



DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

Estimulación ovárica para ciclos de Fecundación in vitro con dosis mínimas de gonadotropinas y antagonistas de la GnRH frente a tratamiento habitual con altas dosis de gonadotropinas y agonistas de la GnRH.

TATIANA BEATRIZ GUERRERO SÁEZ
2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Tatiana Beatriz Guerrero Sáez
D.L.: GR 2180-2012
ISBN: 978-84-9028-077-5

D. Luis Martínez Navarro, Facultativo Especialista de Área de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Granada.

HACE CONSTAR

Que Dña. Tatiana Beatriz Guerrero Sáez, Licenciada en Medicina por la Universidad de Granada, ha realizado bajo mi tutela y dirección el trabajo titulado: Estimulación ovárica para ciclos de fecundación in vitro con dosis mínimas de gonadotropinas y antagonistas de la GnRh frente a tratamiento habitual con altas dosis de gonadotropinas y agonistas de la GnRh.

Revisado el contenido de la memoria, considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente al objeto de optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada, 30 de Diciembre 2011

Fdo: Luis Martínez Navarro

D. Juan Mozas Moreno, Facultativo Especialista de Área de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y Profesor Asociado Laboral del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Granada.

HACE CONSTAR

Que Dña. Tatiana Beatriz Guerrero Sáez, Licenciada en Medicina por la Universidad de Granada, ha realizado bajo mi tutela y dirección el trabajo titulado: Estimulación ovárica para ciclos de fecundación in vitro con dosis mínimas de gonadotropinas y antagonistas de la GnRh frente a tratamiento habitual con altas dosis de gonadotropinas y agonistas de la GnRh.

Revisado el contenido de la memoria, considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente al objeto de optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada, 30 de Diciembre 2011

Fdo: Juan Mozas Moreno

Dña. María Ángeles Calderón Rodríguez, Jefe de Sección de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y Doctor en Medicina por la Universidad de Granada.

HACE CONSTAR

Que Dña. Tatiana Beatriz Guerrero Sáez, Licenciada en Medicina por la Universidad de Granada, ha realizado bajo mi tutela y dirección el trabajo titulado: Estimulación ovárica para ciclos de fecundación in vitro con dosis mínimas de gonadotropinas y antagonistas de la GnRh frente a tratamiento habitual con altas dosis de gonadotropinas y agonistas de la GnRh.

Revisado el contenido de la memoria, considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente al objeto de optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada, 30 de Diciembre 2011

Fdo: María Ángeles Calderón Rodríguez

Esta tesis ha sido financiada por el siguiente proyecto: Estimulación ovárica para ciclos de fecundación in vitro con dosis mínimas de gonadotropinas y antagonistas de la GnRH frente a tratamiento habitual con altas dosis de gonadotropinas y agonistas de la GnRH. Agencia financiadora: SAS N° expediente: 679587108 J. Investigadora principal: María Ángeles Calderón Rodríguez.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Sevilla, 17-20 de Mayo de 2011.
- XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad. Valencia, 19-21 de Mayo de 2010.
- XIV Curso de Actualización en Obstetricia y Ginecología. Granada, 10-12 de Febrero de 2010.

Siempre agradeceré a mis directores de tesis, el Dr. Luis Martínez Navarro, el Dr. Juan Mozas Moreno y la Dra. María Ángeles Calderón Rodríguez, su dedicación, esfuerzo, sacrificio y entrega incondicional. Gracias por la oportunidad brindada, por pensar en mí y por permitirme privaros de parte de vuestro tiempo. Gracias por soportar en ocasiones mi —cajonería” y estar siempre dispuestos a ayudar. Sin vosotros este proyecto no sería una realidad. Nunca lo olvidaré.

Agradezco también a los miembros de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, personal de enfermería, médicos, biólogos, informáticos..., su colaboración, en uno u otro modo, sin la cual este proyecto no habría sido posible. En especial al Dr. José Antonio Castilla Alcalá por su disposición y ayuda.

A todos aquellos que han trabajado en proyectos de investigación en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, y que han servido para el desarrollo de nuestro actual proyecto.

No olvido a mi familia, a Juan Gabriel y a mis amigas María Luisa y Natalia, que han compartido mi camino, y sin los que hoy, sin ninguna duda, no sería la persona que soy.

Índice

Introducción

1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1	Esterilidad	21
1.2	Datos estadísticos	21
1.3	Causas de esterilidad	22
1.4	Técnicas de Reproducción Asistida	23
1.5	Indicaciones para la FIV-ICSI	24

2. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

2.1	Pautas de estimulación ovárica	25
2.2	Ciclo natural	25
2.3	Citrato de clomifeno	26
2.4	Tratamiento secuencial con citrato de clomifeno y gonadotropinas exógenas	27
2.5	Inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas	27
2.5.1	Preparados de gonadotropinas	27
2.5.2	Estimulación con gonadotropinas exógenas después de una regulación a la baja (Down-Regulation) con un agonista de la GnRH de acción prolongada: protocolo largo	30
2.5.3	Estimulación secuencial con un agonista de la GnRH y con gonadotropinas exógenas: protocolo corto	34
2.5.4	Estimulación secuencial con un agonista de la GnRH y con gonadotropinas exógenas: protocolo ultracorto	35
2.5.5	Estimulación con gonadotropinas exógenas y adición de un antagonista de la GnRH	35

3. ETAPAS DE LABORATORIO EN FIV-ICSI

3.1	Evaluación ovocitaria	38
3.2	Evaluación del cigoto	39
3.3	Calidad embrionaria	42
3.3.1	Número de células y ritmo de división	42
3.3.2	Fragmentación citoplasmática	42
3.3.3	Simetría celular	43

3.3.4	Visualización de núcleos y grado de multinucleación	45
3.3.5	Sistemas de clasificación en evaluación embrionaria	46
4. EFECTOS ADVERSOS DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA		
4.1	Anomalías en el ovocito	48
4.2	Alteración de la receptividad endometrial	49
4.3	Alteración en la implantación de los embriones	52
4.4	Síndrome de Hiperestimulación Ovárica	52
4.5	Embarazos múltiples	57
4.6	Efectos a largo plazo: cáncer	58
4.7	Repercusiones económicas	59
4.8	Repercusiones psicológicas	59
5. ESTIMULACIÓN SUAVE		
5.1	Introducción	61
5.2	Protocolo de estimulación suave	62
5.3	Ventajas del protocolo de estimulación suave	64
5.3.1	Reducción de aneuploidías en el embrión	64
5.3.2	Menor alteración en la receptividad endometrial	65
5.3.3	Menor incidencia de SHO	66
5.3.4	Mejor relación coste-efectividad	66
5.3.5	Tasa de embarazo	67
5.3.6	Aspectos psicológicos	68
Justificación		71
Objetivos		75
Metodología		
1.	Población de referencia	81
2.	Población de estudio	81
3.	Criterios de inclusión	81
4.	Criterios de exclusión	81
5.	Diseño del estudio	82

6.	Variables a analizar	84
7.	Recogida de datos / Fuentes de información	86
8.	Análisis de datos	87

Resultados

1.	Descripción de la muestra	91
2.	Indicación del tratamiento de fertilidad	92
3.	Variables de la estimulación ovárica	93
4.	Parámetros de laboratorio	94
5.	Resultados de gestaciones	96
6.	Complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación	98
7.	Coste del tratamiento de estimulación	100

Discusión

1.	Variables de la estimulación ovárica	105
2.	Parámetros de laboratorio	105
3.	Resultados de gestaciones	107
4.	Complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación	109
5.	Coste del tratamiento de estimulación	112
5.	Conclusiones	115

Conclusiones

Bibliografía

Glosario

Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado	151
Anexo 2: Hoja de recogida de datos	152

Índice de figuras

Índice de tablas

Introducción

1. Antecedentes y estado actual del tema

1.1 Esterilidad

Se considera que una pareja padece esterilidad si tras 12 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos no queda gestante. Sin embargo, distintos factores asociados podrían ser indicativos para iniciar el estudio básico de esterilidad a los 6 meses de relaciones sexuales sin métodos anticonceptivos y no obtención de embarazo (más de 35 años en la mujer, anormalidades menstruales, historia de enfermedad pélvica o testicular, endometriosis y cirugías a estos niveles) (WHO, 2010).

Las tasas de esterilidad según distintos estudios epidemiológicos se sitúan entre un 14-16% de las parejas en edad reproductiva. El 60% de las parejas en edad fértil consiguen quedar gestantes en 6 meses, el 85% en 12 meses y un 90% en 18 meses (Matorras et al., 2007).

Se define como reproducción asistida (RA) al empleo de tecnología altamente especializada, que sustituye o complementa al contacto sexual para que la fecundación ocurra. La introducción de técnicas de reproducción asistida (TRA) ha aumentado las posibilidades de un tratamiento efectivo, convirtiéndose en una opción fundamental para las parejas estériles. Las TRA no están indicadas en todos los casos de esterilidad, ni constituyen la solución a todos los problemas de la misma, pero permiten la obtención de embarazo en casos considerados previamente como intratables. Sus indicaciones y aceptación son cada vez mayores. Su empleo ha permitido profundizar en el conocimiento de fenómenos naturales como: foliculogénesis, ovulación, fecundación, función del cuerpo lúteo, implantación, etc, y mejorar los métodos tradicionales de tratamiento.

1.2 Datos estadísticos

Desde el nacimiento de Louise Brown en 1978, la primera recién nacida en el mundo concebida mediante Fecundación in vitro (FIV), la demanda de tratamientos por esterilidad en los países desarrollados no ha dejado de crecer,

tal como lo evidencian los registros de las sociedades médicas del ámbito de la reproducción.

El número de ciclos de FIV-ICSI que se realizan anualmente a nivel mundial se ha incrementado constantemente, como constata el décimo informe sobre datos europeos de TRA, publicado por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) en 2010 (Andersen et al., 2008; De Mouzon et al., 2010).

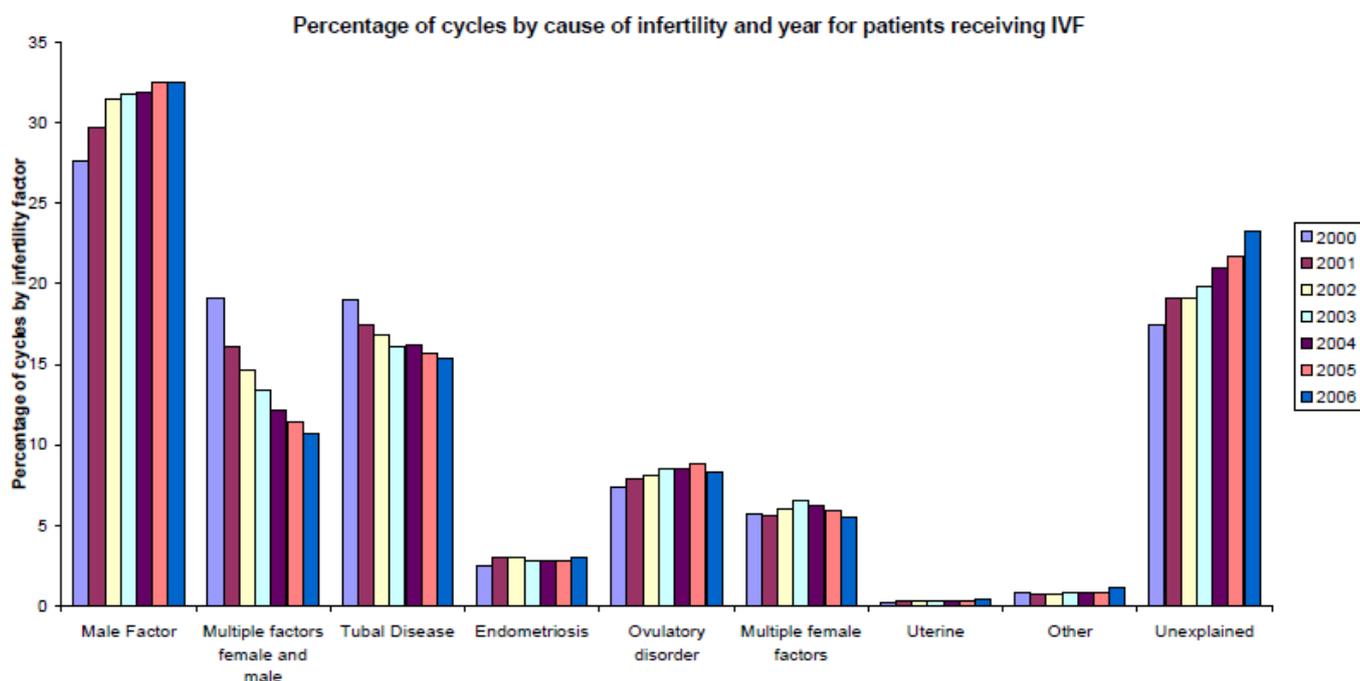
En España, la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) indica que en 2009 (último registro disponible) se realizaron en nuestro país 30.311 punciones/aspiraciones ovocitarias, frente a las 22.133 registradas en 2008 y 4.656 en 1995.

1.3. Causas de esterilidad

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

La Figura 1 muestra el porcentaje de ciclos por causa de infertilidad y año, de pacientes que han recibido tratamiento de FIV en Reino Unido según la HFEA (Human Fertilisation and Embriology Authority) (HFEA long term data 1991-2006).

Figura 1: Porcentaje de ciclos por causa de infertilidad y año de pacientes que han recibido tratamiento de FIV.



La evaluación de la esterilidad se ha diseñado para analizar la integridad de cada uno de los componentes del proceso reproductor humano y para identificar cualquier anomalía que pudiera alterar o impedir la concepción.

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

1.4. Técnicas de Reproducción Asistida

Las TRA abarcan todas aquellas que implican la manipulación directa de los ovocitos y/o espermatozoides en un laboratorio.

La FIV consiste en una secuencia de pasos muy coordinados que comienza con la estimulación ovárica controlada con gonadotropinas exógenas, seguida de la recuperación de los ovocitos de los ovarios mediante punción ecoguiada

transvaginal, fecundación en el laboratorio y transferencia transcervical del embrión al útero. El primer niño concebido por FIV nació en 1978 (Steptoe et al., 1978). Desde entonces, las técnicas utilizadas se han perfeccionado y ampliado notablemente. Las TRA incluyen métodos para la fecundación asistida por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, intracytoplasmic sperm injection) utilizando espermatozoides aislados del semen u obtenidos por aspiración espermática epididimaria microquirúrgica (MESA, microsurgical epididymal sperm aspiration) o extracción espermática testicular (TESE, testicular sperm extraction).

1.5. Indicaciones para la FIV-ICSI

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.

Entre las indicaciones se encuentran: esterilidad por factor tubárico, endometriosis, esterilidad por factor masculino leve, esterilidad idiopática y anovulación que no responde a tratamientos habituales.

Si bien hoy se ha generalizado el uso de la ICSI, la SEF concluye que la ICSI es mejor para el tratamiento de infertilidad por factor masculino severo que para tratar fallos de fecundación en FIV cuando el parámetro seminal es normal. Los parámetros seminales habituales no parecen estar asociados con los resultados de ciclos ICSI, y que la calidad ovocitaria suele ser la responsable de los malos resultados en la ICSI tras el fallo de fecundación.

Según el registro SEF de 2009, en España se realizaron 3947 (13,02%) punciones/aspiraciones ovocitarias de ciclos FIV, frente a 26.364 (86,98%) de ciclos ICSI.

2. Protocolos de tratamiento

2.1 Pautas de estimulación ovárica

La estimulación ovárica ha sido la clave en los tratamientos de reproducción asistida. Durante 25 años, se ha aplicado con el objetivo de conseguir el mayor número de ovocitos posible, compensando así las deficiencias de la técnica de FIV, permitiendo obtener uno o más embriones, siendo posible la selección y transferencia de los mismos.

La pauta de estimulación ovárica ideal para la FIV debe tener una tasa de cancelación baja, reducir los costes farmacológicos y los riesgos y efectos secundarios, precisar un seguimiento limitado por comodidad práctica y optimizar las tasas de embarazo único. Se han descrito numerosas pautas, que varían desde la ausencia de estimulación (ciclos naturales), pasando por una estimulación mínima o leve, hasta la estimulación intensiva (gonadotropinas exógenas en dosis altas). Cada una tiene sus ventajas, desventajas y aplicaciones. El régimen de estimulación seleccionado para una mujer debe ser individualizado y estar basado en la edad, la respuesta a estimulaciones previas y la reserva ovárica.

2.2 Ciclo natural

El primer parto resultante de FIV derivó de un ovocito recogido en un ciclo natural sin estimulación (Steptoe y Edwards., 1978). La FIV con ciclo natural sigue siendo posible, pero las tasas de éxito por ciclo son muy bajas en comparación con las conseguidas en ciclos de estimulación ovárica (Pelinck et al., 2002). 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 eficacia relativamente baja de implantación de un embrión.

Como ventaja las gestaciones múltiples son mínimas. El ciclo natural de FIV resulta más cómodo para la paciente tanto desde el punto de vista práctico como emocional, requiere menos controles y es mucho más barato, no necesitando medicación hormonal. El coste de un ciclo de FIV natural es el 20-23% menos del coste de un tratamiento de FIV estimulado (Edwards, 2007).

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 aquellas 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 de 18 mm (Pelinck et al, 2002). El tratamiento adyuvante con un antagonista de la GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropinas) puede ayudar a prevenir un pico prematuro de LH (Hormona Luteinizante) y mejorar los resultados conseguidos por la FIV con ciclo natural.

2.3 Citrato de clomifeno (CC)

Puede utilizarse la estimulación con CC para aumentar el número de folículos en desarrollo. Generalmente, el CC (100 mg diarios) se administra durante 5-8 días. El fármaco induce el desarrollo de dos o más folículos en la mayoría de las mujeres que presentan una ovulación normal (Coughlan et al., 2010), 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. Las tasas de cancelación 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 (18 mm de diámetro), y puede utilizarse un antagonista de la GnRH para prevenir el pico prematuro de LH endógena.

2.4 Tratamiento secuencial con citrato de clomifeno y gonadotropinas exógenas

El tratamiento secuencial con CC (100 mg diarios durante 5 días) y gonadotropinas exógenas en dosis bajas es más eficaz para estimular el desarrollo multifolicular que el tratamiento con CC sólo.

Un estudio randomizado y controlado comparó un ciclo con CC/gonadotropinas con antagonistas de la GnRH frente a protocolo largo de agonistas de la GnRH, obteniendo resultados similares en cuanto a tasas de embarazo, y una reducción significativa del número de ampollas de hMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) utilizadas, días de tratamiento y número de ovocitos obtenidos (Lin et al., 2006). Este estudio reforzaba los resultados de dos estudios retrospectivos anteriores, que concluían que las tasas de embarazo empleando CC/gonadotropinas con antagonistas de la GnRH frente a estimulación ovárica estándar, eran similares, con una reducción significativa en la dosis total de gonadotropinas necesarias (Fiedler et al., 2003).

2.5 Inducción de la ovulación con gonadotropinas exógenas

Las gonadotropinas exógenas se han utilizado durante más de 40 años para inducir la ovulación en mujeres con carencia de gonadotropinas y en las que no responden a otras formas menos complejas de tratamiento. Estos fármacos son sumamente eficaces, pero también caros, y tienen riesgos considerables, tales como el embarazo múltiple y el SHO (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.

2.5.1 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 hMG o menotropinas, un extracto preparado a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas que contiene cantidades equivalentes (75 UI) de hormona folículo estimulante (FSH) y LH por ampolla o vial, y que requiere inyección intramuscular. Las menotropinas 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. Los extractos de gonadotropinas relativamente sin elaborar como las hMG tradicionales, también contenían cantidades importantes de proteínas urinarias no caracterizadas (Bassett et al., 2009) que podían ser antigénicas. Los preparados actuales de hMG están mucho más purificados que los anteriores y se pueden administrar por vía subcutánea.

Hace aproximadamente 20 años se empezaron a desarrollar preparados urinarios más purificados de FSH urinaria (FSHu), eliminando la LH de los extractos urinarios con el empleo de columnas de inmunoafinidad que contenían anticuerpos anti-hCG. Los preparados iniciales de FSHu 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 (FSHr) mediante genotecnología. Los preparados de FSHr (folitropina alfa, folitropina beta) contienen isoformas de FSH menos ácidas, que tienen una semivida más corta que las procedentes de orina humana, pero estimulan el ovario con una eficiencia equivalente o incluso mayor. Las ventajas de los preparados de FSHr son la ausencia de proteínas urinarias, el suministro constante y la menor variación de la actividad biológica entre un lote y otro.

También se ha desarrollado una forma recombinante de LH humana (LHr) con actividades fisicoquímica, inmunológica y biológica semejantes a las de la LH hipofisaria humana, que fue aprobada en Europa en el año 2000. Tras la

revisión de la literatura actual, se pueden extraer las siguientes conclusiones en lo que respecta a la utilización de la LH en los protocolos de estimulación para FIV-ICSI:

- No existe evidencia clínica de que el contenido de LH de las preparaciones disponibles para la estimulación ovárica afecte negativamente el resultado de los tratamientos de FIV-ICSI.
- Las pacientes que más se pueden beneficiar de la utilización de la LH son las de mayor edad y las bajas respondedoras.
- Es posible que un número importante de mujeres normogonadotropas tengan una supresión tan profunda en protocolos con agonistas de la GnRH, que podrían beneficiarse de la adición de LH en su protocolo de estimulación.
- En las estrategias de estimulación ovárica más actuales, es necesario asociar a la FSHu 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 LHr continúa siendo bastante limitada, aunque puede que aumente en un futuro próximo.

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. Se dispone de una forma recombinante de hCG, obtenida mediante técnicas semejantes a las descritas anteriormente para la FSHr. El producto se comercializó en EEUU en 2001 y desde entonces ha adquirido popularidad con rapidez.

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. Las gonadotropinas recombinantes confieren la capacidad de adaptar

los regímenes de estimulación ovárica a las necesidades de cada mujer (Van Wely et al., 2011), 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.

2.5.2 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 de la década de 1980 revolucionó la estrategia de la estimulación ovárica en las TRA, al permitir la inhibición de la secreción de gonadotropinas hipofisarias endógenas y, así, evitar un pico prematuro de LH durante la estimulación con gonadotropinas exógenas. Ensayos clínicos posteriores demostraron que el número de ovocitos producidos y las tasas de embarazo fueron significativamente mayores en comparación con ciclos estimulados sólo con gonadotropinas exógenas (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 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 una década.

En el ciclo típico, el tratamiento con agonistas de la GnRH comienza durante la fase lútea media, aproximadamente una semana después de la ovulación (21 día del ciclo), 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 —oleada” de desarrollo folicular (Trevisan Albuquerque et al., 2005).

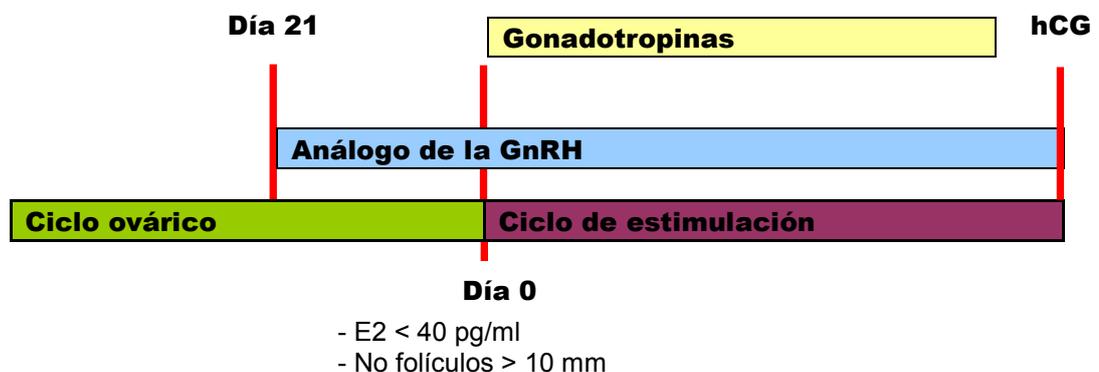
Los agonistas de la GnRH de uso habitual son: acetato de leuprorelina, nafarelina, acetato de buserelina y triptorelina. Todos ellos parecen tener la misma eficacia (El-Nemr et al., 2002).

En condiciones ideales, debería confirmarse una supresión eficaz inducida por el agonista de la GnRH de las concentraciones séricas de estradiol (E2) (inferior a aproximadamente 40 pg/ml) y de la actividad folicular ovárica (la ecografía transvaginal basal no debe mostrar quistes foliculares de más de 10 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 inhibición hipofisaria 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 los ciclos previos de FIV.

En la Figura 2 se muestra un esquema de protocolo largo con análogos de la GnRH.

Figura 2: Esquema de protocolo largo con análogos de la GnRH.



La preocupación de que el tratamiento con agonista de la GnRH pueda suprimir las concentraciones de LH endógena por debajo de los valores necesarios para el desarrollo normal de los folículos, persiste al menos en algunas mujeres. Como sólo el 1% de los receptores para la LH debe estar ocupado para una esteroidogénesis folicular normal, los niveles bajos de secreción de LH después de la inhibición hipofisaria con un agonista de la GnRH, son suficientes para satisfacer las necesidades en la mayoría de las mujeres estimuladas con FSHu o FSHr solas (Cabrera et al., 2005). Sin embargo, las concentraciones de LH podrían ser insuficientes en las mujeres que presentan una supresión más profunda. Los datos indican que el tratamiento combinado con LHr y FSHr puede mejorar la respuesta en mujeres que han respondido previamente mal a la FSHr sola. 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 las dosis y la duración de las gonadotropinas necesarias son mayores y las concentraciones máximas de E2 son más bajas así como el número de ovocitos y de embriones que también puede disminuir (Balasch et al., 2009).

Otros datos indican que las tasas de fecundación, implantación y embarazo podrían verse afectadas negativamente, cuando las concentraciones de LH son extremadamente bajas (Franco et al., 2009). 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 (Mochtar et al., 2007). 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.

La respuesta a la estimulación se controla mediante mediciones seriadas del E2 sérico y ecografía transvaginal de los folículos ováricos. La primera concentración sérica de E2 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 E2 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 E2 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. Así mismo, los numerosos análisis de E2 utilizados en la práctica clínica también varían en sus características de rendimiento.

Generalmente también se vigila el desarrollo del endometrio durante la estimulación midiendo el grosor del mismo. 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 “~~laminar~~ laminar” y peores cuando el endometrio tiene un grosor de 6-7 mm o tiene un aspecto homogéneo el día de la administración de hCG (Detti et al., 2008). Sin embargo, otros autores no han observado una correlación clara entre el grosor o el aspecto del endometrio y los resultados (Mercé et al., 2008). 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).

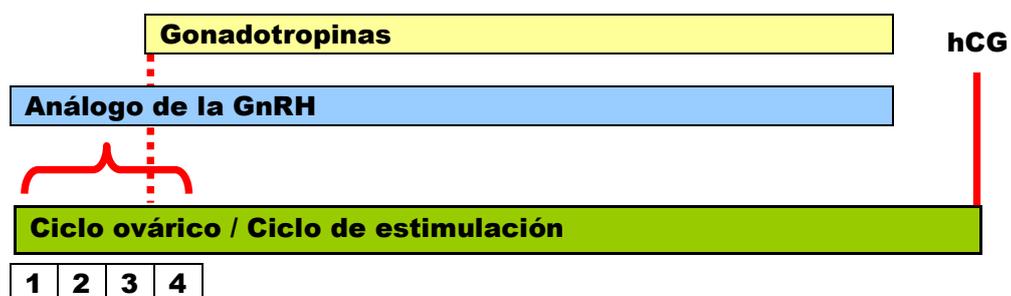
Una vez alcanzados los umbrales de respuesta deseados, se administran 250 µg de la forma recombinante de hCG (Papanikolaou et al., 2010).

2.5.3 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 de estímulo 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. En un protocolo corto convencional típico se administra acetato de leuprorelina (1 mg/día) los días 2-4 del ciclo, continuando luego con una dosis reducida (0,5 mg/día), y la estimulación con gonadotropinas (150-400 UI/día) 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. Una revisión sistemática de 26 ensayos clínicos concluyó que las tasas de embarazo conseguidas con el protocolo largo fueron en general ligeramente superiores a las alcanzadas con el protocolo corto (odds ratio 1,27; IC al 95% 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.

En la Figura 3 se muestra un esquema de protocolo corto con análogos de la GnRH.

Figura 3: Esquema de protocolo corto con análogos de la GnRH.

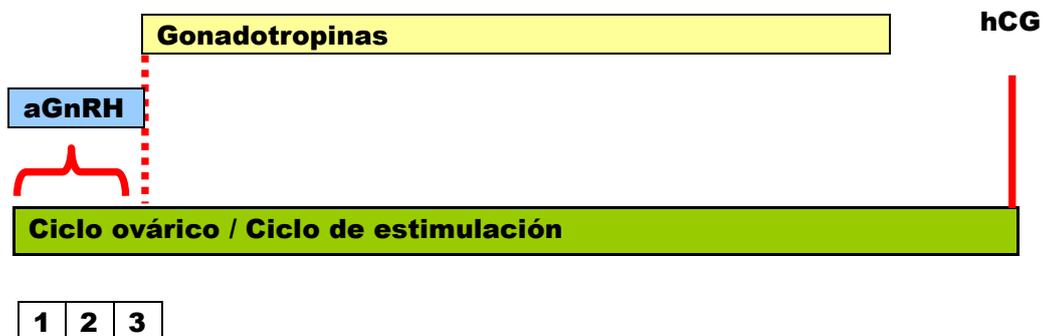


2.5.4 Estimulación secuencial con un agonista de la GnRH y gonadotropinas exógenas: Protocolo ultracorto

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, pero después se suspende y 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 inhibición hipofisaria 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 (odds ratio 1,47; IC al 95% 1,02 – 2,12) (Daya, 2000) y por eso rara vez se utiliza.

En la Figura 4 se muestra un esquema de protocolo ultracorto con análogos de la GnRH.

Figura 4: Esquema de protocolo ultracorto con análogos de la GnRH.



2.5.5 Estimulación con gonadotropinas exógenas y adición de un antagonista de la GnRH

La introducción de los 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 la retroalimentación negativa de los receptores, los antagonistas bloquean el receptor para la GnRH de manera competitiva dosis-dependiente y no tienen efecto de liberación de gonadotropinas, siendo la supresión de las gonadotropinas casi inmediata.

Los antagonistas de la GnRH ofrecen varias ventajas potenciales sobre los agonistas. Puede reducirse la dosis total y la duración de la estimulación con gonadotropinas (Bodri et al., 2011; Lainas et al., 2010; Olivennes et al., 2002). 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), eliminando así los síntomas de carencia de estrógenos que pueden aparecer en las mujeres tratadas con un agonista (Olivennes et al., 2002). 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 SHO grave asociado al uso de antagonistas parece ser menor que con los agonistas (Al-Inany et al., 2011; Griesinger et al., 2010; Tarlatzis et al., 2006).

Los dos antagonistas de la GnRH disponibles para su uso clínico, ganirelix y cetrorelix, 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. El protocolo de tratamiento puede ajustarse para comenzar el día 5-6 de la estimulación con gonadotropinas o adaptarse a la respuesta de la mujer, comenzando el tratamiento cuando el folículo dominante alcanza aproximadamente 13-14 mm de diámetro (Klipstein et al., 2004). Los datos disponibles indican que el régimen individualizado generalmente requiere menos dosis total y puede producir mejor resultado global. Alternativamente, una dosis única mayor de cetrorelix (3 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., 2003).

Aunque un metanálisis que combinó los datos de 5 de los primeros ensayos clínicos que comparaban un protocolo de antagonistas con protocolo largo convencional con agonistas, reveló que la tasa de embarazos clínicos había sido un 5% menor en los ciclos de tratamiento con antagonistas (Al-Inany et al., 2006), no ocurre así con estudios más recientes, que demuestran tasas de gestación similares entre ambos protocolos (Al-Inany et al., 2011; Bodri et al., 2011; Lainas et al., 2010; Tarlatzis et al., 2006).

No está clara la explicación de las tasas de embarazo ligeramente inferiores observadas en los ciclos de tratamiento con antagonistas. Parece más probable que los primeros resultados simplemente reflejaran la inexperiencia y que mejorarán con el tiempo y con las variaciones del régimen del 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 Síndrome de Ovarios Poliquísticos (SOP) (Hosseini et al., 2010; Stadtmauer et al., 2011) y para las que muestran una respuesta baja (Humaidan et al., 2005; Nilsson et al., 2010).

3. Etapas de laboratorio en FIV-ICSI

3.1 Evaluación ovocitaria

La valoración de la calidad ovocitaria se realiza mediante la evaluación de aspectos morfológicos del ovocito previa realización de la ICSI y su correlación con el resultado del ciclo de tratamiento.

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a tratamiento de estimulación ovárica para realizar TRA pueden encontrarse en diferentes etapas del desarrollo meiótico. Sólo los ovocitos que se encuentran en el estadio celular de metafase II (morfológicamente se observa que ha extruido el primer corpúsculo polar) son utilizados para ICSI. En cambio, los ovocitos en fase celular de metafase I (morfológicamente no se observa el primer corpúsculo polar extruido) o profase I (morfológicamente muestra una vesícula germinal) no pueden ser utilizados para ICSI. Además, los ovocitos metafase II gigantes (diámetro mayor a 200 μm) serán descartados para la ICSI, ya que suelen resultar en fecundaciones anómalas: diginia y triploidía (Balakier et al., 1997).

Los ovocitos en metafase II de buena morfología presentan un citoplasma claro, con una granulosidad moderada, un pequeño espacio perivitelino, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida sin color.

Sin embargo, más de la mitad de los ovocitos recuperados en un ciclo de FIV-ICSI muestran por lo menos una anomalía morfológica. Estas anomalías se pueden subdividir en anomalías citoplasmáticas o extracitoplasmáticas. Las primeras incluyen granulosidad o decoloración del citoplasma, agregación del retículo endoplásmico liso, vacuolización y presencia de incorporaciones en el citoplasma como cuerpos refringentes: cuerpos necróticos o picnóticos. Estas anomalías reflejarían defectos intrínsecos del ovocito en detrimento de su viabilidad. Las segundas incluyen irregularidades en la forma del ovocito, espacio perivitelino aumentado, presencia de restos en el espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar, así como consistencia anormal del oolema y de la zona

pelúcida. Algunos de estos defectos se han asociado con una disminución de la tasa de supervivencia del ovocito tras la ICSI, pero no con la fecundación y calidad embrionaria.

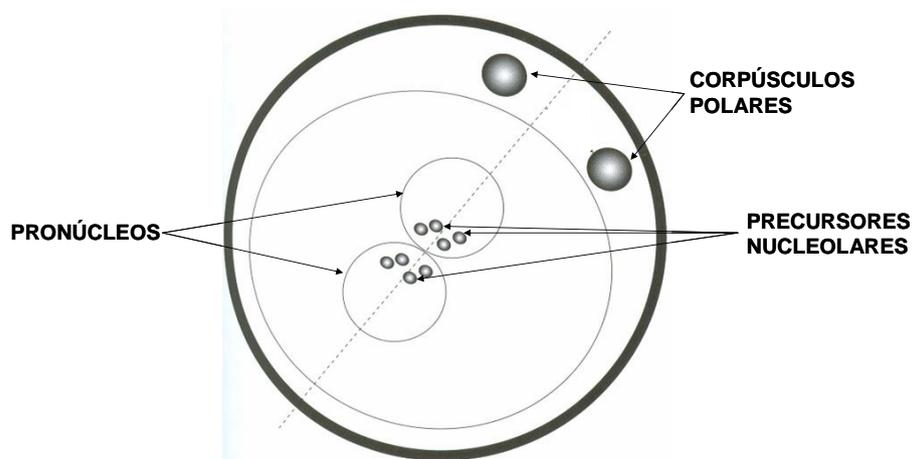
Loutradis et al. (1999) reportaron mayores tasas de embarazo en pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos normales frente a pacientes con transferencia de embriones procedentes de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. Otros autores encontraron menores tasas de embarazo a término en pacientes con ovocitos con citoplasma granuloso (Kahraman et al., 2000), y Alikani et al. (1995) observaron una disminución significativa en la pérdida preclínica de embarazo en pacientes con transferencias de embriones procedentes de ovocitos de buena morfología.

Actualmente, a excepción de los megaovocitos, no se suele considerar la calidad ovocitaria en la selección embrionaria, pues no todos los autores han observado las comentadas asociaciones entre morfología ovocitaria y embrionaria (De Sutter et al., 1996).

3.2 Evaluación del cigoto

La valoración del cigoto se realiza mediante la evaluación de parámetros morfológicos de los pronúcleos masculino y femenino, así como de sus precursores nucleolares tras 16-18 horas post inseminación mediante FIV o ICSI (Figura 5).

Figura 5: Esquema de un cigoto.



Los acontecimientos que se han podido observar en el ovocito tras una fecundación normal mediante ICSI se describen a continuación. Tras realizar la ICSI el ovocito muestra “ondas” circulares de granulación en el ooplasma con una periodicidad de 20 a 53 minutos. Durante esta fase de granulación la cromatina del espermatozoide se descondensa. A continuación el segundo corpúsculo polar es extruido y el pronúcleo masculino se forma en la zona central del ovocito. Acto seguido se forma el pronúcleo femenino que migra hacia la zona central del ovocito para encontrarse con el pronúcleo masculino. Ambos pronúcleos aumentan su tamaño y los precursores nucleolares se desplazan por el interior de cada pronúcleo para alinearse y quedar enfrentados.

Los pronúcleos se clasifican en base a la simetría, posición y localización de los mismos. Y los precursores nucleolares se evalúan en base al número, simetría y localización de los mismos. Otras características observadas para la clasificación del cigoto son la morfología y alineamiento de los corpúsculos polares, la morfología del citoplasma (presencia vs ausencia de halo citoplasmático) y finalmente una segunda evaluación embrionaria 25-27 horas post-inseminación para evaluar la presencia o ausencia de los pronúcleos y/o la división temprana.

Sadowy et al. (1998) encontraron una fuerte correlación entre mosaicismo embrionario y cigoto con pronúcleos de diferente tamaño. Por otro lado, diferentes autores encuentran que el desarrollo del embrión en etapas

tempranas puede verse afectado cuando se produce asincronía en la formación y polarización de los precursores nucleolares (Scott et al., 2000; Tesarik et al., 1999).

El alineamiento de los pronúcleos y los corpúsculos polares está relacionado con el eje polar de la primera división embrionaria, pudiendo producirse anomalías cromosómicas en el desarrollo embrionario si el alineamiento es incorrecto (Garello et al., 1999).

La presencia de halo acitoplasmático se produce por la redistribución de las mitocondrias alrededor de los pronúcleos, originando un anillo claro en la periferia del ooplasma. Diferentes publicaciones concluyen que la presencia de halo es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva (Balaban et al., 2006; Zollner et al., 2002). No obstante, esta característica corresponde a un proceso dinámico que puede no observarse en el cigoto en el momento de su evaluación, por lo que otros autores no consideran que sea un parámetro a tener en cuenta en la evaluación del mismo (Payne et al., 1997).

Los estudios que evalúan la división temprana a las 25-27 horas post-inseminación, intentan correlacionar este parámetro con la morfología embrionaria en día+2 y día+3 (Ciray et al., 2006) el desarrollo a blastocisto (Neuber et al., 2003), la viabilidad embrionaria (Salumets et al., 2003) y la tasa de implantación (Ciray et al., 2006), pero sus conclusiones son contradictorias.

Numerosos sistemas de gradación pronuclear han sido propuestos (Ludwig et al., 2000; Wittemer et al., 2000), pero actualmente no está en uso ningún sistema estandarizado para la gradación del cigoto, ya que el desarrollo pronuclear es un proceso dinámico y excluir un embrión basándose en una observación puntual puede llevar a errores (James et al., 2006). La selección embrionaria será el resultado de la evaluación global del embrión: desde el estadio de cigoto hasta el día de la transferencia.

3.3 Calidad embrionaria

La valoración morfológica del preembrión ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Para realizar esta valoración el embrión se observa en el intervalo de 44-47 horas post inseminación (día+2) y 67- 71 post inseminación (día+3).

Los criterios más utilizados para seleccionar el número óptimo de embriones a transferir y reducir la incidencia de embarazo múltiple son: número de células, simetría celular, sincronía de división celular, porcentaje y tipo de fragmentación celular, visualización de núcleos y grado de multinucleación.

3.3.1 Número de células y ritmo de división

La cinética de división embrionaria hace referencia al número de células que se pueden observar en el embrión en sus diferentes estadios de desarrollo. Estos valores esperados quedan reflejados en la Figura 6.

Figura 6: Cinética de división embrionaria esperada en FIV-ICSI.

Ovocito			
Cigoto	→	16-18 horas post-inseminación	→ 2 pronúcleos
Borrar pronúcleos	→	20-23 horas post-inseminación	→ ausencia de pronúcleos
División temprana	→	25-27 horas post-inseminación	→ 2 células iguales
día+2	→	44-47 horas post-inseminación	→ 4 células iguales
día+3	→	67-71 horas post-inseminación	→ 8 células iguales
día+4	→	94-98 horas post-inseminación	→ mórula
día+5	→	112-120 horas post-inseminación	→ blastocisto temprano
día+6	→	136-140 horas post-inseminación	→ blastocisto expandido

3.3.2 Fragmentación citoplasmática

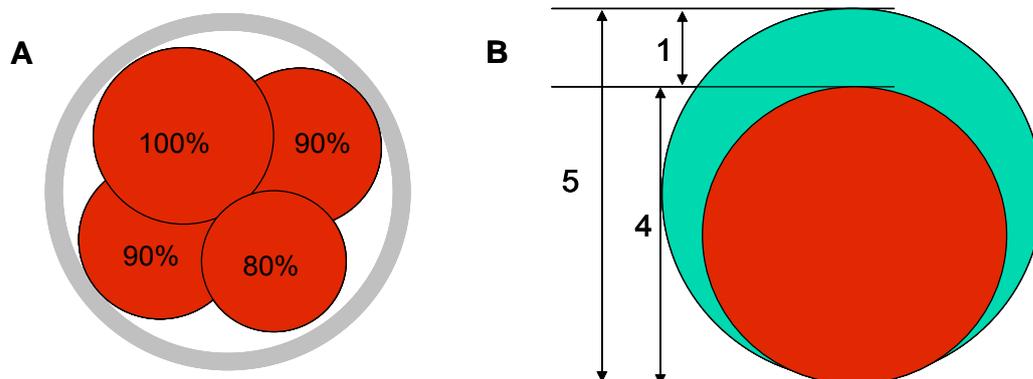
Es necesario evaluar el grado de fragmentación, el tamaño y la distribución de los fragmentos. Respecto al grado de fragmentación citoplasmática, éste puede oscilar entre 0 y 100%, no repercutiendo en la tasa de implantación si es inferior al 20-25% (Racowsky et al., 2003). En lo que respecta al tamaño y distribución de los fragmentos, son los de gran tamaño y los repartidos por todo

el embrión los que mayor influencia negativa tienen sobre la tasa de implantación (Alikani et al., 2000).

3.3.3 Simetría celular

El tamaño de las blastómeras también es un factor útil para estudiar el potencial de desarrollo e implantación de los embriones (Hardarson et al., 2001). Una división desigual origina blastómeras de diferente tamaño con distinta distribución del material genético, lo cual repercute negativamente en el potencial de implantación (Hnida et al., 2004). Según Hardarson et al. (2001), un preembrión de 4 células con división asimétrica es aquel en el que la diferencia entre el diámetro de las blastómeras mayor y menor supera el 20%. En la Figura 7 se muestra un esquema de un embrión que presenta asimetría entre sus blastómeras.

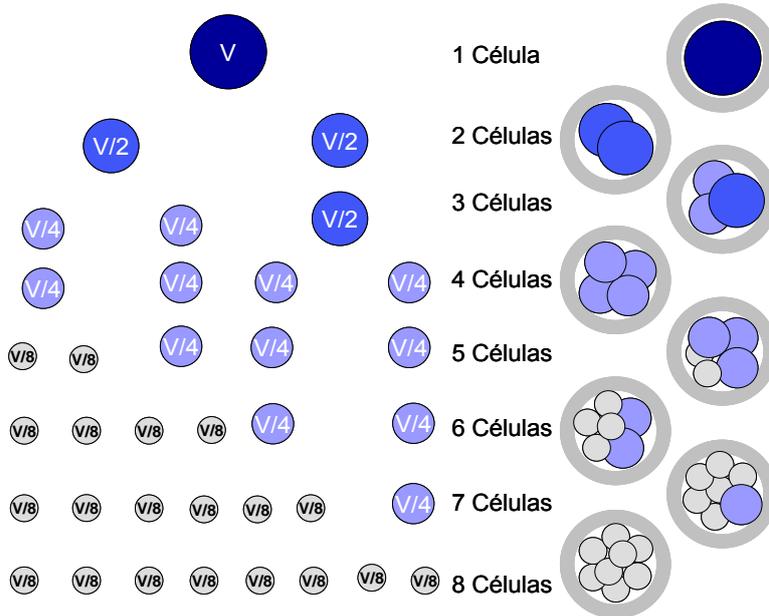
Figura 7: Asimetría en la división celular embrionaria.



En la Figura 7A se muestra un embrión en el que existe una diferencia de volumen del 20% entre sus blastómeras. Y en la Figura 7B se superponen 2 blastómeras con una diferencia de tamaño del 20%.

No obstante, a veces la asimetría entre blastómeras puede ser normal, pues se debe a una asincronía en la división celular. En la Figura 8 se muestra la asimetría embrionaria que corresponde con asincronía en la división celular para embriones en día+2 y día+3 (Holte et al., 2007).

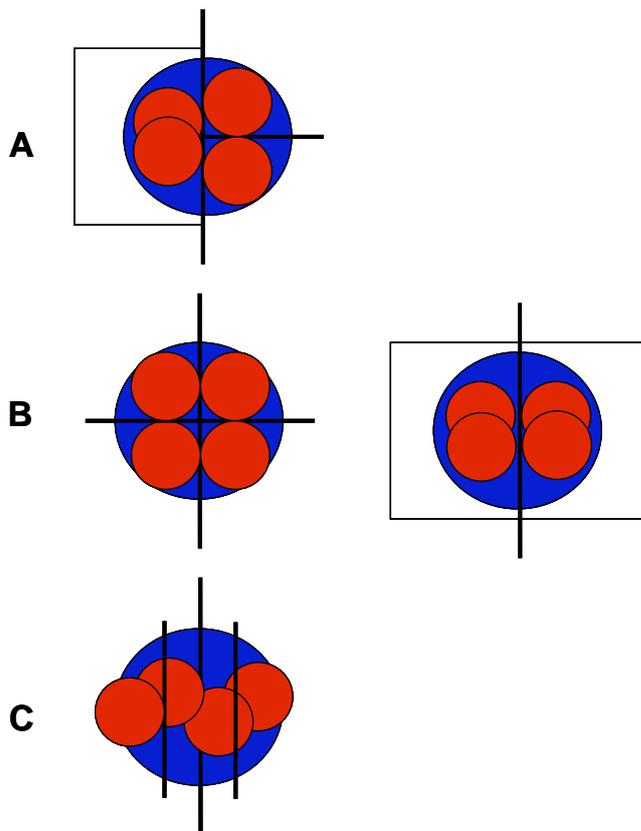
Figura 8: Embriones con asimetría entre sus blastómeras por asincronía en la división celular.



Es necesario saber distinguir una blastómera de un resto citoplasmático. Johansson et al. (2003) determinó el diámetro normal de las blastómeras, resultando de 65-70 μ en día+2 y algo menor en día+3 (55-60 μ). El diámetro límite por debajo del cual consideraron resto citoplasmático, ya que los "fragmentos" analizados no mostraron material genético, fue 45 μ en día+2 y 40 μ en día+3.

Otro aspecto de la división celular que se puede evaluar en el embrión en día+2 es el plano de división de las blastómeras. El embrión presentará una determinada disposición de las blastómeras en función de la orientación de los planos de división para pasar de 2 a 4 células (Figura 9).

Figura 9: Planos de división embrionaria.



Holte et al. (2007) encontraron mayores tasas de implantación cuando los planos de la segunda división son perpendiculares entre sí, como se muestra en la Figura 9A. En la Figura 9B y 9C los planos de la segunda división celular son paralelos entre sí, y perpendiculares (9B) o paralelos (9C) al plano de la primera división celular.

3.3.4 Visualización de núcleos y grado de multinucleación

La multinucleación cuando está en una blastómera se denomina binucleación cuando tiene dos núcleos o micronucleación cuando tienen más de 3 núcleos en una sola célula, cuando está en más de una blastómera se denomina multinucleación (Meriano et al., 2004).

La presencia de dos o más núcleos o de micronúcleos en una célula tiene una correlación directa con el incremento en la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias (Hardarson et al., 2001). La presencia de blastómeras

multinucleadas implica bajo potencial de implantación y aumento en la tasa de aborto (Meriano et al., 2004).

3.3.5 Sistemas de clasificación en evaluación embrionaria

Numerosos sistemas de clasificación embrionaria han sido creados teniendo en cuenta diversos aspectos de los comentados anteriormente, con la finalidad de seleccionar para la transferencia los embriones con mayor potencial de implantación (Alikani et al., 1999; Antczak et al., 1999; Avery et al., 1999; Veeck, 1999). Sin embargo, aunque existe cierto acuerdo sobre qué es un buen preembrión y qué es un mal preembrión, la ausencia de criterios comunes afecta tanto a los parámetros a evaluar como a los puntos de corte entre categorías.

Con la intención de unificar criterios de evaluación embrionaria la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha desarrollado un sistema de gradación de la calidad embrionaria para las transferencias en día+2 y día+3 de desarrollo embrionario (Arday et al., 2008). En las Figuras 10 y 11 se muestran los esquemas de esta clasificación morfológica para transferencias en día+2 y día+3.

Figura 10: Calidad embrionaria en día+2 según ASEBIR (Arday et al., 2008).

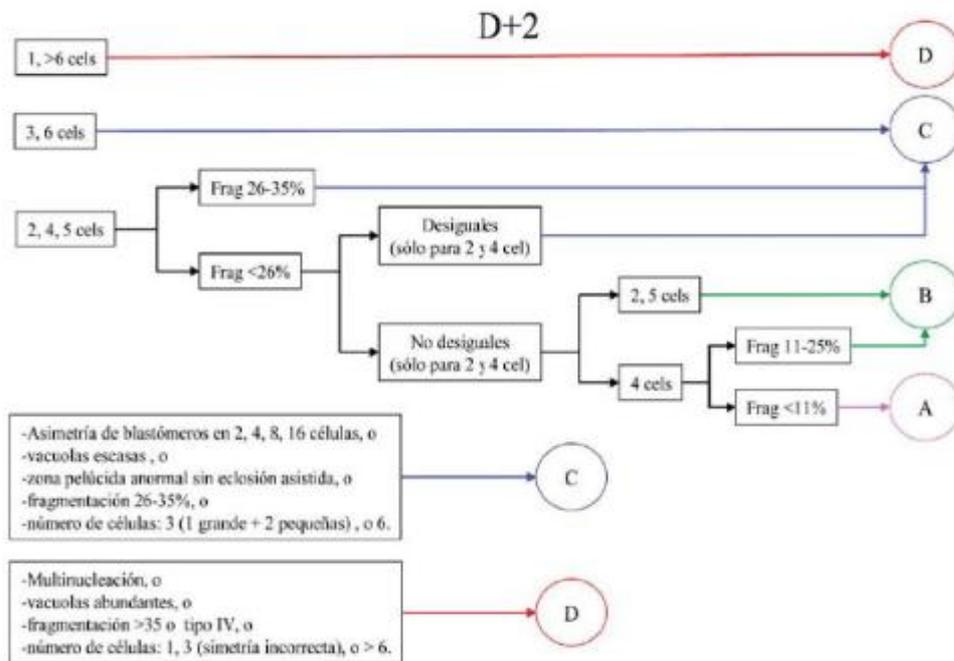
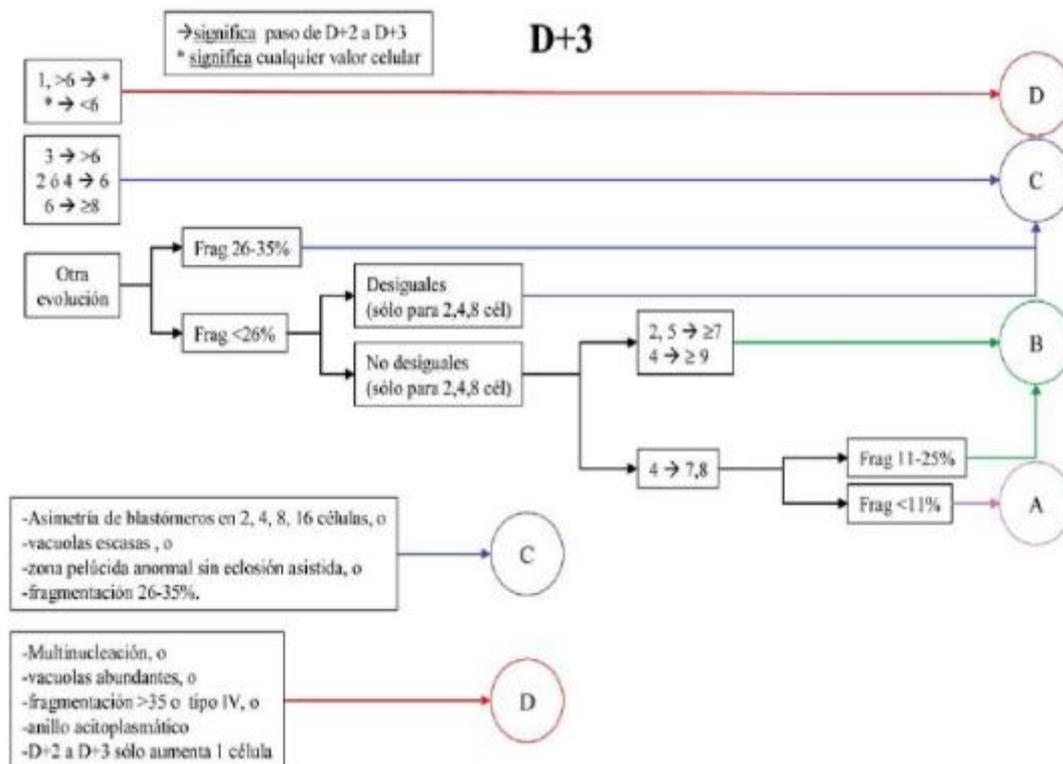


Figura 11: Calidad embrionaria en día+3 según ASEBIR (Arday et al., 2008).



4. Efectos adversos de la estimulación ovárica

4.1 Anomalías en el ovocito/embrión

La estimulación ovárica puede inducir anomalías en el ovocito, que pueden ser morfológicas (Balakier et al., 2002) o cromosómicas (Magli et al., 2006). Estudios preliminares sugieren que las aneuploidías en embriones pueden deberse no sólo a la edad materna avanzada (Hassold et al., 2001), sino también al tratamiento de estimulación ovárica empleado en FIV-ICSI (Sato et al., 2007).

Aunque comúnmente se emplea la morfología embrionaria para evaluar la calidad del embrión, la introducción de métodos de hibridación fluorescente ha permitido avanzar en el screening de aneuploidías cromosómicas (Thornhill et al., 2005). Un primer estudio (Hohmann et al., 2003) concluye que la calidad embrionaria, determinada por morfología, es mayor en el protocolo de estimulación ovárica mínima, mientras que los índices de embarazo son comparables al protocolo convencional.

Se ha tratado de establecer si existe relación entre el nivel de E2 alcanzado en ciclos de estimulación ovárica, que sería mayor en los ciclos de estimulación convencionales vs ciclos de estimulación mínima, y la calidad ovocito/embrión. Es posible que la explicación al hecho de que cifras de E2 más altas se relacionen con peores resultados reproductivos, se deba a que se producen altas concentraciones de andrógenos, que son precursores de los estrógenos, que a su vez favorecen un efecto deletéreo sobre la maduración y el desarrollo del folículo así como una mayor frecuencia de ovocitos degenerados (síndrome del folículo vacío) (Orvieto et al., 2004).

Algunos autores no encuentran asociación entre mayores niveles de E2 y peor calidad ovocito/embrión (Hammond et al., 2004; Ziebe et al., 2004). Otros afirman que en pacientes con mayores niveles de E2 se obtienen ovocitos y embriones de igual calidad pero menores tasas de gestación (Kolibianakis et al., 2004).

Aboulghar et al. (1997) y Fábregues et al. (2004), advierten que la calidad de los embriones está comprometida en las pacientes con mayores niveles de E2 que desarrollan SHO, pero cuando estudian las pacientes que desarrollan SHO y además tienen SOP, encuentran una disminución de la calidad ovocito/embrión en éstas pero no en el resto de pacientes con niveles de E2 elevados sin SOP.

Es difícil establecer el papel exacto de los estrógenos independientemente de las gonadotropinas y otros factores ováricos como el SOP. Por otra parte, la calidad embrionaria necesaria para un embarazo evolutivo, se relaciona con otros factores diferentes de la morfología embrionaria.

El aumento de la frecuencia de desórdenes de la impronta genómica se han relacionado con las técnicas de FIV-ICSI. No obstante hacen falta más estudios para esclarecer la relación entre el empleo de TRA y el desarrollo de síndromes relacionados con alteraciones en el proceso de impronta genómica (Amor et al., 2008; Lawrence et al., 2008; Owen et al., 2009), pero hay que tener en cuenta que pueden influir otros posibles factores como son la propia subfertilidad (Doornbos et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Ludwig et al., 2005), el proceso de inducción de la ovulación (Fortier et al., 2008; Sato et al., 2007), la interferencia física con los embriones durante la transferencia (Rivera et al., 2008) y aspectos relacionados con el cultivo in vitro de los embriones (Doherty et al., 2000; Fauque et al., 2007).

Market-Velker et al. (2010) obtienen en los resultados de su estudio que la estimulación ovárica altera la impronta genómica de los genes tanto maternos como paternos. Estas modificaciones de la impronta genómica fueron dosis-dependientes, con mayor número de aberraciones a mayor dosis de hormonas empleadas.

4.2 Alteración de la receptividad endometrial

El endometrio humano es un tejido dinámico que sigue un ciclo de proliferación, diferenciación y descamación (menstruación), en respuesta al ambiente endocrino y paracrino. En el ciclo natural, el ovario ovula un ovocito 14 días

antes de la menstruación. Si el ovocito es fertilizado, llega al endometrio en el estado de blastocisto (5-6 días), cuando la receptividad del endometrio es máxima, ocurriendo de manera sincronizada al desarrollo del embrión.

Durante el periodo de receptividad endometrial para la implantación del embrión, aparecen los pinópodos, protusiones en la superficie apical del epitelio endometrial con aspecto sacular. Estas estructuras celulares permiten el intercambio de fluidos, electrolitos y proteínas de bajo peso molecular, favoreciendo la aposición, es decir la interacción entre el embrión humano y las células del epitelio endometrial. Los pinópodos se desarrollan, alcanzan su máxima expresión y desaparecen en no más de 48 horas, constituyendo el marcador morfológico más importante del periodo de implantación, es decir, de la receptividad uterina para la implantación del embrión.

La implantación embrionaria es una limitación muy importante en los éxitos de las TRA. Por ello, diferentes autores se han preocupado por determinar los mecanismos que intervienen en dicho proceso.

Las tasas de implantación obtenidas en programas de donación de ovocitos son mayores que en mujeres bajo estimulación ovárica, sugiriendo que la estimulación ovárica podría tener un efecto negativo sobre el endometrio.

En pacientes que muestran una alta respuesta a las gonadotropinas, las concentraciones suprafisiológicas de E2 en el día de la administración de la hCG son deletéreas para la implantación del embrión. Se ha demostrado que mientras que dosis bajas de E2 mantienen un estado de receptividad en el endometrio, dosis altas causan un estado refractario del mismo en ratones (Ma et al., 2003). Los ciclos ováricos estimulados con altas dosis de gonadotropinas se caracterizan por el hallazgo histológico de un endometrio en estado de maduración avanzada y con reducida formación de pinópodos durante la implantación del embrión. Este estado de maduración del endometrio produce una asincronía embrión-endometrio y reduce las tasas de implantación en ciclos de FIV (Kolibianakis et al., 2003; Tavanitou et al., 2002). La receptividad uterina disminuye en la estimulación ovárica comparada con ciclos naturales, posiblemente debido a un endometrio en estado de maduración avanzada y a

una actividad disfuncional de los receptores de progesterona (Devroy et al., 2004; Okada et al., 2003).

Los niveles séricos elevados de progesterona en el día de administración de la hCG inducen alteraciones significativas en los genes de expresión del endometrio, que son los responsables del normal desarrollo y función del mismo (Labarta et al., 2011). También se asocian con reducción en las tasas de gestación (Bosch et al., 2010). La progesterona y el E2 pueden actuar de manera sinérgica o antagonista con respecto a varias funciones uterinas y genes de expresión (Lim et al., 2002). El estudio de Ma et al. (2003) realizado en ratones, determina que aún con niveles de progesterona elevados no se revierten los efectos adversos de altas dosis de estrógenos sobre la receptividad endometrial, indicando que determinadas funciones uterinas son más sensibles a los estrógenos e independientes de los niveles de progesterona. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de receptores de progesterona en el epitelio luminal cuando hay niveles altos de E2, hace que en esta situación, la progesterona no ejerza acción sobre dicho epitelio. El resultado de este estudio es que los niveles altos de estrógenos hacen que el útero se encuentre en un estado refractario, sugiriendo que sería posible ampliar el estado de receptividad uterina neutralizando el exceso de estrógenos mediante el uso de inhibidores de la aromatasa, mientras se realiza la estimulación con gonadotropinas. Extrapolamos la idea de que niveles más bajos de E2, obtenidos mediante el protocolo de estimulación suave frente al protocolo convencional, podrían repercutir positivamente sobre la receptividad endometrial, disminuyendo la tasa de fallos de implantación. Actualmente se precisan más estudios para confirmar esta hipótesis.

Algunos estudios demuestran que los perfiles de expresión génica del endometrio en los ciclos de estimulación convencional son muy diferentes de los de un ciclo natural (Horcajadas et al., 2007; Horcajadas et al., 2008). El patrón de expresión de los genes del endometrio es más similar al de un ciclo natural en los ciclos con antagonistas de la GnRH (Martínez-Conejero et al., 2007).

4.3 Alteración en la implantación de los embriones

La estimulación ovárica también puede afectar negativamente a la implantación de los embriones, ya que debido al aumento de concentración de hormonas, se producen más contracciones en el miometrio subendometrial. En cambio, en mitad de la fase lútea en ciclos naturales, cuando se debería producir la implantación, las contracciones se producen intensamente en todo el miometrio (Killick, 2007).

4.4 Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

El SHO severo lo desarrollan entre el 0,1 y 2% de las mujeres en las que se induce la ovulación (Busso et al., 2009), y constituye la complicación más grave a la que nos tenemos que enfrentar en pacientes sometidas a tratamientos inductores de la ovulación y a TRA.

Todos los protocolos de estimulación ovárica producen un cierto grado de hiperestimulación, normalmente sin consecuencias adversas para la paciente. Sin embargo, el SHO es una complicación iatrogénica de la inducción de la ovulación y de la estimulación ovárica en el contexto de TRA. Se caracteriza por aumento del tamaño ovárico, con grandes quistes en su interior y extravasación de líquido del espacio intravascular al tercer espacio.

Potencialmente puede poner en riesgo la vida de la paciente, con necesidad de hospitalización en el 0,33% de los casos (registro SEF 2009), siendo las complicaciones más graves el fallo hepatorenal, síndrome de distress respiratorio, hemorragia por rotura ovárica y tromboembolismo.

Clasificación de SHO

Según su momento de aparición se distinguen:

- SHO precoz: se relaciona con la respuesta ovárica a la estimulación y es un efecto agudo de la administración exógena de hCG. Normalmente ocurre dentro de los 9 días siguientes a la punción-aspiración de los ovocitos (Lee et al., 2010).

-
- SHO tardío: ocurre después de un periodo inicial de 10 días tras la punción-aspiración de los ovocitos. Se relaciona escasamente con la respuesta ovárica, siendo la producción endógena de hCG producida por la implantación del embrión (Lee et al., 2010), o la administración de hCG para el soporte de la fase lútea los principales factores etiológicos.

Otra clasificación del SHO se basa en los hallazgos ecográficos y en los parámetros de laboratorio, que son más objetivos que la sintomatología de la paciente. Se distinguen así SHO leve, moderado y severo (Golan et al., 1989).

- SHO leve: distensión y molestias abdominales. Puede acompañarse de náuseas y/o vómitos y/o diarrea.
- SHO moderado: similar a SHO leve, pero con evidencia ultrasónica de ascitis.
- SHO grave: similar a SHO moderado, y evidencia clínica de ascitis y/o hidrotórax o dificultad para respirar. Hemoconcentración, anomalías de coagulación y disminución en la perfusión y función renal. Se divide a su vez en:
 - o Severo: ascitis con presencia o no de hidrotórax, hemoconcentración (hematocrito mayor de 45% y recuento leucocitario mayor de 15.000 U/ μ l), oliguria (creatinina 1-1,5 mg/dL y aclaramiento de creatinina mayor de 50 ml/min), disfunción hepática, anasarca.
 - o Crítico: hematocrito mayor de 55% y recuento leucocitario mayor de 25.000 U/ μ l, creatinina mayor de 1,6 mg/dL y aclaramiento de creatinina menor de 50 ml/min, fallo renal, síndrome de distrés respiratorio del adulto, tromboembolismo.

Prevención del SHO

No es posible prevenir por completo la aparición del SHO, pero con la identificación de factores de riesgo y un manejo clínico cuidadoso de todas las pacientes, la incidencia puede reducirse significativamente.

- Prevención primaria

En la prevención primaria, se personaliza el protocolo de estimulación, adaptándolo a cada paciente después de valorar la existencia o no de factores de riesgo primarios: paciente joven, historia previa de respuesta elevada a gonadotropinas, desarrollo previo de SHO, SOP o características aisladas de SOP (Esinler et al., 2005; Lee et al., 2008).

Reducir la dosis y duración de la exposición a las gonadotropinas

No existe una dosis adecuada y única de FSH en tratamientos de FIV-ICSI, debido a la amplia variación de respuesta individual a las gonadotropinas, así como la gran variabilidad en los criterios empleados para determinar cuando se debe finalizar el tratamiento con gonadotropinas y desencadenar la maduración final de los ovocitos.

Reducir la exposición a gonadotropinas se puede lograr empleando protocolos de estimulación suave, donde la administración de FSH se retrasa hasta la mitad de la fase folicular tardía. Aunque cuando se comenzó a utilizar el ciclo natural o los protocolos de estimulación mínima las tasas de cancelación de ciclo eran altas debido a luteinización prematura, la introducción de antagonistas de la GnRH ha mejorado los resultados clínicos con estos protocolos, haciéndolos una opción de tratamiento para prevenir el SHO (Pelinck et al., 2005).

Protocolos con antagonistas de la GnRH

Cuando se introdujeron los agonistas de la GnRH en el tratamiento con gonadotropinas a final de los años 80, se produjo un incremento en la incidencia de SHO.

Al contrario que con el pretratamiento con agonistas de la GnRH, con los antagonistas se produce un bloqueo rápido de los receptores de GnRH de la hipófisis, no siendo necesaria su administración hasta justo antes de que se produzca el pico endógeno de LH, normalmente cuando un folículo alcanza 14 mm. La falta de supresión de FSH endógena durante la fase folicular precoz

significa que se necesita una dosis de FSH exógena reducida para la estimulación del ovario con antagonistas.

Se ha sugerido que los ciclos con antagonistas tendrían una menor incidencia de SHO comparados con ciclos con agonistas (Al-Inany et al., 2011; Griesinger et al., 2010).

Otros

Otros métodos de prevención primaria incluyen no administrar hCG para soporte de la fase lútea (Daya et al., 2008), maduración in vitro de los ovocitos (Suikkari et al., 2008), y el empleo de agentes insulino-sensibilizantes tales como la metformina en el SOP (Costello et al., 2006).

- Prevención secundaria

Los métodos de prevención secundaria se llevan a cabo en el contexto de una respuesta ovárica excesiva a la estimulación.

Coasting

Esta estrategia ha despertado en los últimos años 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 SHO. La palabra “coasting” es un anglicismo que significa “avanzar sin esfuerzo”, proceso que fue descrito por primera vez en 1995 por Sher et al., que consiste en el retraso en la aplicación de la hCG suspendiendo la administración de la FSH, hasta que los niveles de E2 desciendan a valores seguros. Los estudios indican que la tasa de gestación se mantiene y, aunque parece disminuirse el porcentaje de SHO grave, no lo evita en todos los casos (Abdalla et al., 2010; Farhi et al., 2010).

Una revisión en 2002 de 12 estudios con 493 pacientes, concluyó que el “coasting” no elimina el riesgo de SHO en las pacientes con alta respuesta, pero reduce la incidencia y la severidad del mismo (Delvigne et al., 2002). En una revisión Cochrane reciente, que identificó 16 estudios, de los cuales solo cuatro reunían los criterios de inclusión (D'Angelo et al., 2011), los autores

concluyeron que no había evidencia para determinar si el “coasting” es una estrategia efectiva para prevenir el SHO.

Reducir la dosis de hCG

Como la hCG es un factor de riesgo conocido para SHO, se ha sugerido usar dosis menores para desencadenar la ovulación. Dosis de 5000 UI, comparadas con la dosis estándar de 10000 UI, han sido suficientes para desencadenar la ovulación sin perjuicio de los resultados clínicos (Schmidt et al., 2004). Los resultados obtenidos con el protocolo de baja dosis de Cornell han sido prometedores. La dosis de hCG se determina de acuerdo a los niveles séricos de E2 en el día de administración de la misma. Se administran entre 3300-5000 UI de hCG a mujeres con niveles de E2 de 2000-3000 pg/mL (Chen et al., 2003) y las pacientes con niveles de E2 > 3000 pg/mL siguen en “coasting” hasta que los niveles descienden por debajo de 3000 pg/mL.

Un posible inconveniente para los protocolos de baja dosis de hCG es un potencial incremento de la tasa de cancelación de ciclo. Además, la mayoría de datos en cuanto a la efectividad de este protocolo en reducir las tasas de SHO, provienen de muestras pequeñas, no controladas, y/o estudios retrospectivos, por lo que se requieren estudios prospectivos randomizados y controlados.

Criopreservación de los embriones

En una revisión Cochrane, los autores concluyen que no hay evidencia suficiente que justifique la criopreservación electiva de todos los embriones vs transferencia de embriones en fresco, ya que no hay diferencias en la tasa de incidencia de SHO severo o moderado vs SHO leve o ausencia de SHO (D'Angelo et al., 2007).

No obstante, la criopreservación de embriones, cuando se desarrolla un SHO precoz, para ser descongelados y reimplantados en una fecha posterior, puede prevenir la aparición de un SHO tardío, evitando el aumento endógeno de hCG asociado con el embarazo.

Cancelación de ciclo

La cancelación de ciclo junto con la supresión de administración de hCG es el único método garantizado para la prevención del SHO precoz.

4.5 Embarazos múltiples

La complicación más importante asociada a las TRA es la gestación múltiple, dada su elevada frecuencia y las complicaciones asociadas para los recién nacidos. Los datos del registro europeo (European IVF Monitoring Consortium -EIM-) sitúan en 20,8% la tasa de parto múltiple en Europa (partos dobles más triples tras FIV-ICSI), mientras que en España era de 23,7% en 2006 (De Mouzon et al., 2010).

Un aspecto a tener en cuenta es el económico (Navarro et al., 2006). Los costes de los partos simples son mucho menores que los de los múltiples, ya que hay que sumar a éstos los costes de las complicaciones que pueden surgir en la madre como en los recién nacidos, en estos últimos en parte debidos a la mayor incidencia de partos pretérmino (Prieto, 2005), como el caso de la parálisis cerebral cuya incidencia afecta a 1,5% en el caso de los gemelares y 7-8% en el caso de los triples (Wimalasundera et al., 2003). Un estudio reciente estimó los costes de conseguir un embarazo mediante TRA, incluyendo los costes de atención materna y pediátrica posteriores, resultando un coste de 8.817 libras para el embarazo simple, 22.081 para el gemelar y 65.297 para el triple (Dixon et al., 2008).

Dada la evidencia científica de que en parejas de buen pronóstico las tasas de gestación no son mayores en mujeres que reciben tres embriones que en las que reciben dos, siendo sin embargo menores las tasas de gestación múltiple en las últimas (Dowling-Lacey et al., 2007), la tendencia actual es disminuir el número de embriones transferidos en FIV-ICSI, optando incluso por la transferencia de embrión único (SET) (Fiddlers et al., 2006; Gerris, 2007; Hyden-Granskog et al., 2005; Thurin et al., 2004).

Basándose en estos datos, en países como Suecia se implantó una política de transferencia en la que en mujeres menores de 38 años, con buena calidad embrionaria y en sus dos primeros ciclos, se indicaba SET.

Por lo tanto, dada esta tendencia, no parece necesario alcanzar un gran número de ovocitos en cada ciclo, sino los suficientes que nos permitan obtener uno o dos embriones de buena calidad.

4.6 Efectos a largo plazo: cáncer

La relación de la nuliparidad como factor de riesgo para cáncer de ovario, mama y endometrio es un hecho. Muchos estudios sugieren que esta asociación se debe en sí a la esterilidad, pero son pocos los estudios que valoran los posibles efectos del tratamiento de la esterilidad sobre el desarrollo de cáncer.

Los dos fármacos que más se emplean como inductores de la ovulación son el CC y las gonadotropinas. Ambos se han implicado en la etiología tanto de cáncer de mama como de ovario. Estos fármacos aumentan tanto los niveles de E2 como de progesterona, hormonas que afectan al desarrollo y crecimiento de los cánceres ginecológicos, incluido el de mama. Actualmente, la mayoría de los estudios no obtienen asociación significativa entre el uso de estos fármacos y un aumento del riesgo de desarrollar alguno de estos cánceres (Cusidó et al., 2007; Vlahos et al., 2010; Zreik et al., 2010). Sin embargo, algunos trabajos sí han encontrado indicios de un aumento del riesgo con el uso de grandes dosis de gonadotropinas o su uso durante un largo periodo de tiempo (Jensen et al., 2009; Van Leeuwen et al., 2011). Van Leeuwen et al. (2011) estudiaron una cohorte de 19.146 mujeres que habían recibido tratamiento de estimulación ovárica entre 1982 y 1995, y las compararon con un grupo de 6.006 mujeres con diagnóstico de esterilidad que no habían recibido tratamiento. Concluyen que el riesgo de tumores borderline de ovario es mayor en el grupo tratado, tras una media de seguimiento de 14,7 años.

Es necesario realizar más estudios sobre los efectos a largo plazo de estos fármacos, especialmente con la intención de introducir cambios en los

protocolos de tratamiento para FIV-ICSI, pareciendo prudente utilizar la menor dosis necesaria de hormonas, especialmente en casos de ciclos repetidos de FIV en la misma paciente.

4.7 Repercusiones económicas

Se está comenzando a cuestionar el uso de altas dosis de gonadotropinas debido al incremento del coste del tratamiento, y porque las altas dosis pueden causar efectos adversos sin evidencia de que haya beneficios (Nargund et al., 2007a). Además, la tecnología en la que se basa la FSHr no justifica el coste tan alto del tratamiento (Al-Inany et al., 2003).

En la decisión de las parejas que se someten a una TRA se tiene muy en cuenta el aspecto económico, que normalmente influye de manera negativa en la decisión. El coste de la FIV-ICSI todavía excede en muchos casos la capacidad económica de los pacientes, quienes en muchas ocasiones tienen que abandonar o no iniciar el tratamiento por ello, lo que al mismo tiempo se relaciona con una mayor carga psicológica para la pareja. Las políticas de salud deberían participar e invertir en la búsqueda de procedimientos que mejoren el balance coste-efectividad de los métodos de estimulación natural y suave.

4.8 Repercusiones psicológicas

La misión de la medicina reproductiva es la de ayudar a engendrar, pero evidentemente, en el esterilidad e infertilidad se dan, además de los problemas biológicos, con mayor frecuencia que en otras situaciones, la alteración de las esferas psicológica y social de los demandantes.

Los procedimientos diagnósticos y los tratamientos representan frecuentemente una fuente de estrés para la mayoría de las parejas.

En muchos países, etnias y niveles socio-económicos, las tradiciones y la presión social que sufren las mujeres-parejas infértiles pueden inducir a altos

niveles de morbilidad psiquiátrica (Upkong et al., 2006), llegando incluso al suicidio en algunos casos.

Algunos estudios describen un incremento del estrés marital y los divorcios en las parejas que siguen tratamiento de FIV (Wang et al., 2007), aunque otros estudios no lo han confirmado (Repokari et al., 2007). En el estudio de Repokari et al. se afirmaba que el estrés y las decepciones compartidas podían unir más a la pareja, pero sólo parecía ser cierto en parejas que finalmente obtenían un recién nacido. El estrés relacionado con el tratamiento influye bastante en la decisión de los pacientes para abandonarlo (Olivius et al., 2004). El abandono precoz del tratamiento priva a las parejas de las tasas de gestación acumuladas que se obtienen tras varios ciclos, y también influye en las tasas de éxito de los programas de FIV-ICSI.

5. Estimulación suave

5.1 Introducción

Como se ha expuesto previamente, la estimulación ovárica es un punto clave en los tratamientos de reproducción asistida.

Tradicionalmente, los protocolos empleados son complejos, caros, requieren semanas de inyecciones diarias y seguimiento intensivo de la respuesta ovárica. Estos protocolos conllevan posibles complicaciones como SHO (Humaidan et al., 2010), estrés emocional, tasas de abandono altas y molestias abdominales, entre otros (Fauser et al., 2005).

En 1996, Edwards et al. fueron los primeros en expresar preocupación con respecto al enfoque de la estimulación ovárica para FIV, y defendieron el uso de protocolos de estimulación más suaves.

La tendencia actual en cuanto a tratamientos de estimulación ovárica para FIV-ICSI, se basa en protocolos de estimulación que utilizan menos dosis de gonadotropinas, resultan por tanto más económicos y consiguen reducir los efectos adversos tales como el SHO. Así mismo, se disminuye el estrés y angustia que supone el tratamiento para la paciente (Nargund et al., 2007a). El objetivo de la estimulación suave es desarrollar protocolos más seguros y más aceptados por las pacientes, en los que los riesgos del tratamiento se minimicen (Ubaldi et al., 2007).

Afortunadamente, los avances en el conocimiento de la fisiología del ovario en relación al crecimiento y maduración folicular, en ecografía, embriología, endocrinología y la disponibilidad de antagonistas de la GnRH, han permitido iniciar la estimulación ovárica en un ciclo natural, sin forzar el reclutamiento folicular, y han dado la oportunidad de crear nuevos y mejores protocolos de estimulación ovárica, permitiendo cada vez mejores resultados con protocolos de mínima estimulación.

Una de las preocupaciones en cuanto a la aplicación de protocolos de estimulación suave en la práctica clínica habitual, es que la obtención de una

respuesta ovárica disminuida reducirá las tasas de embarazo. Sin embargo, la eficacia aumentada de las técnicas de laboratorio en FIV-ICSI y la tendencia actual, en algunos países del mundo, de limitar el número de embriones transferidos, han reducido la necesidad de obtener un gran número de ovocitos. También hay evidencia científica en cuanto a los potenciales efectos negativos de niveles suprafisiológicos de esteroides sobre la receptividad endometrial (Devroey et al., 2004), función del cuerpo lúteo (Beckers et al., 2006) y calidad del ovocito y del embrión (Baart et al., 2007), sugiriendo que la estimulación ovárica con dosis menores podría mejorar estos parámetros.

5.2 Protocolo de estimulación suave

En la estimulación suave, la administración de bajas dosis de gonadotropinas se retrasa hasta la fase folicular media-tardía para prevenir un descenso de los niveles de FSH endógena y conseguir así un desarrollo folicular múltiple. La disponibilidad de antagonistas de la GnRH nos permite prevenir un pico prematuro de LH. Un estudio piloto mostró que el desarrollo multifolicular se puede lograr incluso cuando se retrasa el inicio de la estimulación hasta el séptimo día de ciclo (de Jong et al., 2000). Sin embargo, el porcentaje de mujeres en las que se produce desarrollo multifolicular iniciando la estimulación en el séptimo día, en comparación con aquellas que la inician en el tercer o quinto día es menor (Hohmann et al., 2001). La administración de una dosis fija de 150 UI/día de FSHr, comparada con 100 UI/día, fue más efectiva en cuanto a desarrollo multifolicular cuando la estimulación ovárica se iniciaba en el quinto día de ciclo (de Jong et al., 2000).

Con el protocolo de estimulación suave las pacientes reciben menores dosis de FSH exógena. La diferencia de este protocolo se halla tanto en el reclutamiento como en la selección folicular. En el ciclo natural, una cohorte de folículos dependiente de las gonadotropinas continúa su desarrollo debido al pico endógeno de FSH. La selección de un único folículo dominante se produce en la fase media folicular a partir de este pool de 20-30 folículos antrales, siendo crucial en este proceso el descenso en los niveles de FSH (De Ziegler et al., 2007). La supresión de los folículos subdominantes se produce también a

través de mecanismos intraováricos. En la estimulación suave, se evita el descenso de los niveles de FSH, dando lugar al desarrollo de múltiples folículos dominantes, pero sin afectar las fases de reclutamiento y selección folicular iniciales. Sin embargo, con el protocolo de estimulación convencional, el reclutamiento y la selección natural de los folículos se anula completamente, y por lo tanto no se discrimina el crecimiento de folículos que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo. Por lo tanto, el protocolo de estimulación suave interfiere menos con la fisiología del ovario.

En un estudio prospectivo randomizado que incluía a 142 pacientes, la eficacia del protocolo de estimulación suave (150 UI/día), iniciando la estimulación el quinto día de ciclo y co-tratamiento con antagonistas de la GnRH cuando alguno de los folículos alcanzaba 14 mm, se comparó con un protocolo convencional de análogo largo de la GnRH y un protocolo estándar de antagonista de la GnRH con comienzo de la administración de FSH en la fase folicular precoz (Hohmann et al., 2003). El estudio concluyó que la tasa de gestación obtenida con el protocolo de estimulación suave era comparable a la del protocolo clásico de análogo largo de la GnRH, con una reducción en la duración de la estimulación y de la dosis total de FSH administrada.

La Figura 12 muestra un esquema que ilustra un protocolo de mínima dosis o de estimulación suave, iniciando el tratamiento con gonadotropinas el quinto día del ciclo y comenzando con el antagonista cuando algún folículo alcanza un diámetro ≥ 14 mm.

Figura 12: Esquema de protocolo de estimulación suave.



5.3 Ventajas del protocolo de estimulación suave

5.3.1 Reducción de aneuploidías en el embrión

El proceso de reproducción humana es relativamente ineficaz. La probabilidad de conseguir un embarazo espontáneo después de un coito programado es del 20-30%, mucho menor que en otras especies. Además, más de un 30% de los embriones humanos no se desarrollan hacia fetos viables, debido a anomalías cromosómicas (Vorsanova et al., 2005). También hay que tener en cuenta que la incidencia de las aneuploidias en el embrión aumenta con la edad materna (Hassold et al., 2001).

Las técnicas de FIV-ICSI constituyen el último escalón en los tratamientos de infertilidad. Después de un tratamiento de FIV-ICSI, se seleccionan los embriones de mejor calidad para ser transferidos. Aunque la morfología del embrión es un método que se emplea comúnmente para evaluar la calidad del mismo, es subjetivo y sólo nos da información limitada en lo que concierne a los cromosomas. La introducción de la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) permite el screening de los embriones en busca de aneuploidías cromosómicas, un procedimiento al que se conoce como Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) (Thornhill et al., 2005). Hoy día, el empleo de tecnologías como los microarrays de SNP (por su nombre en inglés, Single Nucleotide Polymorphism) proporcionan resultados más completos y consistentes que la FISH (Treff et al., 2010).

Se han realizado estudios con el propósito de conocer cómo afectan los distintos protocolos de estimulación ovárica a la segregación cromosómica en ovocitos y embriones. En algunos de ellos, los resultados indican que a pesar de que con el protocolo de estimulación suave se obtiene un número menor de ovocitos y embriones, la proporción de embriones cromosómicamente normales con respecto al protocolo de estimulación clásico está aumentada significativamente. El número de embriones cromosómicamente normales obtenidos por mujer (aproximadamente 2) es similar en ambos grupos. Además, el análisis de 2 células por embrión sugiere que el incremento de

anomalías cromosómicas observado en el protocolo tradicional se debe principalmente a una mayor incidencia de mosaicismos (Baart et al., 2007).

5.3.2 Menor alteración en la receptividad endometrial

A pesar del desarrollo de la tecnología implicada en la FIV-ICSI, las tasas de gestación obtenidas aún no son tan altas como se desearía. La receptividad endometrial es un importante punto a tener en cuenta, porque en algunas ocasiones, las tasas de gestación bajas en los programas de FIV-ICSI se deben a fallos en la implantación como resultado de la transferencia de embriones en endometrios no receptivos. Los niveles de estrógenos altos, resultantes de la estimulación de los ovarios mediante la administración de gonadotropinas en técnicas de FIV-ICSI, pueden ser una de las causas de esta falta de receptividad endometrial (Yu et al., 2000). La receptividad uterina que se establece por la interacción coordinada de la progesterona ovárica con los estrógenos, es fundamental para la implantación exitosa del embrión y, como resultado, el embarazo.

Hay estudios que confirman que con niveles decrecientes de E2, en el periodo preimplantacional, utilizando una pauta de estimulación step-down, se aumenta la receptividad uterina en humanos. Sin embargo, también hay estudios con evidencia de que la estimulación ovárica no afecta adversamente a la receptividad endometrial ni a la tasa de implantación en programas de FIV (Levi et al., 2001), sugiriendo que el rango de niveles de estrógenos es menos restrictivo en humanos que en ratones. No obstante, la información obtenida de las investigaciones en ratones constituye una base para proseguir los estudios encaminados a intentar mejorar las tasas de implantación en FIV-ICSI humana, aportando conocimientos que permitan conseguir el máximo estado de receptividad endometrial, pudiendo evitar la necesidad de transferencia embrionaria múltiple y mejorando las tasas de gestación.

5.3.3 Menor incidencia de SHO

Aunque, actualmente, no es posible prevenir completamente la aparición de un SHO, su incidencia puede reducirse significativamente, mediante algunas estrategias de prevención, entre las que los protocolos de estimulación suave tienen su lugar. La reducción a la exposición de altas dosis de gonadotropinas se ha mostrado eficaz en prevenir el SHO.

Reducir la exposición a gonadotropinas se puede lograr empleando protocolos de estimulación mínima, donde la administración de FSH se retrasa hasta la mitad de la fase folicular tardía.

Un estudio randomizado comparó un protocolo de estimulación suave con transferencia de embrión único con el protocolo tradicional de agonista largo con transferencia de 2 embriones en 404 pacientes catalogadas como normorrespondedoras (Heijnen et al., 2007). Con el protocolo de estimulación suave se administraba FSH desde el día quinto del ciclo y se comenzaba con antagonista de la GnRH cuando al menos uno de los folículos tenía 14 mm de diámetro, observado por ecografía. La incidencia de SHO fue de 6 de 444 (1,4%) en el protocolo de estimulación suave y de 12 de 325 (3,7%) en el protocolo de agonista largo. Las tasas de recién nacido vivo después de 1 año fueron similares para los dos grupos (43,4% vs 44,7%), pero hubo menos embarazos múltiples con la estimulación suave (0,5% vs 13,1% $p < 0,001$). Como los embarazos múltiples son un factor de riesgo para el SHO, este protocolo contribuiría a reducir el riesgo de SHO.

5.3.4 Mejor relación coste-efectividad

Habitualmente los estudios que analizan desde el punto de vista económico la estimulación suave frente a protocolo tradicional, lo hacen combinando SET y el protocolo de estimulación suave (Eijkemans et al., 2006; Polinder et al., 2008). El motivo por el que combinan estimulación suave y SET es la posibilidad de realizar más ciclos, con el protocolo de estimulación suave frente a protocolo tradicional, en el mismo periodo de tiempo, por la mejor tolerancia de las pacientes. Cuantos más ciclos se realicen aumentan las probabilidades

de embarazo, compensando así la reducción de la tasa de recién nacido por ciclo debida al co-tratamiento con antagonistas de la GnRH y a la transferencia de un único embrión frente a 2 o más embriones.

En ambos estudios la ventaja de la estimulación suave es la reducción de los costes directos e indirectos del tratamiento, debido principalmente a la reducción de los costes derivados de la morbilidad de los partos gemelares que se reducen con este tipo de estimulación.

Los resultados en cuanto a tasas de gestación son similares en ambos protocolos evaluados, pero reduciendo las molestias de las pacientes, los embarazos múltiples y los costes en el protocolo de estimulación suave comparado con el tratamiento estándar que incluye estimulación convencional y transferencia de 2 embriones (Heijnen et al., 2007). El estudio incluía 404 pacientes (casi 800 ciclos de FIV) y se observó que debido a la corta duración del tratamiento por ciclo se necesitaba menor medicación y había una reducción en las gestaciones gemelares. El protocolo de estimulación suave resultó en iguales oportunidades de recién nacido a término después de un año de tratamiento, mientras se reducían significativamente los costes y las gestaciones múltiples.

5.3.5 Tasa de embarazo

En algunas clínicas se ha reservado el uso de la estimulación mínima únicamente a las mujeres con buena reserva ovárica, aunque los estudios muestran iguales o incluso mejores resultados que con el protocolo tradicional en mujeres con pobre reserva ovárica (Morgia et al., 2004). Pelinck et al., (2006) concluyen que la estimulación mínima parece ser adecuada para todas las indicaciones, con una tasa acumulada de embarazo después de 3 ciclos del 20,8% por paciente.

En los últimos años se han publicado estudios que muestran los resultados obtenidos con la aplicación de protocolos de estimulación suave. En un estudio randomizado en el que todas las pacientes tenían menos de 38 años (Heijnen et al., 2007), se obtuvo una tasa acumulada de recién nacidos vivos al año de

tratamiento similar entre las pacientes que siguieron un protocolo de estimulación suave y SET (43,4%), y aquellas que recibieron estimulación estándar y con transferencia de dos embriones (44,7%). Además el grupo de estimulación suave estaba más satisfecho con el tratamiento y el coste del mismo se reducía significativamente.

5.3.6 Aspectos psicológicos

Durante tiempo, los resultados de las intervenciones médicas se han valorado mediante tasas de supervivencia, mortalidad, morbilidad y, en medicina reproductiva, en tasas de gestación. No obstante, las intervenciones médicas también influyen en otros aspectos de la vida, todos incluidos bajo el concepto de —calidad de vida—. Las medidas para determinar la calidad de vida incluyen medidas generales sobre la satisfacción de las pacientes, múltiples medidas sobre el estatus de salud (que incluyen aspectos sociales, psicológicos y físicos), medidas específicas destinadas a captar problemas asociados con enfermedades y enfocadas a un resultado psicológico concreto, como ansiedad o depresión.

Los tratamientos de FIV-ICSI en ocasiones se acompañan de momentos de gran estrés e inestabilidad emocional. Esta inestabilidad emocional se debe no sólo a estímulos físicos, sino también al hecho de que las pacientes oscilan entre sentimientos de esperanza de un embarazo exitoso y el miedo al fallo. Cuando se escogen resultados psicológicos, para incluirlos en una evaluación de los efectos de FIV-ICSI, se deben registrar las emociones negativas y el estado de ánimo.

La estimulación suave tiene también el objetivo de procurar un tratamiento más corto y sencillo para la paciente, con una disminución de las complicaciones, y que reduzca el estrés asociado al mismo. Los protocolos de estimulación suave han mostrado menores tasas de abandono del tratamiento (Heijnen et al., 2007).

Los protocolos de estimulación suave también se han asociado con menores síntomas de depresión después de fallo del tratamiento que con la estimulación

estándar (de Klerk et al., 2007). Como consecuencia, la estimulación suave no sólo reduce las repercusiones psicológicas del tratamiento de FIV-ICSI, sino que también tiene un efecto positivo en el impacto de las tasas de éxito acumuladas, debido a la menor tasa de abandono del tratamiento en las parejas con un ciclo fallido.

Justificación

En la actualidad, el protocolo de estimulación ovárica para FIV-ICSI que más se emplea es el protocolo largo con agonistas de la GnRH combinado con altas dosis de FSH exógena. Este tipo de protocolo requiere administración diaria de la medicación durante semanas, múltiples visitas de seguimiento, además de suponer un coste económico considerable para la pareja y para el sistema sanitario. La complejidad del tratamiento y el gasto económico influyen negativamente por el estrés de la pareja, favoreciendo los errores y el abandono del tratamiento, lo que perjudica a la tasa de gestación.

Se han descrito efectos indeseados asociados al tratamiento. En algunos casos dependientes de la dosis de gonadotropinas administradas, tales como anomalías en el ovocito/embrión, alteración de la receptividad endometrial y en el proceso de implantación de los embriones. Así mismo, existe el riesgo potencial de desarrollar SHO. Además, hay controversia sobre los efectos de estos tratamientos sobre la salud a largo plazo, como por ejemplo desarrollo de cáncer ginecológico.

La realización de una revisión bibliográfica sobre este tema, muestra que el empleo de protocolos de estimulación ovárica mínima mejora los parámetros anteriormente nombrados, sin afectar sensiblemente la tasa de embarazo.

En nuestro centro se realizan un elevado número de tratamientos de estimulación ovárica para FIV-ICSI (701 ciclos iniciados en 2010), con el coste de medicación, personal y material que conlleva. La implantación de un protocolo de estimulación ovárica utilizando dosis mínimas de gonadotropinas y durante menos días que el convencional, manteniendo similar tasa de gestación, supondría una reducción del coste económico de cada ciclo, además de una posible disminución de los efectos secundarios, tales como el SHO.

Con este trabajo de investigación se pretende contrastar si en nuestro medio es aplicable el protocolo de estimulación ovárica mínima con gonadotropinas y antagonistas de la GnRH para ciclos de FIV-ICSI, con resultados similares a los que obtenemos con el empleo del protocolo convencional con gonadotropinas y agonistas de la GnRH.

Objetivos

El objetivo general fue evaluar en nuestro medio los resultados de los ciclos de FIV-ICSI empleando un protocolo de estimulación ovárica con mínimas dosis de gonadotropinas y antagonistas de la GnRH y compararlos con los resultados del protocolo clásico con dosis convencionales de gonadotropinas y agonistas de la GnRH.

Los objetivos específicos fueron comparar en ambos grupos:

- Las variables de estimulación de los ciclos de desarrollo folicular múltiple.
- Los parámetros de laboratorio de los ciclos de desarrollo folicular múltiple.
- Los resultados de las gestaciones.
- Las complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación.
- El coste de medicación del tratamiento de estimulación.

Metodología

1. Población de referencia

Pacientes que realizaron FIV-ICSI como TRA en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada entre los años 2007 a 2010.

2. Población de estudio

Pacientes con diagnóstico de esterilidad de causa desconocido, factor masculino o femenino, que aceptaron participar en el estudio.

3. Criterios de inclusión

- Edad igual o inferior a 35 años.
- Índice de masa corporal entre 20 y 29 Kg/m².
- Historia de ciclos menstruales normales (frecuencia de menstruación cada 21- 35 días con una duración del sangrado entre 2 y 7 días).
- Seminograma apto para ICSI.
- Exploración ginecológica y ecografía pélvica normal (sin anomalías cervicales, uterinas ni ováricas).

4. Criterios de exclusión

- Antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias.
- Antecedentes personales de enfermedad sistémica o crónica.
- Historia de abortos de repetición (2 o más abortos consecutivos).
- Realización de ciclos de FIV previos.

Las parejas sólo podían participar en el estudio en un único ciclo.

El estudio se llevó a cabo en conformidad con la Normas de Buena Práctica Clínica y contó así mismo con la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario —Virgen de las Nieves” de Granada.

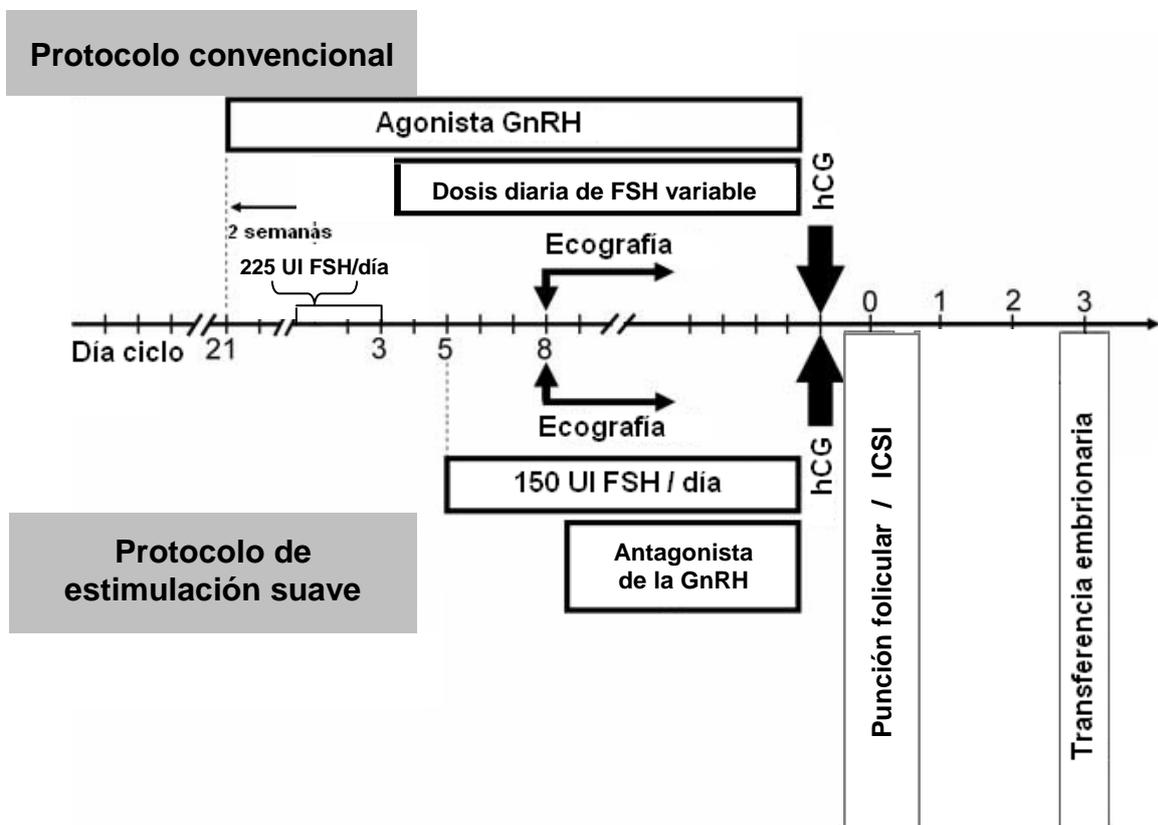
Las parejas que deseaban participar en el estudio debían firmar el consentimiento informado (Anexo 1).

5. Diseño del estudio

Se realizó un ensayo clínico controlado y aleatorizado, en el que las pacientes fueron asignadas a uno de estos dos grupos:

- Grupo de estimulación suave: ciclo de estimulación de la ovulación para FIV-ICSI con protocolo de bajas dosis de FSH y co-tratamiento con antagonistas de la GnRH.
- Grupo de estimulación convencional: ciclo de estimulación de la ovulación para FIV-ICSI con protocolo convencional con altas dosis de FSH y agonistas de la GnRH.

Figura 13: Representación esquemática de los dos protocolos de estimulación ovárica para ciclos de FIV-ICSI.



Después de que la pareja aceptó participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado, se realizó la aleatorización mediante sobres cerrados opacos a uno u otro grupo, que fueron abiertos por el médico.

Las pacientes que siguieron el protocolo de estimulación convencional, comenzaron el tratamiento diario con agonistas de la GnRH (Synarel®) el día 21 del ciclo menstrual previo y dos semanas después se inició la estimulación con dosis variables de FSHr (Gonal®), vía subcutánea (225 UI/día los tres primeros días y valoración de la dosis de manera individual durante el resto del tratamiento). La primera revisión ecográfica en consulta para valorar la respuesta folicular se realizó al octavo día del ciclo y a partir de entonces cada dos días.

Las pacientes que siguieron el protocolo de estimulación suave, comenzaron el tratamiento el día quinto del ciclo menstrual con 150 UI/día vía subcutánea de

FSHr (Gonal[®]) y controles ecográficos cada dos días a los tres días de iniciar la estimulación. Se instauró tratamiento con antagonistas de la GnRH (Orgalutran[®]) a dosis de 0,25 mg/día vía subcutánea, cuando se observó algún folículo \geq de 14 mm de diámetro por ecografía.

Cuando se visualizaron 4 o más folículos \geq 18 mm de diámetro, se administró una dosis única vía subcutánea de 250 mcg de gonadotropina coriónica (Ovitrelle[®]) para inducir la maduración ovocitaria final. La recuperación ovocitaria se realizó por punción folicular ecoguiada vía transvaginal 36 horas después de la inyección de hCG. Se realizó ICSI en todos los ovocitos. Al tercer día de la punción folicular, se hizo la transferencia embrionaria a través del canal cervical, de dos embriones (uno en caso de no tener disponibles dos embriones).

Se consideró embrión morfológicamente normal (al tercer día de la punción folicular) aquel constituido por \geq 7 células simétricas y compactadas, ninguna célula multinucleada y con menos de un 25% de fragmentación, acorde con lo establecido en los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (Ardoy et al., 2008) (Figura 13).

6. Variables a analizar

- Edad (años).
- Índice de masa corporal (IMC) (Kg/m^2).
- Meses de esterilidad.
- FSH basal (UI).
- Indicación del tratamiento de fertilidad. Puede tomar tres valores:
 - Factor masculino.
 - Factor desconocido.
 - Factor femenino.
- Dosis total de FSH empleada (UI).
- Envases de antagonista de la GnRH empleados (número de jeringas precargadas).

-
- Envases de agonista de la GnRH.
 - Días de estimulación necesarios (desde el inicio de la administración de FSH hasta la punción folicular).
 - Niveles de estradiol sérico (pg/mL) el día de administración de la hCG.
 - Número de ovocitos obtenidos tras la punción folicular.
 - Número de ovocitos maduros (en metafase II de división celular).
 - Número de ovocitos fecundados.
 - Número total de embriones obtenidos.
 - Número de embriones de buena calidad según la clasificación de ASEBIR (Arday et al., 2008).
 - Número de embriones transferidos.
 - Número de embriones congelados.
 - Consecución de embarazo bioquímico (considerado como tal cuando el test de embarazo es positivo a los 15-20 días tras la transferencia embrionaria). Con valores si/no.
 - Consecución de embarazo a término (considerado como tal aquel en el que se produce el nacimiento de un recién nacido). Con valores si/no.
 - Aborto. Con valores si/no.
 - Tipo de aborto. Puede tomar dos valores:
 - Aborto químico: aquél que acontece desde antes de la identificación ecográfica del saco ovular. El diagnóstico se realiza por la positividad en la determinación de la β -hCG.
 - Aborto clínico: expulsión o extracción de su madre de un embrión o de un feto de menos de 500 gramos de peso, o de otro producto de gestación de cualquier peso o edad gestacional, independientemente de si el aborto fue espontáneo (embrión o feto no viable) o provocado.
 - Embarazo múltiple (2 o más sacos gestacionales por ecografía). Con valores si/no.

-
- Cancelación del ciclo (cese del tratamiento con gonadotropinas y no realización de punción folicular). Con valores si/no.
 - Causa de cancelación del ciclo (si se canceló). Puede tomar tres valores:
 - Baja respuesta: cuando el número de folículos obtenidos con el ciclo fue ≤ 3 .
 - Alta respuesta: cuando el número de folículos obtenidos fue ≥ 20 , o bien los niveles de estradiol fueron superiores a 5000 pg/ml previos a la administración de hCG.
 - Otros: presencia de quiste ovárico durante el tratamiento, error en la administración del tratamiento y ovulación espontánea.
 - SHO que precisó ingreso y tratamiento. Con valores si/no.
 - Necesidad de realizar "eoasting". Con valores si/no.
 - Coste de FHS (€).
 - Coste del antagonista de la GnRH (€).
 - Coste del agonista de la GnRH (€).
 - Coste total de la medicación del tratamiento de estimulación ovárica (€).

7. Recogida de datos / Fuentes de información

La recogida de datos se realizó mediante la creación de una hoja de datos con todas las variables motivo del análisis (Anexo 2). Los datos fueron almacenados en una base informática tipo Access (Microsoft® Access, 2003) para seguimiento y posteriormente se hizo una revisión de las historias clínicas de las pacientes incluidas en el estudio.

El análisis de datos se hizo mediante el programa SPSS-15 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc®).

8. Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos de los grupos de estudio, mediante el cálculo de la media, desviación estándar, mínimo, máximo y número de casos para las variables cuantitativas, y mediante la distribución de frecuencias absolutas y relativas para las 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.

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

1. Descripción de la muestra

En el grupo de estimulación suave se incluyeron 81 pacientes y 85 en el grupo de estimulación convencional, llegando a la punción folicular 69 y 78 pacientes respectivamente.

La media de edad en la punción para el grupo de estimulación suave fue de $31 \pm 2,9$ años, mientras que el grupo de estimulación convencional fue de $30 \pm 2,9$ años ($p < 0,05$).

El IMC medio fue similar en ambos grupos: $23,4 \pm 3,1$ en el grupo de estimulación suave y $24,7 \pm 3,5$ en el grupo de estimulación convencional.

Los meses de esterilidad primaria en el grupo al que se aplicó protocolo de estimulación suave fueron $41,1 \pm 28,7$ frente a $52,7 \pm 25,9$ en el grupo de estimulación convencional ($p < 0,01$).

El nivel basal de FSH fue similar en ambos grupos: $5,8 \pm 1,8$ en el grupo de estimulación suave y $6 \pm 1,8$ en el grupo de estimulación convencional.

Tabla 1: Descripción de la muestra.

	E. suave (n=81) media±ds (rango)	E. convencional (n=85) media±ds (rango)	p
Edad (años)	$31 \pm 2,9$ (24 - 35)	$30 \pm 2,9$ (21-35)	< 0,05
IMC	$23,4 \pm 3,1$ (19 - 29)	$24,7 \pm 3,5$ (20,4-29)	ns
Meses de esterilidad primaria	$41,1 \pm 28,7$ (12 - 180)	$52,7 \pm 25,9$ (12-180)	< 0,01
Nivel basal de FSH (UI)	$5,8 \pm 1,8$ (2 - 8,7)	$6 \pm 1,8$ (2,4 - 9,3)	ns

n: número de casos

media ± ds (rango): media aritmética ± desviación estándar (rango)

ns: no significativo

2. Indicación del tratamiento de fertilidad

No hubo diferencias en cuanto a la causa de indicación del tratamiento de fertilidad en ambos grupos. La Tabla 2 muestra la homogeneidad en cuanto a la indicación predominante del tratamiento entre las pacientes que recibieron el protocolo de estimulación suave y las pacientes que recibieron el protocolo convencional.

Tabla 2: Indicación del tratamiento de fertilidad.

	E. suave (n=81) n (%)	E. convencional (n=85) n (%)	p
Factor masculino	39 (48,1%)	41 (48,2%)	ns
Factor desconocido	38 (46,9%)	42 (49,4%)	ns
Factor femenino	4 (4,9%)	2 (2,4%)	ns

n (%): número de casos (porcentaje)

ns: no significativo

3. Variables de la estimulación ovárica

La dosis total de gonadotropinas empleadas, los días de estimulación y los niveles de estradiol el día de la administración de la hCG fueron significativamente inferiores en el grupo de estimulación suave ($p < 0,001$) (Tabla 3).

Tabla 3: Variables de estimulación ovárica.

	E. suave (n=69) media±ds (rango)	E. convencional (n=78) media±ds (rango)	p
Dosis total FSH (UI)	1.199,1 ± 325 (450 – 2.100)	2.071,2 ± 701,8 (1.050 – 4.425)	< 0,001
Días de estimulación	8 ± 2,2 (3-14)	10,8 ± 2,3 (6 - 17)	< 0,001
E2 el día de administración de hCG (pg/mL)	1.805,5 ± 1.201,4 (229 – 4.848)	2.837 ± 1.581,9 (494 – 8.928)	< 0,001

n: número de casos

media ± ds (rango): media aritmética ± desviación estándar (rango)

4. Parámetros de laboratorio

Se obtuvieron menos ovocitos por punción en el grupo de estimulación suave ($8,5 \pm 5,2$) frente al grupo de estimulación convencional ($10,2 \pm 4,6$) ($p < 0,05$).

No hubo diferencias en cuanto a la media del número de ovocitos en metafase II, el número de ovocitos fecundados, el número de embriones de buena calidad (según la clasificación ASEBIR), el número de embriones transferidos y el número de embriones congelados (Tabla 4).

Tabla 4: Parámetros de laboratorio.

	E. suave (n=69) media±ds (rango)	E. convencional (n=78) media±ds (rango)	p
Nº de ovocitos por punción	8,5 ± 5,2 (0 -20)	10,2 ± 4,6 (1-20)	< 0,05
Nº de ovocitos en metafase II	7,2 ± 4,8 (0 -19)	8,4 ± 4,4 (1-19)	ns
Nº de ovocitos inyectados	7,2 ± 4,8 (0-19)	8,4 ± 4,4 (1-19)	ns
Nº de ovocitos fecundados	4,1 ± 3,2 (0-13)	5 ± 3 (0-14)	ns
Nº de embriones	3,9 ± 3 (0-13)	4,6 ± 2,9 (0-13)	ns
Nº de embriones de buena calidad	2 ± 1,2 (1-6)	2,1 ± 1,5 (1-7)	ns
Nº de embriones transferidos	1,6 ± 0,7 (0-2)	1,8 ± 0,6 (0-3)	ns
Nº de embriones congelados	2,7 ± 1,4 (1-5)	2,7 ± 1,6 (1-6)	ns

n: número de casos

ns: no significativo

media ± ds (rango): media aritmética ± desviación estándar (rango)

5. Resultados de gestaciones

La tasa de gestación en el grupo de estimulación suave fue de 28,4% por ciclo, 33,3% por punción y 35,9% por transferencia, frente a una tasa de gestación en el grupo de estimulación convencional de 35,3% por ciclo, 38,5% por punción, y 40,5% por transferencia (diferencias estadísticamente no significativas) (Tabla 5).

La tasa de recién nacido en el grupo de estimulación suave fue de 21% por ciclo, 24,6% por punción y 26,6% por transferencia, frente a una tasa de recién nacido en el grupo de estimulación convencional de 25,9% por ciclo, 28,2% por punción, y 29,7% por transferencia (diferencias estadísticamente no significativas) (Tabla 5).

Tampoco hubo diferencias en cuanto a la tasa de aborto de ambos grupos. Hubo 6 abortos (26,1%) en el grupo de estimulación suave, cuatro abortos bioquímicos y dos abortos retenidos. En el grupo de estimulación convencional hubo 7 abortos (23,3%), de los cuales fueron dos abortos bioquímicos, tres abortos retenidos y dos interrupciones voluntarias del embarazo, una por malformación fetal y otra por trisomía 21 (Tabla 5).

Hubo un caso de embarazo ectópico en el grupo de estimulación convencional.

El embarazo fue gemelar en 5 casos (29,4%) en el grupo de estimulación suave y 6 casos (27,3%) en el grupo de estimulación convencional, diferencias no significativas (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados de gestaciones.

	E. suave n=81 n (%)	E. convencional n=85 n (%)	p
Pacientes puncionadas	69 (85,2%)	78 (91,8%)	ns
Pacientes transferidas	63 (77,8%)	74 (87,1%)	ns
Gestantes	23	30	—
Gestantes por ciclo	28,4%	35,3%	ns
Gestantes por punción	33,3%	38,5%	ns
Gestantes por transferencia	35,9%	40,5%	ns
Recién nacidos	17	22	—
Recién nacido por ciclo	21%	25,9%	ns
Recién nacido por punción	24,6%	28,2%	ns
Recién nacido por transferencia	26,6%	29,7%	ns
Abortos (bioquímicos + clínicos)	6 de 23 (26,1%)	7 de 30 (23,3%)	ns
Gestaciones gemelares	5 de 17 (29,4%)	6 de 22 (27,3%)	ns

n (%): número de casos (porcentaje)

ns: no significativo

6. Complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación

No hubo diferencias significativas en cuanto a la tasa de cancelación de ciclos en ambos grupos (14,8% de los ciclos de estimulación suave frente al 8,2% de los ciclos de estimulación convencional), ni en cuanto a la causa de cancelación, aunque si una tendencia a mayor tasa de cancelación por alta respuesta en el grupo de estimulación convencional.

En el grupo de estimulación suave no fue necesaria la aplicación de “coasting” en ningún caso, mientras que se empleó en 10 pacientes (12,3%) del grupo de estimulación convencional ($p < 0,01$).

La media de días de coasting en el grupo de estimulación convencional fue de $2,1 \pm 1,2$ días (1 - 5 días).

La tasa de incidencia de SHO fue 2,9% en el grupo de estimulación suave y 8,6% en el grupo de estimulación convencional, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 6: Complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación.

		E. suave n=81	E. convencional n=85	p
Tasa de cancelación de ciclo n(%)		12 de 81 (14,8%)	7 de 85 (8,2%)	ns
Causa de cancelación de ciclo				
	Baja respuesta n (%)	7 de 12 (58,3%)	4 de 7 (57,1%)	ns
	Alta respuesta n (%)	0 de 12 (0%)	3 de 7 (42,9%)	ns
	Otros n (%)	5 de 12 (41,7%)	0 de 7 (0%)	ns
Coasting n(%)		0 de 69 (0%)	10 de 78 (12,3%)	< 0,01
Días de coasting media ± ds (rango)		0	2,1 ± 1,2 (1 – 5)	—
SHO n (%)		2 de 69 (2,9%)	7 de 78 (8,6%)	ns

n: número de casos

ns: no significativo

media ± ds (rango): media aritmética ± desviación estándar (rango)

7. Coste del tratamiento de estimulación

Tanto el coste de la FSH como el coste total de la medicación del tratamiento de estimulación ovárica fue inferior en el grupo de estimulación suave (diferencias estadísticamente significativas) (Tabla 7).

Tabla 7: Coste del tratamiento de estimulación.

	E. suave (n=81) media±ds (rango)	E. convencional (n=85) media±ds (rango)	p
Dosis total de FSH (UI)	1.199,1 ± 325 (450 – 2.100)	2.071,2 ± 701,8 (1.050 – 4.425)	< 0,001
Coste de FSH (€) ⁽¹⁾	539,6 ± 146,3 (202,5 – 945)	932,1 ± 315,8 (472,5– 1.991,3)	< 0,001
Dosis total de antagonista de la GnRH (jeringas precargadas)	3,3 ± 1,7 (0 – 8)	—	—
Coste del antagonista de la GnRH (€) ⁽²⁾	158,2 ± 83,5 (0 – 386,2)	—	—
Número de envases de análogos de la GnRH	—	1 ± 0 (1 – 1)	—
Coste del análogo de la GnRH (€) ⁽³⁾	—	122,1 ± 0 (122,1 – 122,1)	—
Coste total del tratamiento (€)	683,8 ± 213,4 (202,5 – 1.282,9)	1.054,1 ± 315,8 (594,6 – 2.113,3)	< 0,001

(1): calculado en base al precio de 1 UI de Gonal F® (0,45€), según el precio de Gonal F® 900.

(2): calculado con el precio de Orgalutran® 0,25 mg jeringa precargada (48,27€).

(3): calculado con el precio de Synarel solución® (122,05€).

media ± ds (rango): media aritmética ± desviación estándar (rango).

Discusión

En 1978 Steptoe y Edwards informaron sobre el primer nacimiento resultante de una FIV, a partir de un ovocito recogido en un ciclo natural. En la FIV con ciclo natural las tasas de éxito por ciclo son muy bajas, en comparación con las conseguidas en ciclos de estimulación ovárica (Pelinck et al., 2002). Los ciclos naturales generalmente producen sólo un ovocito maduro y un único embrión, con una eficiencia relativamente baja, privando de la oportunidad de seleccionar o criopreservar embriones.

La aparición de las gonadotropinas exógenas permitió inducir la ovulación en mujeres con carencia de gonadotropinas y en las que no responden a otras formas menos complejas de tratamiento. Durante casi 30 años, las únicas gonadotropinas exógenas disponibles fueron las hMG, que contenían cantidades importantes de proteínas urinarias que podían ser antigénicas (Bassett et al., 2009). Hace aproximadamente 20 años se empezaron a desarrollar preparados urinarios más purificados de FSH, y en la década de los 80 se comenzó a aplicar la genotecnología para obtener gonadotropinas recombinantes. La disponibilidad de FSH, LH y hCG recombinantes ha contribuido a aumentar nuestros conocimientos sobre las acciones específicas de las gonadotropinas en el desarrollo folicular y la maduración del ovocito, confiriendo la capacidad de adaptar los regímenes de estimulación ovárica a las necesidades de cada mujer (Van Wely et al., 2011), con el fin de optimizar la calidad de los ovocitos y la fecundidad de los ciclos.

Estos fármacos son sumamente eficaces, pero también caros, constituyendo una carga económica para los sistemas sanitarios y los pacientes, lo que contribuye a aumentar el estrés de la pareja. Así mismo, tienen riesgos considerables, tales como el embarazo múltiple y el SHO, y sus efectos sobre la salud a largo plazo, como el cáncer ginecológico son controvertidos. Así mismo, se han relacionado las dosis elevadas de gonadotropinas con una disminución de la calidad ovocito/embrión y alteración de la receptividad endometrial y del proceso de implantación de los embriones.

El objetivo de este estudio fue confrontar dos protocolos de tratamiento de estimulación ovárica para evaluar la efectividad, coste y riesgos para la paciente en nuestro medio.

Para ello se compararon las variables de estimulación, los parámetros de laboratorio, los resultados clínicos, las complicaciones de los ciclos de estimulación ovárica y el coste de medicación, entre un grupo de 81 pacientes que siguieron tratamiento de estimulación suave y antagonistas de la GnRH frente a 85 que siguieron un protocolo de estimulación convencional con agonistas de la GnRH.

Este estudio presenta varios inconvenientes. A pesar de que en todos los casos la edad de las pacientes fue menor o igual a 35 años, hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la media de edad en ambos grupos, que fue inferior en el grupo de estimulación convencional, hecho similar al estudio de Fernández-Shaw et al. (2009). La diferencia de un año de edad, clínicamente no es relevante, ya que otros factores que influyen en la respuesta ovárica como el IMC, nivel basal de FSH y la causa de esterilidad no difieren en ambos grupos.

También hubo diferencias estadísticamente significativas en la media de meses de esterilidad antes de la punción entre ambos grupos, en este caso fue inferior en el grupo de estimulación suave, pero dado que no existen diferencias superiores a 12 meses, no se considera que tenga repercusión clínica.

Así mismo, no es un estudio de coste-efectividad, por lo que no pueden extraerse conclusiones adecuadas sobre el coste completo del tratamiento en ambos grupos, ya que no se contemplan los costes derivados de las visitas médicas y de las complicaciones en su totalidad.

No obstante es un ensayo clínico controlado y aleatorizado, realizado en nuestro medio, lo cual nos permite asumir el protocolo de estimulación suave en nuestras pacientes con garantías de obtener resultados similares a los del estudio.

1. Variables de la estimulación ovárica

En este estudio, los resultados muestran que el protocolo de estimulación suave permite reducir la dosis total de gonadotropinas administradas y los días de estimulación, sin afectar significativamente a las tasas de gestación, lo que coincide con los resultados de estudios similares (Fernández-Shaw et al., 2009; Heijnen et al., 2007; Hohmann et al., 2003).

2. Parámetros de laboratorio

Uno de los objetivos de los protocolos de estimulación suave es interferir lo menos posible con la fisiología normal del ovario. En los protocolos de estimulación suave el reclutamiento folicular y los estadios iniciales de selección del folículo dominante se producen dentro de un ciclo natural, restringiendo el uso de FSH exógena para inducir el desarrollo folicular múltiple hasta la fase folicular media-tardía (Hohmann et al, 2003; Macklon et al., 2006).

El empleo de altas dosis de gonadotropinas rescata un mayor número de folículos de la atresia, pero a veces estos ovocitos y los embriones que generan son de pobre calidad (Check, 2007; Check et al., 2007). El estudio de Hodges et al., (2002) concluye que la estimulación ovárica puede interferir en la segregación cromosómica de los ovocitos. También hay evidencia científica en cuanto a los potenciales efectos negativos de niveles suprafisiológicos de esteroides sobre la constitución cromosómica de los embriones (Baart el al., 2007; Katz-Jaffe et al., 2005), en el desarrollo y capacidad de implantación de los mismos (Ertzeid et al., 2001; Van der Auwera et al., 2001) y sobre la receptividad endometrial, influyendo negativamente en la tasa de implantación del embrión (Beckers et al, 2006; Devroey et al, 2004; Strowitzki et al., 2006).

En este estudio, el nivel sérico de E2 el día de la administración de la hCG fue inferior en el grupo de estimulación suave, sugiriendo que la estimulación ovárica suave podría mejorar estos parámetros.

La media del número de ovocitos obtenidos por punción fue inferior en el grupo de estimulación suave al igual que en los estudios de Heijnen et al. (2007) y

Hohmann et al. (2003), pero no de ovocitos en metafase II, ovocitos inyectados y fecundados, que fue similar en ambos grupos. En el estudio de Fernández-Shaw et al. (2009) se obtienen en ambos grupos similar número de ovocitos y en el estudio de Verberg et al. (2009) hubo una reducción del 35% en el número de ovocitos obtenidos con el protocolo de estimulación suave (6 ovocitos de media) comparado con el protocolo convencional (con una media de 9).

Una de las preocupaciones en cuanto a la aplicación de protocolos de estimulación suave en la práctica clínica habitual, es que la obtención de una respuesta ovárica disminuida reducirá las tasas de embarazo.

El hábito de obtener un elevado número de ovocitos, proviene de la necesidad de suplir la ineficacia de las técnicas de laboratorio de FIV-ICSI. Se necesitan muchos ovocitos para obtener un escaso número de embriones y un menor número de recién nacidos vivos. Es por ello que, tradicionalmente, los protocolos de estimulación han ido encaminados a compensar las deficiencias de las técnicas de laboratorio.

No obstante, durante las tres últimas décadas, tanto el conocimiento científico como las técnicas de laboratorio, los recursos y el equipamiento de los laboratorios de TRA se han perfeccionado. Como resultado la efectividad de las técnicas de FIV ha mejorado considerablemente desde los años 80, con un rendimiento óptimo, por lo que cabe plantearse si realmente es necesario, hoy día, obtener un elevado número de ovocitos.

Así mismo, hay que tener en cuenta la tendencia actual (en algunos países del mundo) de limitar el número de embriones transferidos, lo que también habla a favor de reducir el número de ovocitos obtenidos. De hecho, la mayoría de estudios que relacionan el número de ovocitos obtenidos con las tasas de embarazo, muestran que con un mayor número de ovocitos no se obtienen mayores tasas de gestación (Melie et al., 2003; Kok et al., 2006), o bien que esta tasa es menor (Van der Gaast et al., 2006).

Al contrario que con los protocolos de estimulación convencional, la estimulación suave intenta limitar el número de ovocitos obtenidos a menos de 8 (Nargund et al., 2007b; Zegers-Hochschild et al., 2009).

En este estudio no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de embriones de buena calidad según la clasificación vigente de ASEBIR (Arday et al., 2008), como sí demuestran otros estudios como el de Baart et al. (2007), en el 111 pacientes fueron randomizadas a seguir protocolo de estimulación suave (150 UI de FSHr desde el quinto día de ciclo más antagonista de la GnRH) o bien protocolo de estimulación convencional (inicio de estimulación con 225 UI de FSHr tras dos semanas de inhibición con agonistas de la GnRH). La tasa de gestación por ciclo iniciado fue del 21% en el grupo de estimulación suave frente al 18% en el grupo control, diferencias estadísticamente no significativas. En este estudio se estudiaron los embriones en el estadio de 8 células y se analizaron 10 cromosomas mediante FISH. Aunque el grupo de estimulación suave consiguió significativamente un menor número de embriones, en ambos grupos se obtuvo el mismo número de embriones cromosómicamente normales. Se concluye que la menor interferencia farmacológica con la fisiología del ovario dará lugar a ovocitos de mejor calidad genética y a mayor número de embriones euploides.

Tampoco en este trabajo hubo diferencias entre el número de embriones transferidos y congelados en ambos grupos, resultados similares al estudio de Out et al. (1999). Por el contrario, Fernández-Shaw et al. (2009) obtienen menor número de embriones transferidos en el grupo de menor dosis, aunque las tasas de gestación son similares en ambos grupos y Heijnen et al. (2007) también obtienen menor número de embriones.

3. Resultados de gestaciones

No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los resultados clínicos analizados, tales como tasa de gestación por ciclo, por punción y por transferencia, tasa de recién nacido vivo, tasa de abortos y tasa de embarazo gemelar.

En el estudio de Out et al. (1999) compararon un grupo de 101 pacientes con dosis diarias fijas de 100 UI de FSHr (Puregon®) frente a 98 pacientes con dosis de 200 UI. Se obtuvieron más ovocitos en el grupo de 200 UI, aunque la dosis total de FSH necesaria para el desarrollo de al menos tres folículos de 17 mm o más de diámetro fue menor en el grupo de 100 UI, así como también fueron menores en este grupo los niveles de E2 el día de la administración de la hCG. Hubo más ciclos cancelados en el grupo de menor dosis debido a baja respuesta y mayor desarrollo de SHO que precisó ingreso en el grupo de mayor dosis. No hubo diferencia en las tasas de gestación de ambos grupos.

A pesar de que con la estimulación suave junto a SET, la tasa de gestación por ciclo se reduce, la tasa de recién nacido vivo a los 12 meses de iniciar el tratamiento es la misma que en el protocolo convencional con análogos de la GnRH (Heijnen et al, 2007), de manera que al aunar estimulación suave y SET no se precisa la obtención de un alto número de ovocitos.

El incremento de gestaciones múltiples vinculadas a la expansión de las técnicas de fertilidad, es un hecho que está tomando tal dimensión, que los especialistas no dudan en calificar este fenómeno como una epidemia en expansión (Simon et al., 2005).

Los registros de población española ponen de manifiesto que entre 1.980 y 2.007 se ha producido un notable aumento de la tasa de partos múltiples, especialmente desde 1990. Según datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), en los últimos veinte años, la tasa de partos gemelares se ha duplicado (75 cada 10.000 partos en el año 1980; 168 en el 2002) y la tasa de partos triples se ha incrementado en siete veces (11 cada 100.000 partos en el año 1980; 76 cada 100.000 partos en el 2002) en gran parte debidos a las TRA (Tur et al., 2005).

Los efectos secundarios materno-fetales de este tipo de gestaciones inciden de forma tan grave en la pareja (coste económico, desgaste psicológico, depresión, etc.) y en el feto (bajo peso, alteraciones neurológicas, etc) (Stromberg et al., 2002), que cada vez son más los países y las organizaciones científicas que se han decidido a regular la actividad de los centros o a dar

recomendaciones, con el fin de controlar las pautas existentes de actuación del binomio médico-pareja basada en el principio de conseguir un embarazo a todo coste (Ricciarelli, 2007).

En nuestro estudio la tasa de gestación gemelar fue similar en ambos grupos, a pesar de no emplear sistemáticamente SET en el grupo de estimulación suave.

En el estudio de Fernández-Shaw et al. (2009) las tasas de gestación y la tasa de abortos fueron similares en ambos grupos, con mayor tasa de gestaciones gemelares en el grupo de mayor dosis, diferencias estadísticamente significativas, debido probablemente a un mayor número de SET en el grupo de menor dosis.

4. Complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación

Cancelación de ciclo

Una de las preocupaciones del empleo de protocolos de estimulación mínima es la alta tasa de cancelación de ciclo, debidas a desarrollo mono o bi-folicular (sobre el 15-20%), que constituye un factor importante que limita la efectividad de dicho protocolo de tratamiento.

En este estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de cancelación de ciclo en ambos grupos, siendo del 14,8% en el grupo de estimulación suave frente a un 8,2% en el grupo de estimulación convencional, lo que coincide con los resultados del estudio de Fernández-Shaw et al. (2009). Hubo una tendencia, aunque no significativa, a mayor tasa de cancelación por alta respuesta en el grupo de estimulación convencional.

En el estudio de Heijnen et al., la tasa de embarazo por ciclo iniciado se redujo del 29 al 18% con el protocolo de estimulación suave. En parte, esta reducción se debió a las altas tasas de cancelación de ciclo en el grupo de estimulación suave (Heijnen et al., 2007).

En el estudio de Hohmann et al. (2003), se evaluó la respuesta de 142 pacientes incluidas, con un buen pronóstico reproductivo, ante distintas pautas

de tratamiento de estimulación ovárica, con 49 de las pacientes que siguieron un tratamiento con FSHr iniciada el quinto día del ciclo y la administración de antagonista de la GnRH cuando uno de los folículos alcanzaba los 14 mm de diámetro. En este grupo de pacientes se cancelaron mayor número de ciclos debido a baja respuesta y hubo un menor número de ovocitos recolectados, sin embargo, la calidad de los embriones obtenidos fue mejor. Hubo menos fallos de fertilización y menor número de embriones con desarrollo anormal. Los otros grupos de estudio fueron el grupo A, en el que se realizaba tratamiento previo con agonistas de la GnRH, continuando con una pauta posterior con dosis fija de 150 UI de FSHr; y el grupo B, en el que la FSHr se iniciaba el segundo día del ciclo y la administración de antagonista de la GnRH cuando uno de los folículos alcanzaba los 14 mm de diámetro. Sin embargo, como consecuencia del mayor número de ovocitos obtenidos en los grupos A y B, y por lo tanto un mayor número de embriones obtenidos, de entre los cuales seleccionar el mejor para ser transferido, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la calidad del mejor embrión transferido entre los tres grupos. Otro dato interesante es que en los grupos A y B, sólo el 7% de las pacientes en las que se obtuvieron 5 o menos ovocitos concibieron, mientras que el grupo de estimulación suave el 67% de estas pacientes concibieron. Sin embargo, no hubo diferencias en la tasa de gestación por ciclo iniciado entre los tres grupos (Hohmman et al., 2003).

Por tanto, se puede concluir que en estimulación suave, un menor número de ovocitos probablemente representa una respuesta normal, obteniéndose no obstante, embriones de alta calidad y tasas de embarazo aceptables, por lo que probablemente todas las mujeres que siguen un protocolo de estimulación suave deberían puncionarse, ya que las mejores tasas de gestación se observan en mujeres con menos folículos.

Los criterios de cancelación en los ciclos de estimulación suave aún no están definidos, ya que los profesionales no están habituados a trabajar con dicho protocolo ni a obtener menor número de folículos. Lo habitual es cancelar los ciclos en los que se obtienen un bajo número de folículos, especialmente en países donde la competición entre las clínicas de FIV se basa en la tasa de

gestación. Además, en los países donde el sistema público de salud ofrece gratuitamente o a un bajo coste un número limitado de intentos, el obtener al menos una docena de ovocitos es considerado un gran logro, tanto para los profesionales como para los pacientes. Por lo tanto, en el contexto de un protocolo de estimulación suave, parece necesario que los criterios de cancelación del ciclo se revisen y se definan.

El envejecimiento ovárico y un IMC elevado se deben tener presentes como variables que predicen una respuesta insuficiente a la estimulación suave, siendo necesario la creación de modelos de predicción que minimicen la tasa de cancelación de ciclo (Verberg et al., 2007).

Las pacientes catalogadas como bajas respondedoras no obtienen beneficio al incrementar la dosis inicial de FSH (Lekamge et al., 2008). Las dosis altas de gonadotropinas pueden reducir la tasa de cancelación por ciclo, pero disminuyen la probabilidad de embarazo clínico y la tasa de recién nacido vivo y aumentan el número de abortos espontáneos (Pal et al., 2008).

En la actualidad, los resultados publicados sugieren que las pacientes bajas respondedoras se beneficiarían de un protocolo de estimulación suave frente al protocolo convencional, ya que aunque en estas pacientes la probabilidad de desarrollar un SHO es escasa aún con el protocolo convencional, los ovocitos obtenidos y el endometrio serían mejores. No obstante, se necesitan más estudios que añadan evidencia científica a esta hipótesis.

Síndrome de hiperestimulación ovárica

En nuestro estudio la tasa de incidencia de SHO fue 2,9% en el grupo de estimulación suave y 8,6% en el grupo de estimulación convencional. En general existe una tendencia a menor riesgo de hiperestimulación a favor del grupo de estimulación suave.

En el estudio de Heijnen et al. (2007) aunque la estimulación suave no erradica el SHO, el número de pacientes con SHO severo se reduce a la mitad, de un

3,7% en el grupo de estimulación convencional a un 1,4% en el grupo de estimulación suave.

Los protocolos en los que se obtienen entre 8 y 15 ovocitos se asocian con complicaciones tales como mayores tasas de SHO (Macklon et al., 2006). Hay meta-análisis que muestran una clara reducción de la incidencia de SHO en los ciclos con antagonistas comparados con el protocolo convencional de análogos (Kolibianakis et al., 2006). En el estudio de Karimzadeh et al., no se observó ningún caso de SHO en el grupo de estimulación suave, frente a una incidencia del 6% en el grupo de estimulación convencional (Karimzadeh et al., 2010).

En el estudio de Fernández-Shaw et al. (2009) no hay ningún caso de SHO que requiriese hospitalización en ninguno de los dos grupos. Sin embargo, en contraposición a los estudios descritos, se cancelaron 7 transferencias embrionarias en el grupo de menor dosis frente a 1 en el grupo de mayor dosis, debido a la percepción de riesgo de desarrollar SHO.

5. Coste del tratamiento de estimulación

Menor coste del tratamiento

Estos hallazgos podrían estar a favor de un menor coste del tratamiento con dicho protocolo, como demuestran estudios previos (Heijnen et al., 2007; Polinder et al., 2008).

En nuestro estudio el coste de medicación empleada fue inferior en el grupo de estimulación suave frente al grupo de estimulación convencional (683,8 € vs 1.054,1 €). No obstante, sería necesario realizar estudios coste-beneficio y coste-efectividad para los datos de este trabajo, que nos permitiesen afirmar un menor coste derivado de la aplicación del tratamiento de estimulación suave, contemplando además de los costes de la medicación, el número de visitas médicas, los gastos de laboratorio, las ecografías realizadas, el coste de procedimientos como la recuperación ovocitaria y la transferencia embrionaria, los gastos hospitalarios y administrativos, los costes de las complicaciones del

tratamiento, los gastos de desplazamiento y las pérdidas económicas debidas a la ausencia laboral debida al tratamiento (Collins et al., 2000).

Hay evidencia de un menor coste del gasto sanitario con el uso de protocolos de estimulación ovárica suave, que además requieren menos visitas clínicas, y menor interrupción de la vida laboral de la mujer (Dixon et al., 2008; Polinder et al., 2008).

El coste de FIV todavía excede en muchos casos la capacidad económica de los pacientes, quienes en muchas ocasiones tienen que abandonar o no iniciar el tratamiento por ello. En la actualidad, las organizaciones sanitarias y los pacientes demandan la mejor relación calidad-precio, constituyendo este hecho una oportunidad para promocionar el uso de protocolos de estimulación ovárica mínima, que permitirá a más pacientes el acceso al tratamiento de fertilidad, con un menor coste, y mayor seguridad y satisfacción de las mujeres, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. No obstante, los tratamientos de fertilidad, aunque se empleen protocolos de estimulación suave, continúan siendo demasiados caros.

Polinder et al. (2008) realizaron un análisis coste-efectividad, en el que se valoró el protocolo de estimulación suave frente a protocolo de estimulación clásico, basado en un estudio anterior realizado por los mismos autores (Heijnen et al., 2007). Se cuantificaron los costes totales del tratamiento un año después de la inclusión en el estudio en ambos grupos. A pesar de que la media de número de ciclos de FIV fue mayor en el grupo de estimulación suave (2,3 vs 1,7; $p < 0,001$), en este grupo la media del coste total a los 12 meses de iniciar los tratamientos fue menor (8.333€ vs 10.745€; $p < 0,01$). Estas diferencias se debían principalmente al mayor coste en el periodo obstétrico y postnatal para el grupo de estimulación convencional, relacionado con las gestaciones múltiples. El coste por recién nacido vivo fue de 19.156 € en el grupo de estimulación suave frente a 24.038 € en el grupo de estimulación convencional. En nuestro estudio se obtiene igual tasa de embarazo gemelar en ambos grupos de estimulación.

En el estudio de Heijnen et al., (2007) se randomizaron 404 pacientes a seguir un protocolo de estimulación suave y co-tratamiento con antagonistas y SET, o bien protocolo largo convencional con agonistas y transferencia de 2 embriones. El grupo de estimulación suave se caracterizaba por una menor duración de la estimulación, menor dosis total de FSH y menor número de ovocitos obtenidos. La tasa de gestación por ciclo fue significativamente menor en el grupo de estimulación suave (17,6% vs 28,6%; $p < 0,001$), al contrario que en nuestro estudio en el que la tasa de gestación fue similar en ambos grupos de estimulación. Sin embargo, el protocolo de estimulación suave fue más aceptado por las pacientes y resultó ser más barato, lo que redujo en este grupo la tasa de abandono del tratamiento e indujo a mayor número de pacientes a volverse a someter en un breve periodo de tiempo a un segundo ciclo de FIV. Esto se traduce en una tasa acumulada de recién nacido tras un año de tratamiento de FIV similar en los dos grupos (43,4% en el grupo de estimulación suave y 44,7% en el grupo de estimulación convencional). La tasa de gestaciones múltiples fue menor en el grupo de estimulación suave y SET (0,5% vs 13,1%; $p < 0,001$). De acuerdo a este estudio, una menor tasa de gestación por ciclo se ve compensada por el mayor número de intentos de ciclos de FIV en un determinado periodo de tiempo. También los costes del tratamiento fueron significativamente menores en el grupo de estimulación suave, puntualizando que estas diferencias económicas se deben principalmente a la casi inexistencia de gestaciones múltiples en el grupo de estimulación suave y SET, más que al coste del tratamiento.

Al reducirse la dosis total de gonadotropinas administradas y los días de estimulación también es probable que la satisfacción de las mujeres con el protocolo de estimulación suave sea mayor (De Klerk et al., 2007; Verberg et al., 2008), habiéndose relacionado la mayor aceptación del tratamiento con el menor número de inyecciones administradas (Fauser et al., 2009). Algunos estudios describen un incremento del estrés marital y de los divorcios en las parejas que siguen tratamiento de FIV (Wang et al., 2007), aunque otros estudios no lo han confirmado (Repokari et al., 2007). En nuestro estudio no se han analizado parámetros de satisfacción.

En el estudio de Heijnen et al., (2007) se evaluó la decepción de las pacientes con el tratamiento mediante una escala de ansiedad, una escala de depresión, la subescala somática de Hopkins y una escala subjetiva de calidad del sueño, y fue menor en el grupo de estimulación suave.

En este último de Repokari et al. (2007) se afirmaba que el estrés y las decepciones compartidas podían unir más a la pareja, pero sólo parecía ser cierto en parejas que finalmente obtenían un recién nacido.

La estimulación suave tiene el objetivo de procurar un tratamiento más corto y sencillo para la paciente que reduzca el estrés asociado al mismo. Los protocolos de estimulación suave han mostrado menores tasas de abandono del tratamiento (Heijnen et al., 2007), y también se han asociado con menos síntomas de depresión después de fallo del tratamiento que con la estimulación estándar (De Klerk et al., 2007). El estrés relacionado con el tratamiento influye bastante en la decisión de los pacientes para abandonarlo (Olivius et al., 2004). Como consecuencia, la estimulación suave no sólo reduce las repercusiones psicológicas del tratamiento de la FIV, sino que también tiene un efecto positivo en el impacto de las tasas de éxito acumuladas debido a la menor tasa de abandono del tratamiento en las parejas con un ciclo fallido y a la mayor aceptación de ciclos repetidos de tratamiento (De Klerk et al., 2007; Olivius et al., 2004; Pelinck et al., 2007; Verberg et al., 2008).

6. Conclusiones

Actualmente no hay protocolos para estimulación ovárica mínima que permitan individualizar la dosis de FSH basándose en las características de la paciente (Olivennes et al., 2009). Existe la necesidad de desarrollar protocolos de actuación que permitan individualizar las dosis de FSH (Verberg et al., 2007), creando protocolos de estimulación suave más individualizados, basados en las características de las pacientes tales como la edad, el IMC y la reserva ovárica. Así mismo, sería necesario estudiar la efectividad del protocolo de estimulación suave en pacientes de edad reproductiva más avanzada, ya que cada vez más se incrementa el número de estas pacientes que demanda

tratamientos de reproducción asistida. En la actualidad los estudios de estimulación suave no incluyen pacientes mayores de 38 años.

Es necesario el desarrollo paralelo de las TRA de laboratorio, especialmente en el desarrollo embrionario, el proceso de selección del embrión a transferir y los procesos de criopreservación, que permitan incrementar la tasa de gestación por ciclo y embrión transferido.

En resumen, podemos concluir que el uso generalizado de protocolos de estimulación suave puede abaratar el coste, lo que mejoraría el acceso de la población a los programas de FIV y la mayor aceptación del tratamiento por parte de las pacientes, permitiría reducir las tasas de complicaciones y mejorar los resultados perinatales.

Por todos estos motivos, sería beneficioso volver a considerar cual es la definición de tratamiento de FIV —~~el~~oso”, lo que probablemente representaría mejor los intereses de las pacientes, los médicos y la sociedad.

Conclusiones

-
1. Con el protocolo de estimulación ovárica suave para ciclos FIV-ICSI el número de días de estimulación, las dosis totales de gonadotropinas empleadas y los niveles de estradiol sérico determinados el día de la administración de la hCG, fueron menores que con el protocolo de estimulación convencional. Estos hallazgos podrían estar a favor de un menor coste del procedimiento y probablemente una mayor aceptación por parte de las pacientes del tratamiento.
 2. Aunque se obtuvieron menos ovocitos por punción en el grupo de estimulación suave, no hubo diferencias en otros parámetros de laboratorio como número de ovocitos en metafase II, ovocitos fecundados, embriones de buena calidad, embriones transferidos y congelados.
 3. Los resultados clínicos en cuanto a tasas de gestación, de recién nacido, abortos y embarazos gemelares fueron similares en ambos grupos.
 4. Las complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación fueron menores con el protocolo de estimulación suave para la realización de coasting. En el grupo de estimulación convencional hubo una tendencia a mayor cancelación de ciclo por alta respuesta y mayor incidencia de SHO.
 5. El coste de medicación fue menor en el grupo de estimulación suave, aunque sería conveniente realizar un estudio coste-efectividad completo.

Bibliografía

Abdalla H, Nicopoullou JD. The effect of duration of coasting and estradiol drop on the outcome of assisted reproduction: 13 years of experience in 1,068 coasted cycles to prevent ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2010; 94:1757-63.

Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1997; 68: 1017-21.

Alikani M and Cohen J. Patterns of cell fragmentation in the human embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1995; 12:28s.

Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril.* 1999; 71:836-42.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M and Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod.* 2000; 15:2634-43.

Al-Inany HG, Aboulghar MA, Mansour R, Serour G. Meta-analysis of recombinant versus urinary-derived FSH: an update. *Hum Reprod.* 2003; 18:305–13.

Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. Art. No.: CD001750. DOI: 10.1002/14651858.CD001750.pub2.

Al-Inany HG, Youssef MAFM, Aboulghar M, Broekmans FJ, Sterrenburg MD, Smit JG, et al. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 5. Art. No.: CD001750. DOI: 10.1002/14651858.CD001750.pub3.

Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod.* 2008; 23:2826-34.

Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2008; 23:756–71.

Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999; 14:429-47.

Arday M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa M, Herrero R, Moreno J, et al. Cuadernos de embriología clínica. II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR); 2008.

Avery S, Brinsden PR. Making the best use of human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16:457-9.

Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Opstal DV, Beckers GM, Verhoeff A, et al. Milder ovarian stimulation for in vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2007; 22:980-8.

Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod.* 1997; 12:800-4.

Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA. Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod.* 2002; 17:2394-401.

Balash J, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Tena-Sempere M. Ovarian luteinizing hormone priming preceding follicle-stimulating hormone stimulation: clinical and endocrine effects in women with long-term hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:2367-73.

Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12:608-15.

Bassett R, Lispi M, Ceccarelli D, Grimaldi L, Mancinelli M, Martelli F, et al. Analytical identification of additional impurities in urinary-derived gonadotrophins. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19:300-13.

Beckers NG, Platteau P, Eijkemans MJ, Macklon NS, de Jong FH, Devroey P, et al. The early luteal phase administration of oestrogen and progesterone does not induce premature luteolysis in normo-ovulatory women. *Eur J Endocrinol*. 2006; 155:355-63.

Bodri D, Sunkara SK, Coomarasamy A. Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2011; 95:164-9.

Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, et al. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod*. 2010; 25:2092-100.

Busso CE, Garcia-Velasco J, Gomez R, Alvarez C, Simón C, Pellicer A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Prevention of OHSS--dopamine agonists. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19:43-51.

Cabrera RA, Stadtmauer L, Mayer JF, Gibbons WE, Oehninger S. Follicular phase serum levels of luteinizing hormone do not influence delivery rates in in vitro fertilization cycles down-regulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist and stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*. 2005; 83:42-8.

Check JH. Mild ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24:621-7.

Check JH, Summers-Chase D, Yuan W, Horwath D, Wilson C. Effect of embryo quality on pregnancy outcome following single embryo transfer in women with a diminished egg reserve. *Fertil Steril*. 2007; 87:749-56.

Chen D, Burmeister L, Goldschlag D, Rosenwaks Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: strategies for prevention. *Reprod Biomed Online*. 2003; 7:43-9.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahceci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril*. 2006; 85:358-65.

Collins J, Graves G. The economic consequences of multiple gestation pregnancy in assisted conception cycles. *Hum Fertil (Camb)*. 2000; 3:275-83.

Costello MF, Chapman M, Conway U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2006; 21:1387–99.

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

Cusidó M, Fábregas R, Pere BS, Escayola C, Barri PN. Ovulation induction treatment and risk of borderline ovarian tumors. *Gynecol Endocrinol*. 2007; 23: 373-6.

D'Angelo A, Amso NN. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 3. Art. No.: CD002806. DOI: 10.1002/14651858.CD002806.pub2.

D'AngeloA, Brown J, AmsoNN. Coasting (withholding gonadotrophins) for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 2. Art. No.: CD002811. DOI: 10.1002/14651858.CD002811.pub2.

Daya S, Maheshwari A, Siristatidis CS, Bhattacharya S, Gibreel AF. Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2000, Issue 1. Art. No.: CD001299. DOI: 10.1002/14651858.CD001299

Daya S, Gunby JL, Ogah J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles. Cochrane Database of Systematic Reviews 2008, Issue 3. Art. No.: CD004830. DOI: 10.1002/14651858.CD004830.pub2

De Geyter C, Schmitter M, De Geyter M, Nieschalag E, Holzgreve W, Scheneider 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, Fauser BC. A pilot study involving minimal ovarian stimulation for in vitro fertilization: extending the 'follicle-stimulating hormone window' combined with the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix. *Fertil Steril*. 2000; 73:1051-4.

De Klerk C, Macklon NS, Heijnen EM, Eijkemans MJ, Fauser BC, Passchier J, et al. The psychological impact of IVF failure after two or more cycles of IVF with a mild versus standard treatment strategy. *Hum Reprod*. 2007; 22:2554-8.

De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2010; 25:1851-62.

De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1996; 11:595-7.

De Ziegler D, Fraise T, de Candolle G, Vulliemoz N, Bellavia M, Colamaria S. Outlook: Roles of FSH and LH during the follicular phase: insight into natural cycle IVF. *Reprod Biomed Online*. 2007; 15:507-13.

Delvigne A, Rozenberg S. A qualitative systematic review of coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients. *Hum Reprod Update*. 2002; 8:291-6.

Deti L, Yelian FD, Kruger ML, Diamond MP, Puscheck EE. Endometrial thickness dynamics and morphologic characteristics during pituitary downregulation with antagonists in assisted reproductive technology cycles *J Ultrasound Med*. 2008; 27:1591-6.

Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, Fauser BC. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15:84-90.

Dixon S, Faghieh Nasiri F, Ledger WL, Lenton EA, Duenas A, Sutcliffe P, et al. Cost-effectiveness analysis of different embryo transfer strategies in England. *BJOG.* 2008; 115:758-66.

Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.* 2000; 62:1526–35.

Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, Vermeiden JP, Hennekam RC. Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod.* 2007; 22:2476–80.

Dowling-Lacey D, Jones E, Mayer J, Bocca S, Stadtmayer L, Oehninger S. Elective transfer of two embryos: reduction of multiple gestations while maintaining high pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24:11-5.

Edwards RG. IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF - time for a rethink. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15:106-19.

Eijkemans MJ, Heijnen EM, de Klerk C, Habbema JD, Fauser BC. Comparison of different treatment strategies in IVF with cumulative live birth over a given period of time as the primary end-point: methodological considerations on a randomized controlled non-inferiority trial. *Hum Reprod.* 2006; 21:344-51.

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.

Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod.* 2001; 16:221-5.

Esinler I, Bayar U, Bozdog G, Yarali H. Outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with polycystic ovary syndrome or isolated polycystic ovaries. *Fertil Steril*. 2005; 84:932–7.

Fábregues F, Peñarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril*. 2004; 82: 827-33.

Farhi J, Fisch B, Sapir O, Pinkas H, Ben-Haroush A. Effect of coasting on IVF cycle characteristics and outcome in short vs. long GnRH agonist protocols. *Gynecol Endocrinol*. 2010; 26:187-92.

Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoché MA, Dandolo L, Vaiman D, et al. Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol*. 2007; 7:116.

Fauser BC, Devroey P. Why is the clinical acceptance of gonadotropin-releasing hormone antagonist cotreatment during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization so slow? *Fertil Steril*. 2005; 83:1607-11.

Fauser BC, Mannaerts BM, Devroey P, Leader A, Boime I, Baird DT. Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update*. 2009; 15:309-21.

Fernández-Shaw S, Pérez Esturo N, Cercas Duque R, Pons Mallo I. Mild IVF using GnRH agonist long protocol is possible: Comparing stimulations with 100 IU vs. 150 IU recombinant FSH as starting dose. *J Assist Reprod Genet*. 2009. 26:75–82.

Fiddelers A, Severens JL, Dirksen CD, Dumoulin JCM, Land JA, Evers JL. Economic evaluations of single- versus double-embryo transfer in IVF. *Hum Reprod Update*. 2007; 13:5-13.

Fiedler K, Ludwig M. Use of clomiphene citrate in in vitro fertilization (IVF) and IVF/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2003; 80:1521-3.

Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, Martel J, Trasler JM. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:1653–65.

Franco JG Jr, Baruffi RL, Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Contart P, et al. Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:58.

Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, et al. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod.* 1999; 14:2588-95.

Gerris J. The near elimination of triplets in IVF. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15:40-4.

Golan A, Ron-el R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv.* 1989; 44:430-40.

Griesinger G. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention strategies: use of gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Semin Reprod Med.* 2010; 28:493-9.

Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001; 16:313-8.

Hammond KR, Manning M, Steinkampf MP. Hormonal response to ovarian stimulation as a predictor of IVF success. *Fertil Steril.* 2004; 82: S334.

Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:280-91.

Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, et al. A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2007; 369:743-9.

HFEA long term data 1991-2006. Disponible en: http://www.hfea.gov.uk/docs/Latest_long_term_data_analysis_report_91-06.pdf.pdf).

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod*. 2004; 19:288-93.

Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J, Hunt PA. Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod*. 2002; 17:1171-80.

Hohmann FP, Laven JS, de Jong FH, Eijkemans MJ, Fauser BC. Low-dose exogenous FSH initiated during the early, mid or late follicular phase can induce multiple dominant follicle development. *Hum Reprod*. 2001; 16:846-54.

Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC. A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:166-73.

Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 2007; 22:548-57.

Horcajadas JA, Díaz-Gimeno P, Pellicer A, Simón C. Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function. *Semin Reprod Med*. 2007; 25:454-60.

Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, et al. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the

endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:4500-10.

Hosseini MA, Aleyasin A, Saeedi H, Mahdavi. A comparison of gonadotropin-releasing hormone agonists and antagonists in assisted reproduction cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010; 36:605-10.

Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Hald F, Agerholm I, Blaabjerg J, et al. Reproductive outcome using a GnRH antagonist (cetorelix) for luteolysis and follicular synchronization in poor responder IVF/ICSI patients treated with a flexible GnRH antagonist protocol. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11:679-84.

Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil Steril.* 2010; 94:389-400.

Hyden-Granskog C, Unkila-Callio L, Haltunnen M, Tiitinen A. Single embryo transfer is an option in frozen embryo transfer. *Hum Reprod.* 2005; 20:2935-8.

James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod.* 2006; 21:1599-604.

Jensen A, Sharif H, Kjaer SK. Use of fertility drugs and risk of uterine cancer: results from a large Danish population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 2009; 170:1408-14.

Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet.* 2003; 20:309-13.

Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000; 15:2390-3.

Karimzadeh MA, Ahmadi S, Oskouian H, Rahmani E. Comparison of mild stimulation and conventional stimulation in ART outcome. *Arch Gynecol Obstet.* 2010; 281:741-6.

Katz-Jaffe MG, Trounson AO, Cram DS. Chromosome 21 mosaic human preimplantation embryos predominantly arise from diploid conceptions. *Fertil Steril.* 2005; 84:634-43.

Killick S. Ultrasound and the receptivity of the endometrium. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15:63-7.

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.

Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet.* 2007; 16:2542–51.

Kok JD, Looman CWN, Weima SM, te Velde ER. A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 2006; 85:918-24.

Kolibianakis EM, Bourgain C, Platteau P, Albano C, Van Steirteghem AC, Devroey P. Abnormal endometrial development occurs during the luteal phase of nonsupplemented donor cycles treated with recombinant follicle stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril.* 2003; 80:464–6.

Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Prolongation of the follicular phase in in vitro fertilization results in a lower ongoing pregnancy rate in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertil Steril.* 2004; 82: 102-7.

Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:651-71.

Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, et al. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics análisis. *Hum Reprod*. 2011; 26:1813-25.

Lainas TG, Sfontouris IA, Zorzovilis IZ, Petsas GK, Lainas GT, Alexopoulou E, et al. Flexible GnRH antagonist protocol versus GnRH agonist long protocol in patients with polycystic ovary syndrome treated for IVF: a prospective randomised controlled trial (RCT). *Hum Reprod*. 2010; 25:683-9.

Lawrence LT, Moley KH. Epigenetics and assisted reproductive technologies: human imprinting syndromes. *Semin Reprod Med*. 2008; 26:143-52.

Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih YT, Ho HN, et al. Serum anti-mullerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod*. 2008; 23:160–7.

Lee KH, Kim SH, Jee BC, Kim YJ, Suh CS, Kim KC, et al. Comparison of clinical characteristics between early and late patterns in hospitalized patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2010; 93:2274-80.

Lekamge DN, Lane M, Gilchrist RB, Tremellen KP. Increased gonadotrophin stimulation does not improve IVF outcomes in patients with predicted poor ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25:515-21.

Levi AJ, Drews MR, Bergh PA, Miller BT, Scott RT Jr. Controlled ovarian hyperstimulation does not adversely affect endometrial receptivity in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2001; 76:670-4.

Lim H, Song H, Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives. *Vitam Horm*. 2002; 64:43-76.

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

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999; 72:240-4.

Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S and Diedrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000;15:325-329.

Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet.* 2005; 42:289–91.

Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:2963–8.

Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev.* 2006; 27:170-207.

Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Feliciani E, Gianaroli L. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil Steril* 2006; 86:629-35.

Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet.* 2010; 19:36-51.

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

Matorras R, Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Sociedad Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Sociedad Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción. Madrid: Adalia; 2007.

Melie NA, Adeniyi OA, Igbineweka OM, Ajayi RA. Predictive value of the number of oocytes retrieved at ultrasound-directed follicular aspiration with regard to fertilization rates and pregnancy outcome in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles. *Fertil Steril*. 2003; 80:1376-9.

Mercé LT, Barco MJ, Bau S, Troyano J. Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome? *Fertil Steril*. 2008; 89:111-7.

Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9:511-20.

Mochtar MH, Van der Veen F, Ziech M, van Wely M, Musters A. Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 2. Art. No.: CD005070. DOI: 10.1002/14651858.CD005070.pub2

Morgia F, Sbracia M, Schimberni M, Giallonardo A, Piscitelli C, Giannini P, et al. A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 81:1542-7.

Nargund G, Frydman R. Towards a more physiological approach to IVF. *Reprod Biomed Online*. 2007(a); 14:550-2.

Nargund G, Fauser BC, Macklon NS, Ombelet W, Nygren K, Frydman R. The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod*. 2007(b); 22:2801-4.

Navarro JL, Martínez L, Castilla JA, Hernández E. Costes de las técnicas de reproducción asistida en un hospital público. *Gac Sanit.* 2006; 20:382-90.

Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod.* 2003; 18:1307-12.

Nilsson L, Andersen AN, Lindenberg S, Hausken J, Andersen CY, Kahn JA. Ganirelix for luteolysis in poor responder patients undergoing IVF treatment: a Scandinavian multicenter 'extended pilot study'. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010; 89:828-31.

Okada H, Nakajima T, Yoshimura T, Yasuda K, Kanzaki H. Microarray analysis of genes controlled by progesterone in human endometrial stromal cells in vitro. *Gynecol Endocrinol.* 2003; 17:271-80.

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.

Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, et al. Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm; the CONSORT study. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18:195-204.

Olivius C, Friden B, Borg G, Bergh C. Why do couples discontinue in vitro fertilization treatment? A cohort study. *Fertil Steril.* 2004; 81:258-61.

Orvieto R, Bar-Hava I, Yoeli R, Ashkenazi J, Rabinerson D, Bar J, et al. Results of in vitro fertilization cycles in women aged 43-45 years. *Gynecol Endocrinol.* 2004; 18: 75-8.

Out HJ, Lindenberg S, Mikkelsen AL, Eldar-Geva T, Healy DL, Leader A, et al. A prospective randomised doubled-blind clinical trial to study efficacy of a fixed

dose of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) in woman undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 1999; 14:622–7.

Owen CM, Segars JH Jr. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med.* 2009; 27:417-28.

Pal L, Jindal S, Witt BR, Santoro N. Less is more: increased gonadotropin use for ovarian stimulation adversely influences clinical pregnancy and live birth after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008; 89:1694-701.

Papanikolaou EG, Fatemi H, Camus M, Kyrou D, Polyzos NP, Humaidan P, et al. Higher birth rate after recombinant hCG triggering compared with urinary-derived hCG in single-blastocyst IVF antagonist cycles: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2010; 94:2902-4.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997; 12:532-41.

Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature *Hum Reprod Update.* 2002; 8:129-39.

Pelinck MJ, Vogel NE, Hoek A, Arts EG, Simons AH, Heineman MJ. Minimal stimulation IVF with late follicular phase administration of the GnRH antagonist cetrorelix and concomitant substitution with recombinant FSH: a pilot study. *Hum Reprod* 2005; 20:642–8.

Pelinck MJ, Vogel NE, Hoek A, Simons AH, Arts E, Mochtar MH, et al. Cumulative pregnancy rates after three cycles of minimal stimulation IVF and result according to subfertility diagnosis: a multicentre cohort study. *Hum Reprod.* 2006; 21:2375-83.

Pelinck MJ, Vogel NE, Arts EG, Simons AH, Heineman MJ, Hoek A. Cumulative pregnancy rates after a maximum of nine cycles of modified natural cycle IVF and analysis of patient drop-out: a cohort study. *Hum Reprod.* 2007; 22:2463-70.

Polinder S, Heijnen EM, Macklon NS, Habbema JD, Fauser BJ, Eijkemans MJ. Cost effectiveness of a mild compared with a standard strategy for IVF: a randomized comparison using cumulative term live birth as the primary endpoint. *Hum Reprod.* 2008; 23:316-23.

Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6:323-31.

Repokari L, Punamoki RL, Unkila-Kallio L, Vilksa S, Poikkeus P, Sinkkonen J, et al. Infertility treatment and marital relationships: a 1 year prospective study among successfully treated ART couples and their controls. *Hum Reprod.* 2007; 22:1481-91.

Ricciarelli E. Marco de actitud ante las gestaciones múltiples: legislaciones y recomendaciones. *Rev Iberoam Fert Rep Hum.* 2007; 24:405-10.

Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:1-14.

Sadowy S, Tomkin G, Munne S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote.* 1998; 6:137-41.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod.* 2003; 18:821-5.

Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod.* 2007; 22:26-35.

Schmidt DW, Maier DB, Nulsen JC, Benadiva CA. Reducing the dose of human chorionic gonadotropin in high responders does not affect the outcomes of in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004; 82:841-6.

Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15:2394-403.

Simon C, Pellicer A. Encuentro de expertos sobre gestaciones múltiples. *Rev Iberoam Fert Rep Hum.* 2005; 22:309-10.

Stadtmauer LA, Sarhan A, Duran EH, Beydoun H, Bocca S, Pultz B, et al. The impact of a gonadotropin-releasing hormone antagonist on gonadotropin ovulation induction cycles in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2011; 95:216-20.

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

Stromberg B, Dalhquist G, Ericsson A, Finnstrom O, Koster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in vitro fertilization: a population based-study. *Lancet.* 2002; 359:461-5.

Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:617-30.

Suikkari AM. In-vitro maturation: its role in fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008; 20:242-8.

Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P. GnRH antagonist in ovarian stimulation for FIV. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:333-40.

Tavanitou A, Albano C, Smitz J, Devroey P. Impact of ovarian stimulation on corpus luteum function and embryonic implantation. *J Reprod Immunol.* 2002; 55:123-30.

Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999; 14:1318-23.

Thornhill AR, Die-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod.* 2005; 20:35-48.

Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablanoswka B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in-vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2004; 351:2392-402.

Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16:583-9.

Trevisan Albuquerque LE, Saconato H, Maciel MCR, Tso LO. Depot versus daily administration of gonadotrophin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 1. Art. No.: CD002808. DOI: 10.1002/14651858.CD002808.pub2.

Tur R, Coroleu B, Torelló MJ, Boada M, Veiga A, Barri PN. Prevención del embarazo múltiple en fecundación in vitro en España. *Rev Iberoam Fert Rep Hum.* 2005; 22:315-22.

Ubaldi F, Rienzi L, Baroni E, Ferrero S, Iacobelli M, Minasi MG, et al. Hopes and facts about mild ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14:675-81.

Upkong D, Orji E. Mental health of infertile women in Nigeria. *Turk Psikiyatri Derg.* 2006; 17:259-65.

Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod.* 2001; 16:1237-43.

Van der Gaast MH, Eijkemans MJ, Van der Net BJ, De Boer EJ, Burger CW, Van Leeuwen FE, et al. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online.* 2006; 13:476-80.

Van Leeuwen FE, Klip H, Mooij TM, Van de Swaluw AM, Lambalk CB, Kortman M, et al. Risk of borderline and invasive ovarian tumours after ovarian stimulation for in vitro fertilization in a large Dutch cohort. *Hum Reprod.* 2011; 26:3456-65.

Van Wely M, Kwan I, Burt AL, Thomas J, Vail A, Van der Veen F, et al. Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 2. Art. No.: CD005354. DOI: 10.1002/14651858.CD005354.pub2

Veeck L. An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.

Verberg MF, Eijkemans MJ, Macklon NS, Heijnen EM, Fauser BC, Broekmans FJ. Predictors of low response to mild ovarian stimulation initiated on cycle day 5 for IVF. *Hum Reprod.* 2007; 22:1919-24.

Verberg MF, Eijkemans MJ, Heijnen EM, Broekmans FJ, De Klerk C, Fauser BC, et al. Why do couples drop-out from IVF treatment? A prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2008; 23:2050-5.

Verberg MF, Eijkemans MJ, MacKlon NS, Heijnen EM, Baart EB, Hohmann PP, et al. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2009; 15:5-12.

Vlahos NF, Economopoulos KP, Creatsas G. Fertility drugs and ovarian cancer risk: a critical review of the literature. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1205:214-9.

Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53:375-80.

Wang K, Li J, Zhang JX, Zhang L, Yu J, Jiang P. Psychological characteristics and marital quality of infertile women registered for in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in China. *Fertil Steril.* 2007; 87:792-8.

WHO, World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction.* 5^a Ed. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 2010.

Wimalasundera RC, Trew G, Fisk NM. Reducing the incidence of twins and triplets. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003; 17:309-29.

Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod.* 2000; 15:2591-7.

Yu Ng EH, Yeung WS, Yee Lan Lau E, So WW, Ho PC. High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod.* 2000; 15:250-5.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The ICMART and WHO revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009; 24:2683-7.

Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KL, Loft A, Lindhard A, Nyboe A. Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1457-60.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod.* 2002; 17:1327-33.

Zreik TG, Mazloom A, Chen Y, Vannucci M, Pinnix CC, Fulton S, et al. Fertility drugs and the risk of breast cancer: a meta-analysis and review. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 124:13-26.

Glosario

TÉRMINO	DEFINICIÓN
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
CC	Citrato de clomifeno
E2	Estradiol
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
FIV	Fertilización in Vitro
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHr	FSH recombinante
FSHu	FSH urinaria
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG	Gonadotropina Coriónica Humana
hMG	Gonadotropina Menopáusica Humana
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de Masa Corporal
LH	Hormona luteinizante
LHr	LH recombinante
RA	Reproducción Asistida
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SET	Transferencia de embrión único
SHO	Síndrome de Hiperestimulación Ovárica
SOP	Síndrome de Ovario Poliquístico
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida

Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado

Consentimiento informado para participar en el estudio **-Estimulación ovárica para ciclos de fecundación in vitro con dosis mínimas de gonadotropinas y antagonistas de la GnRH frente a tratamiento habitual con altas dosis de gonadotropinas y agonistas de la GnRH-**

El Sr. DNI

Y la Sra. DNI

Los abajo firmantes constituimos una pareja sometida a desarrollo folicular múltiple para fecundación in vitro en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Somos conscientes de que la inclusión en este estudio no supone someternos a ninguna prueba o procedimiento diagnóstico añadido.

Entendemos que se utilizarán los datos resultantes de ser sometidos a desarrollo folicular múltiple y que se realizarán investigaciones en material biológico nuestro (suero, líquido folicular y células de la granulosa) en este estudio, y que de no aceptar la participación en este estudio dicho material sería desechado pues no tiene interés clínico actual su estudio.

Hemos sido informados de que en cualquier momento tenemos derecho a conocer los resultados de los estudios realizados con nuestro material biológico y de abandonar el estudio en cualquier momento.

Manifestamos nuestra firme voluntad de participar en este estudio.

Leído, firmado y aceptado por ambos miembros de la pareja

(Nombres y firmas)

El médico responsable

(Nombre y firma)

En Granada, a de de 2.....

Anexo 2: Hoja de datos

Grupos de estimulación

Número de caso:

Edad (años):

IMC (Kg/m²):

Meses de esterilidad:

Nivel basal de FSH (UI):

Indicación del tratamiento de fertilidad:

a. Factor masculino

b. Factor desconocido

c. Factor femenino

Dosis total de FSH (UI):

Días de estimulación:

E2 el día de la administración de la hCG (pg/mL):

Número de ovocitos por punción:

Número de ovocitos en metafase II:

Número de ovocitos inyectados:

Número de ovocitos fecundados:

Número de embriones:

Número de embriones de buena calidad:

Número de embriones transferidos:

Número de embriones congelados:

Embarazo clínico: SI / NO **Múltiple:** SI / NO

Aborto: SI / NO

Recién nacido: SI / NO

Cancelación de ciclo: SI / NO

Causa de cancelación de ciclo:

a. Baja respuesta

b. Alta respuesta

c. Otros

Coasting: SI / NO

Número de días de coasting:

Síndrome de hiperestimulación ovárica: SI / NO

Coste de FSH (€):

Dosis total de antagonista de la GnRH (jeringas precargadas):

Coste del antagonista de la GnRH (€):

Número de envases de análogos de la GnRH:

Coste del análogo de la GnRH (€):

Coste total de tratamiento (€):

Índice de figuras

Figura 1:	Porcentaje de ciclos por causa de infertilidad y año de pacientes que han recibido tratamiento de FIV	23
Figura 2:	Esquema de protocolo largo con análogos de la GnRH	31
Figura 3:	Esquema de protocolo corto con análogos de la GnRH	34
Figura 4:	Esquema de protocolo ultracorto con análogos de la GnRH	35
Figura 5:	Esquema de un cigoto	40
Figura 6:	Cinética de división embrionaria esperada en FIV-ICSI	42
Figura 7:	Asimetría en la división celular embrionaria	43
Figura 8:	Embriones con asimetría entre sus blastómeras por asincronía en la división celular	44
Figura 9:	Planos de división embrionaria	45
Figura 10:	Calidad embrionaria en día + 2 según ASEBIR (Arday et al., 2008)	47
Figura 11:	Calidad embrionaria en día + 3 según ASEBIR (Arday et al., 2008)	47
Figura 12:	Esquema de protocolo de estimulación suave	63
Figura 13:	Representación esquemática de los dos protocolos de estimulación ovárica para ciclos de FIV-ICSI	83

Índice de tablas

Tabla 1:	Descripción de la muestra	91
Tabla 2:	Indicación del tratamiento de fertilidad	92
Tabla 3:	VARIABLES DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA	93
Tabla 4:	Parámetros de laboratorio	95
Tabla 5:	Resultados de gestaciones	97
Tabla 6:	Complicaciones derivadas del tratamiento de estimulación	99
Tabla 7:	Coste del tratamiento de estimulación	100