecol Obstet* 1999; 66:281-4.

Lindner CH, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, Bettendorf G. Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm Metabol Res* 1988; 20: 243-6.

Liu HC, Sandow BA, Rosenwaks Z. Follicular fluid and oocyte maturation. En: Jones HW Jr, Jones GS, Hodgen GD, Rosenwaks Z, editores. *In Vitro Fertilization*. Norfolk Baltimore: Williams Wilkins; 1986. p.106-23.

Loumaye E. The control endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1990; 5:357-76.

Loumaye E, Vankrieken L, Depreester S, Psalti I, de Cooman S, Thomas K. Hormonal changes induced by short-term administration of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development. *Fertil Steril* 1989; 51:105-11.

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Patsoula E, Bletsas R, Michalakis S. Birth of two infants who were seronegative for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) after intracytoplasmic injection of sperm from HIV-1-seropositive men. *Fertil Steril* 2001; 75:210-2.

Lovegren ES, Zimmiski SJ, Puett D. Ovarian content of immunoreactive beta endorphin and

alpha-N-acetylated opioid peptides in rats. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 91-100.

Ludwig M, Diedrich K. Evaluation of an optimal luteal phase support protocol in IVF. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80:452-66.

Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril* 2003; 79:1051-9.

Ludwig M, Felberbaum RE, Devroey P, Albano C, Riethmuller-Winzen H, Schuler A et al. Significant reduction of the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) by using the LHRH antagonist Cetrorelix (Cetrotide) in controlled ovarian stimulation for assisted reproduction. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 264:29-32.

Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schroder AK, Loning M, Weiss JM et al. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2002; 17:2842-5.

Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2001; 265:175-82.

Ludwig M, Riethmuller-Winzen H, Felberbaum RE et al. Health of 227 children born after controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization using the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix. *Fertil Steril* 2001; 75:8-22.

Lunenfeld E, Shapiro BS, Sarov B, Sarov I, Insler V, Decherney AH. The association between chlamydial-specific IgG and IgA antibodies and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989; 6:222-7.

MacDougall MJ, Tan SL, Hall V, Balen A, Mason BA, Jacobs HS. Comparison of natural with clomiphene citrate-stimulated cycles in in vitro fertilization: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril* 1994; 61:1052-7.

MacLachlan RI, Healy DL, Robertson DM, Dekretser DM, Burger HG. Plasma inhibin levels during gonadotropin induced ovarian hyperstimulation for IVF: A new index of follicular function. *Lancet* 1986; 1: 1232-5.

Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989; 51:139-48.

Manna C, Rienzi L, Greco E, Sbracia M, Rahman A, Poverini R et al. Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. *Zygote* 2001; 9:201-10.

Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI. Study of the optimum time for human chorionic gonadotropin-ovum pickup interval in in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11:478-81.

Marcus SF, Brinsden PR. Analysis of the incidence and risk factors associated with ectopic pregnancy following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10:199-203.

Marina S, Marina F, Alcolea R, Nadal J, Exposito R, Huguet J. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum Reprod* 1998; 13:3247-9.

Maroulis GB. Effect of aging on fertility and pregnancy. *Seminars Reprod Endocrinol* 1991; 9:16-20.

Martikainen H, Orava M, Lakkakorpi J, Tuomivaara L. Day 2 elective single embryo transfer in clinical practice: better outcome in ICSI cycles. *Hum Reprod* 2004; 19:1364-6.

Matikainen T, Ding YQ, Vergara M, Huhtaniemi I, Couzinet B, Schaison G. Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone to gonadotropin-releasing hormone antagonist and agonist treatments in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:820-5.

McDonough PG. hCG—mass units, molar conversions, and the standardization of biologic units. *Fertil Steril* 2003; 80:1534-5.

McFadden DE, Langlois S. Parental and meiotic origin of triploidy in the embryonic and fetal periods. *Clin Genet* 2000; 58:192-200.

McFadden DE, Pantzar JT. Placental pathology of triploidy. *Hum Pathol* 1996; 27:1018-20.

Meldrum D. GnRH agonists as adjuncts for in vitro fertilization. *Obstet Gynecol Surv* 1989; 44:314-6.

Meldrum DR, Silverberg KM, Bustillo M, Stokes L. Success rate with repeated cycles of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 69:1005-9.

Meldrum DR, Wisot A, Hamilton F, Gutlay AL, Huynh D, Kempton W. Timing of initiation and dose schedule of leuprolide influence the time course of ovarian suppression. *Fertil Steril* 1988; 50:400-2.

Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Orgega E, Bernabeu S et al. Relationship between fertilization results after ICSI, and follicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Human Reprod* 1999; 14: 628-35.

Messinis IE, Milingos SD. Future use of clomiphene in ovarian stimulation. Clomiphene in the 21st century. *Hum Reprod* 1998; 13:2362-5.

Michael AE, Gregory L, Piercy EC, Walker SM, Shaw RW, Cooke BA. Ovarian 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity is inversely related to the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer treatment cycles. *Fertil Steril* 1995; 64:590-8.

Michael AE, Gregory L, Thaventhiran L, Antoniw JW, Cooke BA. Follicular variation in ovaria 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) activities: evidence for paracrine inhibition of 11 β -HSD in human granulosa lutein cells. *J Endocrinol* 1996; 148:419-25.

Miller KF, Xie S, Pope WF. Immunoreactive inhibin in follicular fluid is related to meiotic stage of the oocyte during final maturation of the porcine follicle. *Mol Reprod dev* 1991; 28: 35-9.

Milwidsky A, Kaneti H, Finzi Z et al. Conversion of a latent to active plasminogen activator accompanies follicular maturation. *Vith World Congress in Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, Jerusalem, April 2-7, 1989, p 25.*

Minaretzis D, Alper MM, Oskowitz SP. Gonadotropin-releasing hormone antagonist versus agonist administration in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation: cycle performance and in vitro steroidogenesis of granulosa-lutein cells. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:1518-25.

Minaretzis D, Harris D, Alper MM, Mortola JF, Berger MJ, Power D. Multivariate analysis of factors predictive of successful live births in vitro fertilization (IVF): suggests strategies to improve IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:365-71.

Mio Y, Sekijima A, Iwabe T, Onohara Y, Harada T, Terakawa N. Subtle rise in serum progesterone during the follicular phase as a predictor of the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 58:159-66.

Mochtar MH, Van der Veen, Ziech M, van Wely M. Hormona luteinizante recombinante (rLH)

para la hiperestimulación ovárica controlada en ciclos de reproducción asistida (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd.

Moffitt DV, Queenan JT Jr., Shaw R, Muasher SJ. Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin do not predict pregnancy outcome from the transfer of fresh or cryopreserved embryos from the same cohort. *Fertil Steril* 1997; 67:296-301.

Moilanen JM, Tulppala M, Reima I, Hovatta O. Fertilization, embryo quality, and cryosurvival in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16:17-23.

Molina R, Castilla JA, Mozas J, Barrio J, Serrano JP, Vergara F et al. Valoración de la calidad ovocitaria mediante la determinación de diversas proteínas en líquido folicular ovárico. *Prog Obst Gin* 1991; 34:439-43.

Molina R. Parámetros bioquímicos del líquido folicular y su relación con la fertilización in vitro de los ovocitos. [Tesis doctoral]. Granada (España): Universidad de Granada; 1990.

Montero A, Castilla JA, Hernández J, Molina R. Hormonas esteroideas y perfil lipídico en líquido folicular ovárico y su relación con la fertilización in vitro de los ovocitos. *Rev Diag Biol* 1991; 40: 98-101.

Mordel N, Anteby JO, Zajicek G, Roisman I, Treves A, Barak V. CA-125 is present in significant concentrations in periovulatory follicles of in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 377-80.

Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002; 77:433-44.

Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Malta J, Ellis LM, Liu HC et al. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1988; 50:298-307.

Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996; 65:1047-50.

Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H et al. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on

fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 1995; 10:3171-7.

Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Sakai N et al. Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1997; 67: 302-8.

Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T et al. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in IVF programs. *Fertil Steril* 1997; 68: 312-7.

Nardo LG, Bellanca SA, Burrello N, Longo G, D'Agata R, Nardo F et al. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in the follicular fluid of women undergoing ovarian hyperstimulation with different gonadotropin preparations. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15:413-20.

Nasmyth K. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 2001; 35:673-745.

Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* 1987; 2: 645-7.

Nayudu PL, Lopata A, Leung PC, Johnston WH. Current problems in human in vitro fertilization and embryo transfer. *J Exp Zool* 1983; 228: 203-13.

Nazari A, Askari HA, Check JH, O'Shaughnessy A. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancy in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993; 60:919-21.

Neuhaus W, Bolte A. Prognostic factors for preoperative consultation of women desiring sterilization; findings of a retrospective analysis. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 1995; 16:45-50.

Ng EH, Chui DK, Tang OS, Lau EY, Yeung WS, Chung HP. In vitro fertilization and embryo transfer during natural cycles. *J Reprod Med* 2001; 46:95-9.

Nikolettos N, Al-Hasani S, Felberbaum R, Demirel LC, Kupker W, Montzka P et al. Gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a novel method of ovarian stimulation in poor responders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97:202-7.

Noyes N, Liu HC, Sultan K, Schattman G, Rosenwaks Z. Endometrial thickness appears to be a significant factor in embryo implantation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995;

10:919-22.

Nyboe Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2004; 19:490-503.

Ohta N, Saito H, Kuzumaki T, Takahashi T, Ito MM, Saito T et al. Expression of CD44 in human cumulus and mural granulosa cells of individual patients in in-vitro fertilization programmes. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:22-8.

Oliva G, Arnau J. Reproducció humana y asistida: situación nacional y europea. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2001. Informe N.º 04 (consultado 08/2003). Disponible en: <http://www.aatrm.net/cas/informes/notes04.html>

Oliveira JB, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Borges MC, Franca JG Jr. Endometrial ultrasonography as a predictor of pregnancy in an in-vitro fertilization programme after ovarian stimulation and gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Hum Reprod* 1997; 12:2515-8.

Olivennes F, Alvarez 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 2 mg. *Hum Reprod* 1998; 13:2411-4.

Olivennes F, Belaisch-Allart J, Empeaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L et al. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). *Fertil Steril* 2000; 73:314-20.

Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002; 8:279-90.

Olivennes F, Diedrich K, Frydman R, Felberbaum RE, Howles CM. Safety and efficacy of a 3 mg dose of the GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surges: report of two large multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 432-8.

Oosterhuis GJE, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1998; 70:747-9.

Ortmann O, Weiss JM, Diedrich K. Embryo implantation and GnRH antagonists: ovarian actions of GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2001; 16:608-11.

Padilla SL. Ovarian abscess following puncture of an endometrioma during ultrasound-guided oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1993; 8:1282-3.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-8.

Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Investig* 1995; 2:565-73.

Patton PE, Sadler-Fredd K, Burry KA, Gorrill MJ, Johnson A, Larson JM et al. Development and integration of an extended embryo culture program. *Fertil Steril* 1999; 72:418-22.

Paulson RJ, Sauer MV, Francis MM, Macaso TM, Lobo RA. In vitro fertilization in unstimulated cycles; the University of Southern California experience. *Fertil Steril* 1992; 57:290-3.

Pearlstone AC, Fournet N, Gambone JC, Pang SC, Buyalos RP. Ovulation induction in women age 40 and older: the importance of basal follicle-stimulating hormone level and chronological age. *Fertil Steril* 1992; 58:674-9.

Peinado JA, Bolumar F. Esterilidad e infertilidad: aproximación a su incidencia y a la demanda posible de servicios. En "Reproducción humana", ed. Remohí J, Simon C, Pellicer A, Bonilla F McGraw-Hill-Interamericana. p. 235-245.

Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003; 112:195-203.

Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod* 2002; 17:362-9.

Porchet HC, Le Cottonnec JY, Neuteboom B, Canali S, Zanolio G. Pharmacokinetics of recombinant human luteinizing hormone after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration in monkeys and comparison with intravenous administration of pituitary human luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:667-73.

Porter RN, Smith W, Craft IL et al. Induction of ovulation for in-vivo fertilisation using buserelin and gonadotropins. *Lancet* 1984; 2, 1284-5.

Prapas Y, Prapas N, Hatziparasidou A, Prapa S, Nijs M, Vanderzwalmen P et al. The echoguide embryo transfer maximizes the IVF results. *Acta Eur Fertil* 1995; 26:113-5.

Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a metaanalysis of the randomized trials. *Hum Reprod* 2002; 17:2287-99.

Propst AM, Hill JA, Ginsburg ES, Hurwitz S, Politch J, Yanushpolsky EH. A randomized study comparing Crinone 8% and intramuscular progesterone supplementation in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2001; 76:1144-9.

Pryor JL, Kent-First M, Muallen A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L et al. Microdeletions of in the Y chromosome of infertile men. *New Engl J Med* 1997; 336:534-9.

Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G, Baranao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* 2001; 16:1814-8.

Rabinovici J, Dandekar P, Angle MJ, Rosenthal S, Martin HC. Insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles: correlation with serum IGF-I levels. *Fertil Steril* 1990; 54: 428-33.

Reece EA, Petrie RH, Sirmans MF, Finster M, Todd WD. Combined intrauterine and extrauterine gestations: a review. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 146:323-30.

Reinthaller A, Deutinger J, Riss P, Muller-Tyl E, Fischl F, Bieglmayer C et al. Relationship between the steroid and prolactin concentration in follicular fluid and the maturation and fertilization of human oocytes. *J In Vitro Embryo Transfer* 1987; 4: 228-31.

Reisman T, Schally AV, Bouchard P et al. The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod Update* 2000; 6:322-31.

Review of assisted reproductive technology. Canberra: Australian Health Technology Advisory Committee, 1998.

Ron-El R, Herman A, Golan A, Nachum H, Soffer Y, Caspi E. Gonadotropins and combined gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropins protocols in a randomized prospective study. *Fertil Steril* 1991; 55:574-8.

Ron-El R, Herman A, Golan A, Soffer Y, Nachum H, Caspi E. Ultrashort gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) protocol in comparison with the long-acting GnRH-a protocol and menotropin alone. *Fertil Steril* 1992; 58:1164-8.

Rongieres-Bertrand C, Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Taieb J, Hamamah S et al. Revival of the natural cycles in in-vitro fertilization with the use of a new gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix): a pilot study with minimal stimulation. *Hum Reprod* 1999; 14:683-8.

Rosenlund B, Sjoblom P, Hillensjo T. Pregnancy outcome related to the site of embryo deposition in the uterus. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13:511-3.

Rowland GF, Forsey T, Moss TR, Steptoe PC, Hewitt J, Darougar S. Failure of in vitro fertilization and embryo replacement following infection with *Chlamydia trachomatis*. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2:151-5.

Saadat P,Boostanfar R,Slater CC,Tourgeman DE,Stanczyk FZ, Paulson RJ. Accelerated endometrial maturation in the luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation: impact of gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists. *Fertil Steril* 2004; 82:167-71.

Saith RR, Srinivasan A, Michie D, Sargent IL. Relationship between the developmental potential of human in vitro fertilization embryos and features describing the embryo, oocyte and follicle. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 121-34.

Salha O, Nugent D, Dada T, Kaufmann S, Levett S, Jenner L et al. The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-vitro fertilization cycles. *Human Reprod* 1998; 13: 1901-6.

San Roman GA, Surrey ES, Judd HL, Kerin JF. A prospective randomized comparison of luteal phase versus concurrent follicular phase initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 58:744-9.

Schlegel PN, Girardi SK. Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:709-16.

Schoolcraft W, Sinton E, Schlenker T, Huynh D, Hamilton F, Meldrum DR. Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate. *Fertil Steril* 1991; 55:563-6.

Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertil Steril* 2000; 74:482-6.

Schoot DC, Pijlman B, Stijnen T, Fauser BCJM. Effects of gonadotrophin releasing hormone agonist addition to gonadotrophin induction of ovulation in polycystic ovary syndrome patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 45:53-8.

Schroeder AC, Schultz RM, Kopf GS, Taylor FR, Becker RB, Eppig JJ. Feruin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. *Biol Reprod* 1990; 43:891-7.

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

Scott RT, Hofmann GE, Muasher SJ, Acosta AA, Kreiner DK, Rosenwaks Z. Correlation of follicular diameter with oocyte recovery and maturity at the time of transvaginal follicular aspiration. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1989; 6:73-5.

Scott RT, Toner JP, Muasher S J, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989; 51:651-4.

Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66:593-8.

Seta M. Embryo transfer after autologous endometrial coculture improve pregnancy rates. *Hum Cell* 2001; 14:135-40.

Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto H, Soferman N. Protein of human follicular fluid: the blood follicle barrier. *Fertil Steril* 1973; 24: 429-34.

Shamma FN, Lee G, Gutmann JN, Lavy G. The role of office hysteroscopy in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 58:1237-9.

Sher G, Zouves C, Feinman M, Maassarani G. Prolonged coasting: and effective method for preventing severe ovarian hyperstimulation syndrome in patients undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 3107-9.

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

Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 1993; 60: 123-6.

Shulman A, Ghetler Y, Beyth Y, Ben-Nun I. The significance of an early (premature) rise of plasma progesterone in in vitro fertilization cycles induced by a "long protocol" of gonadotropin releasing hormone analogue and human menopausal gonadotropins. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13:207-11.

Silverberg KM, Burns WN, Olive DL, Riehl RM, Schenken RS. Serum progesterone levels predict success of in vitro fertilization/embryo transfer in patients stimulated with leuprolide acetate and human menopausal gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:797-803.

Silverberg KM, Martin M, Olive DL et al. Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in in vitro fertilization cycles do not adversely affect embryo quality. *Fertil Steril* 1994; 61; 508-13.

Sinosich MJ. Human ovarian follicular antigens. En: Feichtinger W, Kemeter P, editores. *Future aspects in vitro fertilization*. Berlin: Springer Verlag; 1987. p. 64-92.

Smith EM, Anthony F, Masson GM. Oocyte development as assessed by steroid hormone and prostaglandin concentrations in follicular fluid. IVth meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, July 3-6, 1988, Abstr 221.

Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995; 64:1136-40.

Sociedad Española de fertilidad. Información epidemiológica básica (consultado 08/2003). Disponible en: <http://www.sefertilidad.com/infobasica/infogeneral/breve.php>

Speroff L, Glass RH, Nathan GK. Assisted Reproduction. En *Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility*; 6th edition. Lipincott Williams & Wilkins, 1999; 1133.

Speroff L, Glass RH, Kase NG. Esterilidad femenina En: *Endocrinología Ginecológica e Infertilidad*. Buenos Aires, Argentina/ Madrid, España: Waverly Hispánica SA/SL; 2000. p.1013-42.

Stein ZA. A woman's age: childbearing and childrearing. *Am J Epidemiol* 1985; 121:327-42.

Steptoe PC, Edwards RG. Birth after implantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2:366.

Stokman PG, de Leeuw R, van den Wijngaard HA, Kloosterboer HJ, Vemer HM, Sanders AL. Human chorionic gonadotropin in commercial human menopausal gonadotropin preparations. *Fertil Steril* 1993; 60:175-8.

Stone BA, Vargyas JM, Marrs RP, Quinn PJ, Batzofin JH, Tan T et al. Level of steroid and protein hormones in antral fluids of women treated with different combinations of gonadotropins, clomiphene citrate, and a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil Steril* 1988; 49: 249-57.

Strandell A, Bergh C, Lundin K. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates. *Hum Reprod* 2000; 15:2520-5.

Strohmer H, Feichtinger W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992; 58:212-4.

Suchanek E, Simunic V, Grizelj V, Halimi V, Hlavati V, Dovec D et al. Insulin-like growth factor I levels in human preovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 1991; 6: 101-4.

Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril* 1994; 62: 347-52.

Sudik R, Chari S, Pascher E, Sturm G. Human follicular fluid levels of endothelins in relation to oocyte maturity status. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 78-84.

Surrey ES, Schoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2000; 73:667-76.

Sylvestre C, Child TJ, Tulandi T, Tan SL. A prospective study to evaluate the efficacy of two- and three-dimensional sonohysterography in women with intrauterine lesions. *Fertil Steril* 2003; 79:1222-5.

Tam PP, Ng TB, Mad KR. Beta-endorphin level in the preovulatory follicles and the outcome of in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1988; 5: 91-5.

Tan SL, Maconochie N, Doyle P, Campbell S, Balen A, Bekir J et al. Cumulative conception and live-birth rates after in vitro fertilization with and without the use of long, short, and

ultrashort regimens of the gonadotropin-releasing hormone agonist buserelin. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:513-20.

Tan SL, Waterstone J, Wren M, Parsons J. A prospective randomized study comparing aspiration only with aspiration and flushing for transvaginal ultrasound-directed oocyte recovery. *Fertil Steril* 1992; 58:356-60.

Tarlatzis BC, Bili H. Clinical outcome of ICSI: Results of the ESHRE Task Force. En: *Treatment of infertility: the new frontiers*. Ed: Filicori M, Flamigni C. Communications Media for Education, Inc. New Jersey 1988, 301-308.

Tarlatzis BC, Bili H. Intracytoplasmic sperm injection. Survey of world results. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900:336-44.

Tarlatzis BC, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. Adenosine 3'5' monophosphate levels in human follicular fluid: Relationship to oocyte maturation and achievement of pregnancy after in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 111-5.

Tarlatzis BC. Oocyte collection and quality. *Assist Reprod Rev* 1992; 2:16-8.

Tarlatzis BC, Pazaitou K, Bili H, et al. Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993; 8: 1612-6.

Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P. Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support infertility treatments. *Hum Reprod Update* 2000; 6:139-48.

Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Hum Reprod* 2000; 15:2471-7.

Templeton A, Morris JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *New Eng J Med* 1998; 339:573-7.

Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9:511-8.

Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca²⁺ fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil Steril* 1995; 64:770-6.

The European Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2001; 16:644-51.

The Ganirelix Dose-Finding Study Group. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Hum Reprod* 1998; 13:3023-31.

Thibault C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fertil* 1977; 51:1-6.

Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin mediated inhibition of apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger RNA levels. *Endocrinology* 1995; 136: 232-41.

Tomas C, Tikkinen K, Tuomivaara L, Tapanainen JS, Martikainen H. The degree of difficulty of embryo transfer is an independent factor for predicting pregnancy. *Hum Reprod* 2002; 17:2632-5.

Toner JP, Brzyski RG, Oehninger S, Veeck LL, Simonetti S, Muasher SJ. Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on IVF outcome. *Hum Reprod* 1991; 6:284-9.

Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ. Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril* 1991; 55:784-91.

Tsafiri A, Adashi EY. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. En: Knobil E, Neill JD, editores. *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. New York: Raven Press, 1994.

Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril* 1998; 70:578-9.

Tureck RW, Garcia CR, Blasco L, Mastroianni L, Jr. Perioperative complications arising after transvaginal oocyte retrieval. *Obstet Gynecol* 1993; 81:590-3.

Tur-Kaspa I, Yuval Y, Bider D, Levron J, Shulman A, Dor J. Difficult or repeated sequential

embryo transfers do not adversely affect in-vitro fertilization pregnancy rates or outcome. Hum Reprod 1998; 13:2452-5.

Uehara S, Naganuma T, Tsuiki A, Kyona K, Hoshiai H, Suzuki M. Relationship between follicular fluid steroid concentrations and in vitro fertilization. Obstet Gynecol 1985; 66: 19-23.

Ueno J, Oehninger S, Brzyski RG, Acosta AA, Philput B, Muasher SJ. Ultrasonographic appearance of the endometrium in natural and stimulated in-vitro fertilization cycles and its correlation with outcome. Hum Reprod 1991; 6:901-4.

Urbancsek J, Witthaus E. Midluteal buserelin is superior to early follicular phase buserelin in combined gonadotropin-releasing hormone analog and gonadotropin stimulation in in vitro fertilization. Fertil Steril 1996; 65:966-71.

Vahratian A, Schieve LA, Reynolds MA, Jeng G. Live-birth rates and multiple-birth risk of assisted reproductive technology pregnancies conceived using thawed embryos, USA 1999-2000. Hum Reprod 2003; 18:1442-8.

Van Blerkom J, Henry G, Porreco R. Preimplantacion human embryonic development from polypronuclear eggs after in vitro fertilization. Fertil Steril 1984; 41:686-96.

Van de Weijer BH, Mulders JW, Bos ES, Verhaert PD, van den Hooven HW. Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (menotropin). Identification of some of its major impurities. Reprod Biomed Online 2003; 7:547-57.

Van der Ven HH, Al-Hasani S, Diedrich K, Hamerich U, Lehmann F, Krebs D. Polyspermy in in vitro fertilization of human oocytes: frequency and posible causes. Ann NY Acad Sci 1985; 442:88-95.

Van Os HC, Roozenburg BJ, Janssen-Caspers HA, Leerentveld RA, Scholtes MC, Zeilmaker GH et al. Vaginal disinfection with povidon iodine and the outcome of in-vitro fertilization. Hum Reprod 1992; 7:349-50.

Vanrell JA. Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: definición, frecuencia y etilología. En: Vanrell JA, Calaf J, Balasch J, Viscasillas P, editores. Fertilidad y Esterilidad Humana. Barcelona: Masson; 1999.p.1-9.

Van Steirteghem A. Assisted fertilization. En: Handbook of in vitro fertilization (second edition). Ed. Trounson AO, Gardner DK.CRC Press LLC, Florida 2000: 145-166.

Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PM, van der Veen F. Human menopausal gonadotropin and recombinant follicle-stimulating hormone for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Fertil Steril* 2003; 80:1121-2.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Papanikolaou E, Bontis J, Devroey P, Tarlatzis BC. Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2007; 13:343-55.

Vigano P, Fusi F, Gaffuri B, Bonzi V, Ferrari A, Vignali M. Soluble intercellular adhesion molecule-1 in ovarian follicle: production by granulosa luteal cells and levels in follicular fluid. *Fertil Steril* 1998; 69: 774-9.

Vigano P, Gaffuri B, Ragni G, Di Blasio AM, Vignali M. Intercellular adhesion molecule-1 is expressed on human granulosa cells and mediates their binding to lymphoid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:101-5.

Walderstrom U, Kahn J, Marsk L, Nilsson S. High pregnancy rates and successful prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome by "prolonged coasting" of very hyperstimulated patients: a multicentre study. *Hum Reprod* 1999; 14: 294-7.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75:348-53.

Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B. Cytogenetic abnormalities in spontaneous miscarriages of recognized conceptions. In: Porter IH, ed. *Perinatal Genetics: Diagnosis and Treatment*, Academic Press, New York, 1986: 133.

Waterstone J, Curson R, Parsons J. Embryo transfer lo low uterine cavity. *Lancet* 1991; 337:1413.

Weigert M, Krischker U, Pöhl M, Poschalko G, Kindermann C, Feichtinger W. Comparison of stimulation with clomiphene citrate in combination with recombinant follicle-stimulating hormone and recombinant luteinizing hormone to stimulation with a gonadotropin-releasing hormone agonist protocol: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2002; 78:34-9.

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, Erb K, Laursen SB, Rex S, Rasmussen PE. Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone in normogonadotropic women down-regulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist who were undergoing in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2001; 76:543-9.

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.

Westphal LM, Hinckley MD, Behr B, Milki AA. Effect of ICSI on subsequent blastocyst development and pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:113-6.

Wikland M, Bergh C, Borg K, Hillensjo T, Howles CM, Knutsson A et al. A prospective, randomized comparison of two starting doses of recombinant FSH in combination with cetrorelix in women undergoing ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16:1676-81.

Williams SC, Gibbons WE, Muasher SJ, Oehninger S. Minimal ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization using sequential clomiphene citrate and gonadotropin with or without the addition of a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril* 2002; 78:1068-72.

Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril* 2002; 77:693-6.

Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L, Tureck RW, Mastroianni L Jr, Lessey BA. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertil Steril* 1994; 62: 1205-10.

Wood EG, Batzer FR, Go KJ, Gutmann JN, Corson SL. Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15:107-12.

Wransby M, Kullander S, Liedholm P, Rannevik G, Sunstrom P, Thorell J. The success rate of in vitro fertilization of human oocytes in relation to the concentrations of different hormones in follicular fluid and peripheral plasma. *Fertil Steril* 1981; 36: 448-53.

Wright V, Schieve LA, Vahratian A, Reynolds MA. Monozygotic twinning associated with day 5 embryo transfer in pregnancies conceived after IVF. *Hum Reprod* 2004; 19:1831-6.

Xia P and Younglai EV. Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 229-33.

Yanushpolsky EH, Hurwitz S, Tikh E, Racowsky C. Predictive usefulness of cycle day 10 follicle-stimulating hormone level in a clomiphene citrate challenge test for in vitro fertilization outcome in women younger than 40 years of age. *Fertil Steril* 2003; 80:111-5.

Yaron Y, Peyser MR, Samuel D, Amit A, Lessing JB. Infected endometriotic cysts secondary to oocyte aspiration for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994; 9:1759-60.

Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod* 2003; 18:35-44.

Younis JS, Ezra Y, Laufer N, Ohel G. Late manifestation of pelvic abscess following oocyte retrieval, for in vitro fertilization, in patients with severe endometriosis and ovarian endometriomata. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:343-6.

Yovich JL, Turner SR, Murphy AJ. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancies in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985; 44:318-21.

Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. *Fertil Steril* 2000; 73:1115-9.

Zaidi J, Campbell S, Pittrof R, Tan SL. Endometrial thickness, morphology, vascular penetration and velocimetry in predicting implantation in an in vitro fertilization program. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995; 6:191-8.

Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, Andersen AN. Embryo quality and developmental potential is compromised by age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80:169-74.

APÉNDICE

APÉNDICE I: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

1. Objetivo.

Comparar la efectividad de un tratamiento de estimulación ovárica controlada mediante el uso de agonistas de la GnRH con la efectividad de un tratamiento con antagonistas de la GnRH, cuando ambos son aplicados en el primer ciclo de microinseminación.

2. Metodología empleada.

Los pacientes se asignarán aleatoriamente a un grupo de control o a un grupo experimental. En el grupo de experimental se llevará a cabo el tratamiento con antagonistas, mientras que en el de control se hará con agonistas.

Se incluirá en el estudio toda mujer menor de 40 años que tenga una FSH sérica el día 3º menor de 15 mUI/mL y vaya a realizar su primer ciclo de microinseminación, independientemente de la indicación.

3. Tratamiento que puede serle administrado, haciendo referencia al placebo, si procede.

Protocolo con agonistas de la GnRH

En el grupo de control se realizará un protocolo de “análogo largo”. Este consiste en administrar desde el día 22 del ciclo 0,1 mg/día de análogo de la GnRH (Procrin 0.5, Abbott, Madrid España) hasta el día en que se inicia la administración de gonadotropina, en el que se reduce la dosis al 50% hasta el día de la hCG. Tras 10-14 días de administración del agonista se procede a comprobar la frenación hipofisaria mediante ecografía vaginal ovárica (ausencia de folículos y quistes) y determinación sérica de estradiol (<50 pg/mL). Si se confirma dicha hipofisectomía médica se comienza a administrar 300 UI de FSH recombinante (FSHr) al día (Gonal F, Serono, Madrid, España; o Puregón, Organón, Barcelona, España) durante dos días, y 150 UI de FSHr desde el 3º al 7º día. En este día se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente. Una vez que la respuesta folicular es adecuada (más de

3 folículos ováricos mayores de 18 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 microgramos de coriogonadotrofina alfa recombinante (r-hCG) (Ovitrelle, Serono, Madrid, España).

Protocolo con antagonistas de la GnRH

En el grupo experimental, se inicia el día 2º del ciclo con 300 UI de FSHr (Gonal F, Serono, Madrid, España; o Puregón, Organón, Barcelona, España), el 3º día del ciclo se administra igual dosis y a partir del 4º día del ciclo se administra 150 UI de FSHr. A partir del día 6º se administra 0.25 mg/día de antagonista Cetorelix (Cetrotide; Serono Laboratorios SA, Aubonne, Switzerland) o ganirelix (Orgalutran; Organon Laboratorios, Oss, The Netherlands). El día 9º se realiza control ecográfico del desarrollo folicular y determinación sérica de estradiol con el fin de ajustar nuevamente la dosis de FSHr a cada paciente. Una vez que la respuesta folicular es adecuada (más de 3 folículos ováricos mayores de 18 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación mediante 250 microgramos de coriogonadotrofina alfa recombinante (r-hCG) (Ovitrelle, Serono, Madrid, España).

4. Beneficios esperados para él o la sociedad.

Mediante este estudio clínico se pretende comprobar si la efectividad del tratamiento con antagonistas es similar a la del tratamiento mediante agonistas, utilizado de forma generalizada en la actualidad. En caso de verificarse tal circunstancia, es decir, si el tratamiento con antagonistas fuese igual de efectivo que el de agonistas, la práctica clínica habitual debería ser modificada a favor del primero, dado que el tratamiento con antagonistas no presenta algunos de los inconvenientes propios del tratamiento con agonistas como puede ser la mayor duración del tratamiento, el mayor riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, y la aparición de síntomas de privación estrogénica.

5. Incomodidades y riesgos derivados del estudio (número de visitas, pruebas complementarias a que se someterá).

La participación en el estudio clínico no supone ninguna incomodidad adicional. En caso de que el paciente sea asignado al grupo experimental la duración del tratamiento será menor al igual que los síntomas de deprivación estrogénica. En caso de que el paciente sea asignado al grupo de control se le aplicará el protocolo agonista largo de uso generalizado.

6. Posibles acontecimientos adversos.

No se conoce la posibilidad de acontecimientos adversos por la utilización del tratamiento con antagonistas, distintos a los inherentes a la FIV. Además la literatura indica un menor riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica en los tratamientos con antagonistas.

7. Tratamientos alternativos disponibles.

Los dos tratamientos existentes son justamente los que se están comparando en este ensayo, el tratamiento con agonista largo y el tratamiento con antagonistas. La información bibliográfica indica una mayor efectividad del tratamiento agonista largo, no obstante consideramos que dicha conclusión incorpora el sesgo de la práctica habitual consistente en aplicar el tratamiento con antagonistas a partir del segundo ciclo de tratamiento cuando ha fracasado el tratamiento con agonistas.

8. Personas que tendrán acceso a los datos del voluntario y forma en que se mantendrá la confidencialidad.

La participación en este estudio clínico no supone la aportación de información adicional respecto a ninguna condición del paciente. Los datos manejados serán los habituales de todo paciente sometido a tratamiento en la Unidad de Reproducción Humana, por lo que la protección de los mismos quedará garantizada del mismo modo que aquellos pacientes que no participen en el ensayo. El único dato adicional será la asignación aleatoria de cada paciente a un grupo (control o experimental) de los participantes en el ensayo, dicha asignación se realizará de forma anónima y sin ninguna relación con los datos personales de los pacientes.

9. Modo de compensación económica y tratamiento en caso de daño o lesión por su participación en el ensayo, tal como consta en la Ley del Medicamento.

Los riesgos por daños o y perjuicios derivados de la participación en este ensayo serán cubiertos mediante la concertación de un seguro de responsabilidad civil según los términos establecidos en la Ley del Medicamento y en el RD 561/1993 sobre requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos, mediante el cual quedarán cubiertos por completo las responsabilidades del investigador, sus colaboradores y el titular del hospital.

10. Investigador responsable del ensayo y de informar al sujeto y contestar a sus dudas y preguntas, y modo de contactar con él en caso de urgencia.

El investigador responsable del ensayo será el doctor D. Luis Martínez Navarro, responsable de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Los pacientes participantes en el ensayo podrán ser igualmente atendidos por el resto del equipo investigador perteneciente a dicha Unidad, los doctores D. Jose Antonio Castilla Alcalá, D. Juan Fontes Jiménez y D. Vicente Maldonado Ezequiel.

11. La participación en este estudio clínico es totalmente voluntaria, además el paciente tendrá la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su tratamiento.