

*Universidad de Oviedo*

Máster Universitario en  
Biología y Tecnología de la Reproducción

**RESULTADOS FIV/ICSI EN MUJERES  
MENORES DE 38 AÑOS  
UNIDAD DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA  
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE  
ASTURIAS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autora: Alea Pastor Ruiz

Tutora: Lourdes Sánchez Castro

Oviedo, 13 de junio de 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutora y directora del Trabajo Fin de Máster, la Dra. Lourdes Sánchez, todo el apoyo y la ayuda recibida en la realización de este trabajo.

Gracias a mi familia, por estar ahí siempre, y a Miguel, por apoyarme y ayudarme en cada nuevo proyecto.

Gracias a Elvira, por acompañarme durante este año de estudio y hacerme ver las cosas de otro color.

Por último y no menos importante, gracias a mis amigas Ana, Elena Lucía, Ángela, Marta, Silvia y Graciela porque ya son muchos años juntas acompañándonos en nuestros proyectos.

## **ABREVIATURAS**

AMH. Anti-Müllerian Hormone

ASEBIR. Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva

ASRM. American Society for Reproductive Medicine

ESHRE. European Society of Human Reproduction and Embryology

FIV. Fecundación In Vitro

FSH. Follicle- Stimulating Hormone

GnRH. Gonadotropin-Releasing Hormone

hCG. Human Chorionic Gonadotropin

ICSI. Intracytoplasmic Sperm Injection

IMC. Índice de Masa Corporal

OMS/WHO. Organización Mundial de la Salud

RA. Reproducción Asistida

RFA. Recuento de folículos antrales

RO. Reserva Ovárica

ROD. Reserva Ovárica Disminuida

SEF. Sociedad Española de Fertilidad

SHO. Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

TRA. Técnicas de Reproducción Asistida

# ÍNDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	10
MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
<i>Población en estudio</i> .....	11
<i>Determinación de marcadores de reserva ovárica</i> .....	11
<i>Protocolos de estimulación ovárica</i> .....	12
<i>Punción Folicular</i> .....	13
<i>Protocolo de laboratorio</i> .....	13
<i>Transferencia embrionaria</i> .....	14
<i>Análisis estadístico</i> .....	15
RESULTADOS .....	16
<i>Relación entre los marcadores de RO y los resultados de la técnica</i> .....	16
<i>Relación entre los marcadores de respuesta clínica y los resultados</i> .....	16
<i>Resultados de la punción folicular y su relación con el resultado de la técnica</i> .....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	23
BLIBLIOGRAFÍA .....	24

## INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la medicina reproductiva podemos definir fertilidad como la capacidad de una pareja para tener hijos. El concepto infertilidad, o esterilidad, corresponde a lo opuesto de fertilidad, es decir, la incapacidad de una pareja para tener hijos. Hasta hace unos años estos dos conceptos se diferenciaban entre sí; se entendía por esterilidad la dificultad para conseguir el embarazo y por infertilidad la dificultad para conseguir que los embarazos concluyeran en recién nacidos. Hoy en día el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española los considera como sinónimos.

La definición más aceptada de esterilidad/infertilidad es la de la ausencia de consecución de embarazo tras 12 meses de relaciones sexuales sin empleo de métodos anticonceptivos. Esta es la definición que emplea la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), la Asociación Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM) y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE). La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) define la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por la no consecución de un embarazo clínico tras 12 meses o más de relaciones sexuales habituales sin anticoncepción<sup>1</sup>.

Más de 70 millones de parejas tienen problemas de fertilidad<sup>2</sup> estimando la prevalencia de la esterilidad en torno al 10 al 20% de la población occidental aunque por ser porcentajes orientativos resultan difícilmente comparables entre poblaciones y periodos de tiempo diferentes.

La prevalencia en España se sitúa actualmente entre un 15% y un 25%. Más o menos, existen unas 800.000 parejas con problemas de fertilidad, de las cuales 23/1000 son demandantes de tratamientos para conseguir embarazo. Los expertos estiman que estas cifras tenderán a incrementarse en los próximos 10 años, lo que la hará que la demanda asistencial aumente en la misma línea.<sup>3</sup>

Según el Instituto Nacional de Estadística, en el primer semestre del año 2013 se registraron 210.778 nacimientos, un 6,2% menos que en el mismo periodo de 2012. Se mantiene así la tendencia decreciente de la natalidad española, iniciada en el año 2009. El descenso de los nacimientos se ha producido por el efecto combinado de un menor número de mujeres en edad fértil y de una menor fecundidad.<sup>4</sup>

Esto se corresponde con las tasas europeas de natalidad, que han descendido hasta 1,41 hijos por mujer<sup>5</sup>, valor que es mucho más bajo del de 2,1 hijos por mujer necesarios para mantener el tamaño de la población. Según datos de 2006, las tasas globales de fecundidad de Italia (1,33), Grecia (1,29) y España (1,32) son los más bajos de Europa.<sup>6</sup> Esto puede conllevar nuevos problemas socioeconómicos debido al envejecimiento de la población.

La tendencia a retrasar la maternidad puede contribuir al creciente número de parejas con dificultades para concebir. La introducción en el 1960 de los métodos anticonceptivos ha llevado al nacimiento de un menor número de hijos por familia. Impulsado por el aumento de los niveles de educación de la mujer y una creciente participación en el mercado laboral, el aplazamiento de la maternidad ha sido una consecuencia secundaria de la llamada revolución sexual.<sup>7</sup> Por primera vez, se rompió el vínculo entre sexualidad y reproducción.<sup>8</sup>

A partir de estudios sobre poblaciones en los que no se aplican métodos de control de la natalidad, se ha demostrado que la fertilidad natural comienza a disminuir después de los 30 años, se acelera en torno a los 35 y dará lugar a esterilidad a una edad media de 41<sup>9</sup>. (Figura 1). La reducción en la fertilidad femenina también puede demostrarse a partir de estudios poblacionales contemporáneos. La posibilidad de no concebir un primer hijo dentro de un año es menor del 5% en las mujeres en torno a 20 años de edad y aumenta hasta aproximadamente el 30 % o más en el grupo de edad de 35 años y más.<sup>10</sup>

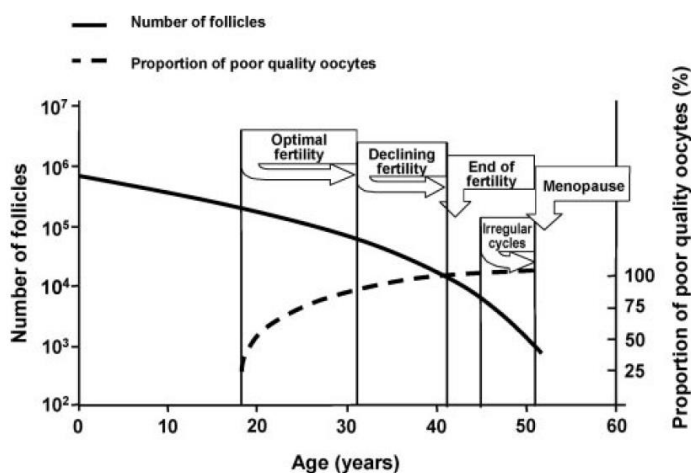


Figura 1: Descenso en el número de folículos primordiales y su calidad según la edad.<sup>8</sup>

Debido a la tendencia general a posponer la maternidad, cada vez un número mayor de mujeres dependerá de las técnicas de reproducción asistida (TRA) para lograr un embarazo, pero el aumento progresivo del envejecimiento reproductivo sumado a la predisposición genética a infertilidad en algunas mujeres, hace que el uso de estas técnicas sea limitado.<sup>11</sup>

El proceso normal de envejecimiento reproductivo varía considerablemente entre las mujeres. Esto implica que algunas mujeres siguen siendo muy fértiles hasta la quinta década de la vida, mientras que otras se enfrentan a la pérdida de la fertilidad natural en la mitad de la treintena.<sup>12</sup> El envejecimiento reproductivo femenino parece basarse en gran medida en los cambios relacionados con la edad y la función ovárica. La disminución del número de folículos en la corteza ovárica, coincidiendo con la calidad de los ovocitos que contienen, dicta los cambios graduales en la regularidad del ciclo menstrual y la fecundidad mensual.<sup>8</sup> En 1991 un estudio relacionó el papel de la calidad ovocitaria con la edad materna en la consecución de embarazo. Las posibilidades de embarazo en mujeres mayores de 40 años por técnicas de reproducción asistida utilizando ovocitos propios son bajas. Estas tasas de embarazo mejoraban cuando se utilizaban ovocitos de donante, lo que sugiere que la disminución en la fecundidad femenina con la edad, se debe a la disminución de la calidad ovocitaria que puede ser corregida con la donación.<sup>13</sup>

Cada mujer recibe una dotación de ovocitos durante el desarrollo fetal. En el cuarto mes de desarrollo fetal, los ovarios contienen unos 6-7 millones de ovocitos rodeados por una capa plana de células de la granulosa que forma la cohorte de folículos primordiales.<sup>14,15</sup> Debido a la pérdida de la gran mayoría de los folículos primordiales a través de la vía de la apoptosis en la segunda mitad de la vida fetal, en el momento del nacimiento quedarán 1-2 millones de folículos primordiales.<sup>16</sup> Después, esta tasa de pérdida de folículos se ralentiza un poco, de modo que en la menarquia se conservan, al menos, entre 300.000 y 400.000 folículos primordiales.<sup>8,14</sup> Posteriormente cientos desaparecen cada mes, incluso durante los períodos en que no se producen ovulaciones, como el embarazo, la lactancia materna y el uso de anticonceptivos orales. Este descenso es continuado y se acelera gradualmente. Por debajo de un número crítico, que corresponde con una edad media de 45-46 años, el patrón de sangrado menstrual se vuelve irregular<sup>17</sup> y al llegar a la menopausia alrededor de los 51 años, el número de

folículos es insuficiente para mantener el proceso hormonal cíclico necesario para la menstruación.<sup>18</sup> (Figura 2)

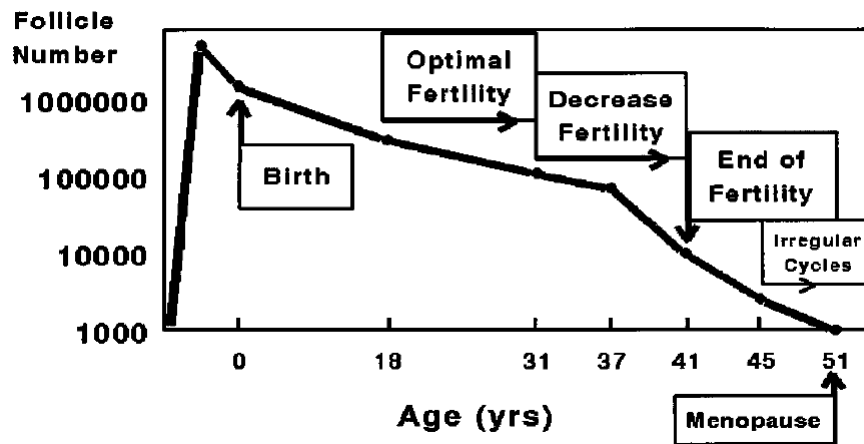


Figura 2: Pérdida de ovocitos/folículos desde el nacimiento según Faddy y col. (1992) y sucesos reproductivos asociados

Junto con la disminución del número de folículos, disminuye también la calidad de los ovocitos. Se cree que la pérdida de la calidad de los ovocitos es debida a un incremento en la no disyunción meiótica, lo que resulta en una tasa creciente de aneuploidía en el embrión temprano a mayor edad materna.<sup>19</sup> También se relacionan con diferencias entre las células germinales en el momento en que se forman durante la vida fetal, daños acumulados en los ovocitos a lo largo de la vida, o cambios relacionados con la edad en la calidad de las células de la granulosa que rodean el ovocito.<sup>20</sup>

Aunque la edad cronológica de una mujer sometida a un ciclo de fecundación in vitro (FIV) para el tratamiento de la infertilidad es un factor importante que afecta el resultado de la técnica, también lo es la edad biológica, es decir, la edad de ovario.<sup>21</sup> Muchos informes publicados indican que la edad de ovario es una variable independiente que afecta fuertemente al resultado de la FIV, mientras que la edad cronológica juega un papel menos importante.<sup>22</sup> El reconocimiento de las pacientes con reserva ovárica disminuida (ROD), independiente de la edad cronológica, antes del inicio de la estimulación ovárica es muy importante y permite a los clínicos informar a las pacientes sobre sus posibilidades reales para conseguir embarazo, y optimizar e



individualizar los protocolos de estimulación y las dosis a administrar de gonadotropinas.<sup>23,24</sup>

Se asume que las pacientes jóvenes con ROD tienen un pool de folículos empobrecido, pero algunos investigadores han propuesto que el mal pronóstico para la FIV no es válido para las pacientes más jóvenes ( $\leq 30$  años) ya que se debe esperar un mejor resultado debido a que su corta edad las protege de los efectos adversos de la disminución de la reserva ovárica.<sup>25</sup>

Se puede considerar una reserva ovárica (RO) normal cuando la estimulación ovárica con el uso de gonadotropinas exógenas se traduce en el desarrollo de al menos 8-10 folículos y la recuperación de un número correspondiente de ovocitos sanos en la punción folicular.<sup>26</sup> Con este resultado, las posibilidades de producir un nacimiento vivo por FIV se consideran óptimas. En general, como se ha señalado anteriormente, la edad de la mujer es una forma sencilla de obtener información sobre la extensión de su RO tanto en términos de cantidad como de calidad.<sup>21</sup> Sin embargo, existe una necesidad de identificar a las mujeres de edad temprana con ROD, al igual que a las mujeres de más edad pero con suficiente RO todavía.

Para ello, se utilizan varias pruebas de reserva ovárica que se han convertido en parte de la evaluación pre-tratamiento estándar para la FIV, diseñadas para predecir el rendimiento de los ovocitos y la tasa de embarazo. La prueba de reserva ovárica ideal debería identificar un porcentaje alto de los casos con posibilidad casi inexistente de embarazado debido a los efectos negativos de la ROD. Esos casos con resultados mínimos podrían ser excluidos de los tratamientos debido a sus altos costes sin garantías de éxito.

Todo ello ha hecho que haya una gran cantidad de publicaciones donde se estudia la utilidad de los marcadores de RO para predecir la respuesta al tratamiento y poder individualizar cada ciclo. Clásicamente se ha medido la hormona folículo estimulante (FSH) o el estradiol pero debido a su utilidad limitada se han buscado nuevos marcadores como la hormona anti-mulleriana (AMH) o el recuento de folículos antrales (RFA) que parecen que tienen mayor correlación con la RO.

En la década de los 80, los niveles de **FSH** medidos durante la fase folicular temprana se relacionaron con resultados reproductivos.<sup>27</sup> La elevación en suero de FSH

es una compensación hipofisaria de un ovario envejecido y menos sensible, con menor número de ovocitos y menor producción de estradiol.

La medida de FSH se realiza generalmente en el día 2 o 3 de la menstruación, donde el día 1 se define como el primer día de flujo completo. Sin embargo, como los valores de FSH son bastante estables desde el día 2 al 5 dentro del mismo ciclo menstrual, la medición de la FSH cualquier punto dentro de esta ventana probablemente dará resultados comparables.<sup>28</sup>

No todos los laboratorios utilizan inmunoensayos idénticos para medir FSH, y esto se debe tener en cuenta cuando se comparan los datos de varios centros. Las diferencias en los anticuerpos policlonales usados en algunos ensayos producirán cambios en el contenido total de FSH. Además, existe una fluctuación fisiológica de las diferentes isoformas de la FSH durante el ciclo menstrual que puede dar mayor variabilidad a la medida de esta hormona. Aun así, los estudios demuestran que las mujeres sometidas a FIV con una FSH menor a 15 mUI/ml medidos en día 3 tienen el doble de posibilidades de quedarse embarazadas que las mujeres con FSH entre 15 y 24,9 mUI/ml.<sup>29</sup> Este hallazgo es coherente con otro estudio donde se observó una disminución pronunciada en los embarazos cuando la FSH superaba 20 mUI/ml.<sup>30</sup> Varios meta-análisis sobre los niveles de FSH basal encontraron que su capacidad para predecir una mala respuesta y no embarazo solo tenía aplicación clínica a niveles muy altos.<sup>31,32</sup> La medición de FSH en día 3 en una paciente puede presentar variaciones en meses consecutivos pero, en general, una historia clínica con niveles basales elevados en pacientes de edad inferior a 40 años prevé un rendimiento reducido en resultados de FIV.<sup>33</sup>

Fisiológicamente, la mayor parte del **estradiol** se origina en las células de la granulosa, en el compartimento que contiene el fluido folicular y que está más próximo al ovocito. Se ha demostrado, que los niveles basales de estradiol correlacionan inversamente con la respuesta ovárica a gonadotropinas y que pacientes con estradiol basal >80pg/ml medidos en día 3 del ciclo tienen mayor tasa de cancelación y menores tasas de embarazo, independientemente de los valores de FSH.<sup>34</sup>

10 estudios diferentes analizaron los niveles de estradiol antes de comenzar ciclos de FIV y se encontró que tenía baja capacidad para predecir la pobre respuesta y no

embarazo.<sup>31</sup> Sin embargo el primer estudio que correlacionó resultados reproductivos con FSH y estradiol afirmó que en ausencia de tratamiento con agonista de la GnRH no se conseguía embarazo con estradiol >75pg/ml, incluso cuando la FSH era <20mIU/ml.<sup>35</sup>

La **AMH** es una glicoproteína dimérica que bloquea el desarrollo de los conductos de Muller en los embriones masculinos. La AMH es detectable durante toda la infancia en los hombres, pero no suele estar presente en las mujeres hasta la pubertad. En la pubertad, las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños comienzan a producir esta hormona para regular el estado de ovocitos inhibiendo el excesivo reclutamiento folicular producido por los niveles de FSH.<sup>36</sup> La medición de AMH como marcador de RO conlleva ventajas sobre otros métodos. En primer lugar, la AMH se cree que es el marcador más precoz, puede identificar la reserva ovárica disminuida antes que las técnicas de detección habituales. A diferencia de la FSH, la AMH puede ser medida en cualquier día del ciclo menstrual y, además, los niveles de AMH medidos durante varios meses muestran una menor variabilidad entre ciclos.<sup>37</sup>

Estudios recientes muestran que en las mujeres con diferentes grados de hipergonadotropismo la AMH parece el mejor parámetro para evaluar el grado de agotamiento de los folículos y es, posiblemente, el mejor marcador para el diagnóstico de fallo ovárico precoz.<sup>38</sup>

El **RFA** es el número total de folículos antrales de entre 2 a 5 o 2 a 10 mm de tamaño, presente en ambos ovarios y visibles por ecografía transvaginal. Un rango estimado de 20 a 150 folículos en crecimiento (de 0,05 a 2,00 mm de diámetro) está presente en todo momento en los ovarios de las mujeres de entre 25 a 40 años. Estos folículos son demasiado pequeños para ser identificados con precisión con técnicas de imagen convencionales pero hay una pequeña proporción que se desarrolla a folículos antrales de más de 2 mm de diámetro. Estos folículos son altamente sensibles y responden a la FSH describiéndose como seleccionables.<sup>39</sup> Se ha demostrado que el RFA puede predecir la respuesta ovárica y el embarazo.<sup>40,41</sup> Sin embargo, un meta-análisis de 15 estudios publicados sobre el RFA concluyó que la precisión de esta prueba para predecir una mala respuesta fue satisfactoria sólo a un nivel de umbral bajo y que, debido al número limitado de los resultados anormales de las pruebas, tenía

apenas cualquier valor clínico para predecir el embarazo.<sup>31</sup> Aunque otro meta-análisis concluye que el rendimiento del RFA en la predicción de la pobre respuesta ovárica es bastante adecuada y superior al de la FSH basal y que en vista de esta precisión, su menor variabilidad interciclo, su bajo coste, y la viabilidad de la prueba puede ser preferible a la FSH basal en la evaluación de la RO.<sup>42</sup>

Cada prueba de reserva ovárica actual se refiere a tamaño de la cohorte de folículos. El RFA hace mediciones directas del número de folículos. La AMH liberada de folículos antrales proporciona un marcador directo de cantidad. La FSH basal es un marcador indirecto relacionado con estradiol producido en el ovario. La evaluación de los marcadores de RO para la predicción de resultados individuales se basa en tres criterios. Uno de ellos es la precisión de la prueba que indica en qué medida la prueba predice correctamente el resultado de interés, generalmente expresada como el área bajo la curva Característica Operativa del Receptor (curva ROC). En segundo lugar, el valor clínico de la prueba debe evaluarse teniendo en cuenta cómo un marcador de RO anormal cambiaría el manejo de la pareja infértil. En tercer lugar, como ninguna prueba es perfecta, es necesario conocer la proporción de falsos positivos que conducen a decisiones erróneas y el porcentaje de pruebas anormales en la población estudiada.<sup>12</sup>

Es probable que en el futuro que con la normalización en las medidas de AMH y el RFA se puedan hacer modelos de predicción con intervalos de confianza ajustados para la generación de informes personalizados. Ya se han dado pasos en este camino en el ajuste de dosis, utilizando una combinación de AMH, FSH, edad, tabaquismo e índice de masa corporal.<sup>43,44</sup>

El índice de masa corporal (IMC) elevado, asociado al sobrepeso y la obesidad, se ha relacionado con mayores cantidades de gonadotropinas usadas en el estímulo, menor número de ovocitos recuperados en la punción folicular y mayor tasa de cancelación de ciclos de FIV.<sup>45</sup>

Un meta-análisis de 11 estudios que define el **IMC** de acuerdo a la definición de la OMS demuestra que el sobrepeso y la obesidad se asocian con menor número de ovocitos y menores tasas de embarazo dentro de una población de mujeres infértiles.<sup>46</sup> Sin embargo otro estudio demuestra que estos resultados dependen de la edad de la

paciente, siendo peores en mujeres jóvenes<sup>47</sup> por lo que sería recomendable una pérdida de peso antes del inicio del tratamiento.

Como resultado de la edad materna para concebir y el aumento de los problemas de esterilidad, cada vez hay más parejas que acuden a las Unidades de Reproducción en busca de una solución a su problema.

En líneas generales los tratamientos básicos que se ofertan son la Inseminación Artificial y la Fecundación in vitro. Ambas requieren estímulo ovárico con gonadotropinas. La dosis se pauta principalmente en función de los factores anteriormente descritos: edad de la paciente y marcadores de RO.

Dado que la eficacia de las TRA disminuye significativamente con la edad, en este trabajo hemos seleccionado pacientes que tenían menos de 38 años al momento del tratamiento, descartando así todas las mujeres que por edad presentan menos posibilidades de conseguir embarazo.

Haciendo uso de los medios disponibles en Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias, el objetivo de este trabajo es intentar identificar si en aquellas mujeres que consiguen embarazo existe algún marcador de RO o algún parámetro de respuesta clínica que permita la identificación de este grupo de mujeres.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Nuestra hipótesis de trabajo es que en una población seleccionada de mujeres jóvenes (<38 años) consiguen embarazo aquellas que tienen marcadores de RO más favorable.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Comprobar qué diferencias hay en los marcadores de RO entre las mujeres que consiguen embarazo y las que no.
2. Analizar si la dosis total de medicación usada en el estímulo ovárico, la duración del mismo y el valor del último estradiol influyen en la consecución del embarazo.
3. Determinar si el número total de ovocitos y de embriones influye en el resultado final del tratamiento.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Población en estudio***

Para la realización de este estudio observacional retrospectivo se recogieron los datos de las pacientes menores de 38 años que realizaron tratamiento de FIV/ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides), en la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA, durante el período comprendido entre junio de 2010 y diciembre de 2013.

Se estudiaron un total de 181 ciclos, en mujeres con una edad comprendida entre 25 y 37 años, siendo la edad media 33,7 años. Se consideraron independientes los ciclos realizados por la misma mujer; la proporción de más de un ciclo en la misma paciente durante este período pequeña y existen estudios que demuestran que no hay diferencias significativas si se consideran como ciclos independientes.

Todos los ciclos fueron en fresco, no se estudian los ciclos de embriones descongelados. Y solamente se estudiaron aquellas pacientes sometidas a técnicas de FIV o ICSI.

Las pacientes que acuden a la Unidad acompañan un estudio de esterilidad básico realizado previamente. Incluye un perfil hormonal, histerosalpingografía, cariotipo y serología. En este estudio no se tuvieron en cuenta los factores de esterilidad de cada paciente.

En la primera consulta en la Unidad se realiza la anamnesis y la exploración general y ginecológica de la mujer, y se estudia qué tratamiento es el más adecuado para cada paciente. Una vez que tiene lugar la primera consulta las pacientes pasan a lista de espera, que es de aproximadamente 18 meses.

### ***Determinación de marcadores de reserva ovárica***

La concentración de FSH y estradiol basales se determinaron en sangre periférica entre el día 3 y 5 del ciclo.

Para la determinación de FSH se utiliza un inmunoensayo automatizado tipo sándwich de electroquimioluminiscencia que emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la FSH humana.

Para determinar el estradiol se utiliza un inmunoensayo competitivo automatizado de electroquimioluminiscencia, que emplea un anticuerpo policlonal específicamente dirigido contra el 17β-estradiol.

El índice de masa corporal es un cociente que expresa la relación entre el peso medido en kilogramos y la altura en metros al cuadrado.

$$\text{IMC}=\text{Peso}(\text{kg})/[\text{altura}(\text{m})]^2$$

### ***Protocolos de estimulación ovárica***

Todas las mujeres estudiadas han sido tratadas con protocolo de estimulación que usan gonadotropinas pero que se diferencian en el tipo de análogo que se utiliza para realizar el frenado hipofisiario.

*Protocolo largo.* El análogo de la GnRH (0.2ml/día), se administra en la fase lútea media del ciclo previo a la estimulación (día 21 del ciclo previo), mediante inyección subcutánea. El día 1 de la estimulación se baja la dosis de análogo de la GnRH (0.1 ml/día) y se inicia el estímulo con hormona FSH (150-300 IU/día). El día 7 se realiza control ecográfico para valorar reclutamiento folicular.

*Protocolo corto.* Se administran anticonceptivos orales, durante al menos 15 días previos al inicio de la estimulación. El día 2 o 3 del ciclo se inicia el estímulo con hormona FSH (150-300 IU/día) y el día 7 del ciclo se añade antagonista de la GnRH (0.25 mg/día) mediante inyección subcutánea. Ese día se realiza control ecográfico para valorar reclutamiento folicular.

En ambos tratamientos el frenado hipofisiario es necesario para evitar un pico de LH endógeno, que desencadenaría la ovulación espontánea y la cancelación del ciclo.

La estimulación ovárica se realizó con gonadotropinas recombinantes en la mayoría de los casos, aunque en algún ciclo también se usaron gonadotropinas urinarias



utrapurificadas. Las dosis se ajustaron en función de la edad y del peso de la paciente, y teniendo en cuenta los valores de marcadores de RO.

El día 10 del ciclo se realiza un segundo control ecográfico y análisis de estradiol (valor del último estradiol) en sangre periférica. 100-200pg/ml de estradiol por folículo maduro y un mínimo de 4 folículos con un diámetro comprendido entre 18 y 20 mm nos indican que se ha alcanzado un desarrollo folicular adecuado.

La inducción de la ovulación se provocó 36 horas previas a la punción folicular y, en la mayoría de los casos, se usó gonadotropina coriónica humana (hCG) recombinante (250 mg) por inyección subcutánea. En algunas situaciones en que la paciente tenía riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO) y el protocolo de estímulo era un protocolo corto, se usó agonista de la GnRH para desencadenar la ovulación.

La duración del estímulo oscila entre 9 y 13 días dependiendo de la respuesta al tratamiento.

### ***Punción Folicular***

La técnica que se utiliza es una punción folicular guiada por ecografía transvaginal. Se realiza entre las 36 y 38 horas después de la administración de la hCG. Las pacientes acuden en ayunas y la extracción de los óvulos se realiza en el quirófano de FIV, bajo sedación anestésica.

Se da apoyo de fase lútea, mediante el aporte de progesterona natural micronizada intravaginal (400 mg/día) que se inicia el día de la punción y se mantiene durante los 15 días siguientes.

### ***Protocolo de laboratorio***

Para la realización de las técnicas de FIV e ICSI, se siguieron los protocolos establecidos en el laboratorio de embriología de la Unidad.

La captación de los ovocitos se realizó en campana de flujo laminar con superficie calefactada. Los líquidos foliculares procedentes de la punción se examinaron a la lupa

y se recogieron todos los ovocitos pasándolos a una placa con medio de cultivo. Se mantuvieron en una incubadora a 37°C y una atmósfera con 6% de CO<sub>2</sub>.

En la mayoría de los ciclos, la ICSI fue la técnica elegida para la fertilización y sólo en algunos casos seleccionados, parte de la cohorte de los ovocitos se inseminaron por FIV convencional.

Los medios de cultivo usados en todos los casos son de la casa comercial COOK y se siguieron los protocolos establecidos por la casa para el cultivo de los gametos y de los embriones.

La fertilización se valoró entre las 16-18 horas post-punción, y sólo se mantuvieron en cultivo aquellos cigotos en los que se observaron 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares, es decir, aquellos ovocitos que habían sido fertilizados adecuadamente.

Los embriones se mantuvieron en cultivo 2 o 3 días post-punción hasta el momento de la transferencia, dependiendo de los casos.

### ***Transferencia embrionaria***

Se realiza una transferencia intrauterina. Las pacientes se sometieron a la técnica 48 o 72 horas después de la punción (día +2, día +3) que se realiza guiada por ecografía abdominal y sin anestesia.

La transferencia es de un máximo de 3 embriones, de acuerdo a la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. En la mayoría de los casos, y de acuerdo con la pareja tratada, se transfirieron 2 embriones; sólo en aquellas situaciones en las que el riesgo de embarazo triple era bajo, se transfirieron 3 embriones.

Los casos de transferencia de 1 embrión se produjeron cuando no se disponía de más embriones para transferir o si la pareja no aceptaba el riesgo de un embarazo gemelar.

Los embriones sobrantes que no se transfieren se congelaron o no, dependiendo de la calidad embrionaria.

Tras la transferencia se mantiene el aporte de progesterona para soporte de fase lútea y, a los 15 días de la transferencia se realiza un test de embarazo con la primera orina de la mañana para confirmar si hubo o no embarazo.

### ***Análisis estadístico***

Las variables continuas se describen mediante medias y desviaciones típicas. La comparación de medias por cada factor considerado se realizó mediante el test de Student-Welch y el test de ANOVA robusto de Welch. La independencia entre variables categóricas se realizó mediante el test exacto de la Chi cuadrado.

## RESULTADOS

### *Relación entre los marcadores de RO y los resultados de la técnica*

Para el estudio de los marcadores de RO se analizaron el IMC, la FSH y el estradiol basales. En todos los casos las pacientes se dividen en dos grupos: aquellas que presenta una prueba de embarazo positiva medida como  $\beta$ -HCG positiva en orina 15 días después de la transferencia y aquella en las que la prueba resultó negativa.

La tabla 1 muestra las medias y las desviaciones típicas para estos parámetros en los ciclos que consiguieron embarazo y en aquellos en los que fue negativo.

	<i>Embarazo</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>P valor</i>
<i>IMC</i>	Sí	67	23.07	3.59	0.333
	No	114	23.45	3.60	
<i>FSH</i>	Sí	67	6.67	1.83	0.434
	No	114	6.40	1.66	
<i>Estradiol</i>	Sí	67	44.47	17.82	0.472
	No	114	51.13	27.80	

*Tabla 1: Medias y desviación típica para IMC (Kg/m<sup>2</sup>), FSH (UI/l) y estradiol (pg/ml) basales en los grupos de estudio*

Los resultados indican que no se observan diferencias significativas para estos marcadores como predictores de un buen resultado de la técnica, no permitiendo distinguir a aquellas mujeres que consiguen embarazo de las que no lo logran.

### *Relación entre los marcadores de respuesta clínica y los resultados*

Para el estudio de los marcadores de estímulo se utilizaron el número de días para conseguir el reclutamiento folicular necesario previo a la punción (oscila entre 9 y 13

días dependiendo de la respuesta al tratamiento), la dosis de medicamento utilizada y el valor de último estradiol, medido en el día 10 desde el inicio del tratamiento.

La tabla 2 muestra las medias y las desviaciones típicas para estos parámetros en los ciclos que consiguieron embarazo y en aquellos en los que fue negativo.

	<i>Embarazo</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>P valor</i>
<i>Días de estímulo</i>	Sí	67	10.42	0.82	0.817
	No	113	10.45	0.79	
<i>Dosis de medicamento</i>	Sí	67	2127.15	705.40	0.194
	No	114	2274.21	731.58	
<i>Último Estradiol</i>	Sí	67	1960.09	1020.16	0.314
	No	113	2199.74	1422.87	

*Tabla 2: Medias y desviación típica para los días de estímulo, la dosis de medicación (UI) utilizada y el valor del último estradiol (pg/ml) en los grupos de estudio*

Los resultados indican que no se observan diferencias significativas para estos tres parámetros y no permiten distinguir a aquellas mujeres que consiguen embarazo de aquellas que no lo logran.

### ***Resultados de la punción folicular y su relación con el resultado de la técnica***

Los resultados de la punción folicular se reflejan en el número de ovocitos obtenidos; el número que de ellos llega a madurar y el porcentaje que logra la fertilización. Se usa además, el número de embriones obtenidos y número de embriones sobrantes que pueden ser congelados. Estos parámetros se comparan entre el grupo de pacientes que consigue o no embarazo.

La tabla 3 muestra las medias y las desviaciones típicas para estos parámetros en los ciclos que consiguieron embarazo y en aquellos en los que fue negativo.

	<i>Embarazo</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>P valor</i>
<i>Ovocitos obtenidos</i>	Sí	67	11.81	4.45	0.043
	No	114	10.57	5.59	
<i>Ovocitos en MII</i>	Sí	66	8.44	3.08	0.095
	No	114	7.41	3.70	
<i>% ovocitos fertilizados</i>	Sí	66	71.58	24.54	0.029
	No	114	61.56	29.97	
<i>Embriones obtenidos</i>	Sí	67	5.99	3.07	0.014
	No	114	4.85	3.18	
<i>Embriones congelados</i>	Sí	26	3.04	1.82	0.030
	No	33	3.79	1.43	

*Tabla 3: Medias y desviación típica para el número de ovocitos obtenidos, el número de ovocitos maduros (en metafase II, MII), el porcentaje de fertilización, el número de embriones obtenidos y congelados*

Los resultados indican que se observan diferencias estadísticamente significativas en el número de ovocitos recuperados tras punción folicular siendo superior en el grupo que consigue embarazo. En cuanto al número de ovocitos maduros, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0.095$ ), se observa que el grupo de embarazo tiene una media de ovocitos en metafase II mayor.

Además se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de ovocitos que logran fertilizar, así como en el número de embriones obtenidos. En ambos casos, el grupo de pacientes que tiene una prueba de embarazo positivo presenta una media de mayor valor.

Sin embargo, en el número de embriones congelados presenta una media mayor y estadísticamente significativa en el caso de las mujeres que no han conseguido una prueba de embarazo positiva.

## DISCUSIÓN

Las técnicas de fecundación in vitro son importantes en los tratamientos de la infertilidad. Dos predictores importantes de los resultados de la aplicación de las técnicas de FIV/ICSI son la calidad y el número de embriones obtenidos. Esto se puede optimizar con un adecuado reclutamiento folicular (adecuado número de ovocitos recuperados) derivado de una buena estimulación ovárica. Otros factores que influyen en los resultados son la edad, como indicador de la calidad ovocitaria y la FSH basal, al igual que otros marcadores de RO, como reflejo del número de ovocitos recuperado.

Los marcadores de RO analizados en este trabajo no guardan relación con la probabilidad de conseguir embarazo.

En los niveles de **FSH** no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que consigue embarazo y el que no lo logra. Podría esperarse que las mujeres que no consiguen embarazo tuvieran una FSH más elevada asociado a una reserva ovárica disminuida, pero en este grupo de estudio no hay apenas mujeres que presenten valores de FSH aumentados ( $FSH > 10 \text{ UI/l}$ ).

Solo 4 mujeres de este grupo de estudio muestran una  $FSH > 10 \text{ UI/l}$  y las 4 logran un embarazo. Su edad media es de 32 años y quizás como algunos autores indican es posible que ese posible agotamiento de la reserva ovárica esté protegido por el factor edad ya que, en estos casos, los estudios muestran un menor número de ovocitos recogido pero con tasas de implantación similares a mujeres con reserva ovárica normal.<sup>48</sup>

La FSH basal, medida entre el día 3 y 5 del ciclo, es un marcador clásico indicativo de la RO. La secreción pulsátil por parte de la hipófisis y las diferentes concentraciones sanguíneas de sus isoformas a lo largo del ciclo, hacen que sea un marcador indirecto de función ovárica que no presenta alta sensibilidad y que puede presentar variaciones. Además, según la bibliografía revisada, varios meta-análisis concluyen que la capacidad para predecir no embarazo se da a valores muy altos de FSH ( $FSH > 20 \text{ UI/l}$ )<sup>30-32</sup>, valores que no se encuentran en este grupo de estudio.

En cuanto a los valores de **estradiol** tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de embarazo y el de no embarazo.

Aunque se ha demostrado que niveles basales de estradiol correlacionan inversamente con la respuesta ovárica y que valores  $>80\text{pg/ml}$ <sup>34</sup> medidos en día 3 del ciclo tienen menores tasas de embarazo, no hay definidos puntos de corte que demuestren sensibilidad y especificidad aceptables como marcador de RO.<sup>31,49</sup>

En este grupo estudiado, 18 mujeres presentan un valor de estradiol  $>80\text{pg/ml}$  y de éstas solo 2 consiguen embarazo, lo que está bastante en concordancia con la bibliografía citada.

El tercer marcador de RO utilizado, el **IMC** tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de mujeres que consigue embarazo y el que no lo logra. Quizá sea porque solo 15 mujeres presentan obesidad, definida según la OMS como un  $\text{IMC} >30\text{kg/m}^2$ , y aunque cabría esperar no embarazo es este grupo de pacientes no es eso lo que se encuentra, 5 mujeres consiguen embarazo. El IMC asociado a menor edad predice peores resultados en las tasas de embarazo, pero no encontramos diferencias en este grupo de estudio.<sup>47</sup>

Otro factor a tener en cuenta en los marcadores de RO utilizados en este trabajo es que su determinación se lleva a cabo en la primera consulta que la mujer tiene en la Unidad, por lo que no es representativo del inicio del ciclo. En ese momento, la mujer puede encontrarse en una situación muy diferente ya que desde la primera consulta al inicio del ciclo pueden transcurrir hasta 18 meses.

Si tenemos en cuenta los marcadores de RO analizados en esta población de estudio, el estradiol es el parámetro que mejor refleja la consecución de embarazo, aunque sería necesario aumentar el tamaño muestral con mayor número de mujeres con niveles de FSH y estradiol basales e IMC altos para ampliar el estudio y comprobar este efecto.

Si analizamos esta población de mujeres según la respuesta que tienen al estímulo, se podría pensar que para conseguir una adecuada estimulación ovárica serían necesarios más días o más cantidad de gonadotropinas administradas en los casos que consiguen embarazo, sobre todo, en aquellas mujeres que tienen unos marcadores de reserva ovárica elevados o que presentan obesidad. En esta población de estudio no se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la dosis administrada o a los días de estímulo en el grupo que consigue embarazo frente al que no lo consigue.



Quizás si el porcentaje de mujeres con marcadores de reserva ovárica elevados o con obesidad fuese más alto se podrían haber hecho subgrupos para estudiar más a fondo la influencia de estos parámetros en la consecución de embarazo.

El valor del último estradiol se determina el día anterior a la administración de la HCG que desencadena la ovulación. Cada folículo maduro se corresponde con un nivel sérico de estradiol que oscila entre los 100-200 pg/ml. Con esto, cabría esperar que las pacientes que consiguen mayor número de ovocitos tuvieran un valor del último estradiol más elevado. En el conjunto de mujeres a estudio no es lo que observamos ya que no se hay diferencias estadísticamente significativas en este parámetro en el grupo de mujeres que consiguen embarazo frente al no embarazo. Una posible explicación es que estos niveles de estradiol se corresponden con cada folículo, pero no todos los folículos contienen ovocitos, por lo que puede haber mujeres con semejantes valores de estradiol pero diferente número de ovocitos.

El número de ovocitos obtenidos en la punción es mayor en el grupo que consigue embarazo y la diferencia es estadísticamente significativa respecto al no embarazo. Además el número de ovocitos maduros, es decir, en metafase II es ligeramente superior en el grupo de mujeres que logra embarazo, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

Las diferencias en el número de ovocitos no se explican con los marcadores de reserva ovárica utilizados en este trabajo. Para intentar justificarlos, es posible que fuese necesario utilizar marcadores más precisos como la AMH. La AMH es el marcador más precoz de agotamiento folicular y además presenta menor variabilidad interciclo.<sup>37</sup> Pero las particulares características de la determinación de AMH hacen que no esté disponible de manera rutinaria en el laboratorio de hormonas del hospital. Otro posible parámetro a utilizar puede ser el RFA, aunque diferentes estudios muestran conclusiones contradictorias, dando algunos autores poco valor clínico para predecir embarazo<sup>31</sup> mientras otros lo prefieren en lugar del nivel de FSH basal.<sup>42</sup>

Se observa también que, al igual que ocurre con el número de ovocitos, es mayor el porcentaje que fertilizan y los embriones obtenidos en el grupo de embarazo positivo, con diferencias estadísticamente significativas. En este apartado, puede que la calidad juegue un papel importante. El menor número de ovocitos obtenidos y el menor

porcentaje de fertilización pueden ser debidos a la menor calidad ovocitaria que se correspondería con una reserva ovárica en disminución, ya que el factor edad queda eliminado en este grupo de mujeres.

En la valoración de resultados de ciclos de FIV/ICSI hay otro parámetro relevante y que en este trabajo no se ha tenido en cuenta: la calidad embrionaria. Es posible que, independientemente del número de ovocitos y embriones obtenidos, hubiésemos encontrado mayor calidad embrionaria en el grupo que consigue embarazo. Sería importante incluirlo en trabajos posteriores para completar los estudios.

Por último, es conveniente tener en cuenta que la probabilidad de embarazo tras FIV/ICSI no depende solamente de unos marcadores de RO. Las causas de esterilidad, que aquí no se han tenido en cuenta, o los antecedentes familiares son factores que también influyen en el resultado de la técnica.

## **CONCLUSIONES**

4. En la población a estudio los marcadores de RO analizados (FSH y estradiol basales e IMC) no muestran diferencias en el grupo que logra embarazo frente al grupo de no embarazo
5. La duración del estímulo, la cantidad de gonadotropinas administradas y el valor del último estradiol no muestra diferencias estadísticamente significativas en el grupo de embarazo positivo y en el de no embarazo.
6. Se observa una diferencia significativa en el número de ovocitos, porcentaje de fertilizados y embriones obtenidos consiguiendo mayor número el grupo que logra embarazo positivo.

## BLIBLIOGRAFÍA

1. Zegers-Hochschild F. et al. Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Traducido y Publicado por la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida en 2010. Organización Mundial de la Salud 2010.
2. Boivin J et al. International estimates of infertility prevalence and treatment seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007; 22(6):1506-1512.
3. Sociedad Española de fertilidad. Libro blanco sociosanitario. “La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas”. Imago Concept & Image Development, S.L., Madrid 2011
4. Instituto Nacional de estadística. Estadísticas del Movimiento Natural de la Población (Nacimientos, Defunciones y Matrimonios). Avance de resultados del primer semestre de 2013 y datos definitivos de 2012. Nota de prensa, diciembre 2013.
5. Eurostat Yearbook. Europe In Figures, 2009
6. Eurostat data base and publications. Population and social conditions database, 2006.
7. Leridon H. 30 years of contraception in France. *Contracept Fertil Sex.* 1998; 26:435–438.
8. Egbert R. te Velde and Peter L. Pearson. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002; 8(2):141-154.
9. Spira A. The decline of fecundity with age. *Maturitas* 1988; 10:15–22.
10. Abma J.C et al. Fertility, family planning, and women’s health: new data from the 1995 National Survey of Family Growth. *Vital Health Stat* 1997; 23:1–114.
11. Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod* 2004; 19:1548–1553
12. Broekmans F.J. et al. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocrine Reviews*, August 2009; 30(5):465–493
13. Navot D. et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet.* 1991; 337:1375–1377.

14. Block E. A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anat (Basel)* 1953; 17:201–206
15. Baker T. G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963; 158:417–433
16. Markstrom E. et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis—dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123:23–30
17. Richardson S.J. et al. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987; 65, 1231-1237
18. Faddy M.J. et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum. Reprod.* 1992; 7:1342-1346.
19. Hunt P.A. and Hassold T.J. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 2008; 24:86–93
20. Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:266–272
21. Templeton A. et al. Factors that affect outcome of IVF treatment. *Science* 1996; 348:1402–1406.
22. Scott R.T. and Hofmann G.E. Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil and Steril.* 1995; 63:1–11.
23. Frattarelli J.L. et al. Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil and Steril.* 2000; 74:512–517.
24. Ubaldi F. et al. Management of poor responders in IVF. *Reprod BioMed Online.* 2005; 10:235–246.
25. Hanoch J. et al. Young low responders protected from untoward effects of reduced ovarian response. *Fertil and Steril.* 1998; 69:1001–1004.
26. Fasouliotis S.J. et al. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet.* 2000; 17:357–373.
27. Scott Sills E. et al. Ovarian reserve screening in infertility: Practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio.* 2009; 146:30–36.

28. Hansen L.M. et al. Evaluating ovarian reserve: follicle stimulating hormone and oestradiol variability during cycle days 2-5. *Hum Reprod.* 1996; 11:486–489.
29. Scott R.T. et al. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population. *Obstet Gynecol.* 1993; 82(4, Part 1): 539–544.
30. Muasher S.J. et al. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 1988; 50:298–307.
31. Broekmans F.J. et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:685–718.
32. Bancsi L.F. et al. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2003; 79:1091–1100.
33. Roberts J.E. et al. Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005; 83:37–41.
34. Smotrich D.B. et al. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 1995; 64:1136–1140.
35. Licciardi F.L. et al. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1995; 64:991–994.
36. Cook C.L. et al. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril.* 2000; 73:859–861.
37. La Marca A. et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2007; 22:766–771.
38. Knauff E.A. et al. Anti-Müllerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:786–792
39. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996; 17:121–155
40. Chang M.Y. et al. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril.* 1998; 69:505–510.

41. Chang M.Y. et al. The antral follicle count predicts the outcome of pregnancy in a controlled ovarian hyperstimulation/intrauterine insemination program. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15:12–17.
42. Hendriks D.J. et al. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal folliclestimulating hormone level. *Fertil and Steril.* 2005; 83(2):291-301
43. La Marca A. et al. Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the individualization of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilisation cycles. *BJOG.* 2012; 119:1171–1179.
44. Yovich J. et al. Targeted gonadotrophin stimulation using the PIVET algorithm markedly reduces the risk of OHSS. *Reprod Biomed Online.* 2012; 24:281–292.
45. Zhang D. et al. Overweight and obesity negatively affect the outcomes of ovarian stimulation and in vitro fertilisation: a cohort study of 2628 Chinese women. *Gynecol Endocrinol.* 2010; 26: 325–332.
46. Maheshwari A. et al.. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 433–444.
47. Sneed M.L. et al. Body mass index: impact on IVF success appears age-related. *Hum Reprod.* 2008; 23:1835–1839.
48. Kumbak B. Young patients with diminished ovarian reserve undergoing assisted reproductive treatments: a preliminary report. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11:294-299.
49. John L. et al. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.* 2000; 74(3):518-524.

