

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
(UNAM)
POSTGRADO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
SEDE INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA
HOSPITAL PUERTA DE HIERRO DE GUADALAJARA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**HORMONA ANTIMÜLLERIANA BASAL (AMH)
COMO PREDICTOR DE RESPUESTA OVÁRICA**

Autora:

DRA GRACIELA CRISTINA KOHLS

Asesor clínico:

DR ANTONIO MARTÍN GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ

Asesor metodológico:

DR LUIS GUILLERMO VAZQUEZ DE LARA CISNEROS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis amigos,

A Justyna...

AGRADECIMIENTO

Muy especialmente a todos los profesores del Instituto de Ciencias en Reproducción Humana VIDA, por el interés en la enseñanza desinteresada que me brindaron y por el apoyo recibido en el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros, por su estrecha colaboración y consejo en los análisis estadísticos.

A Patty y Ana por compartir sus conocimientos del laboratorio de in vitro.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la elaboración del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	6
RESUMEN.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
ANTECEDENTES	
Capítulo 1: ESTUDIOS DE RESERVA OVÁRICA ESTÁTICOS	
• Edad.....	10
• FSH basal.....	10
• Estradiol sérico basal.....	12
• Inhibina B Basal.....	12
• Relación FSH/LH.....	13
• Evaluación ecográfica del volumen ovárico.....	14
• Número de AFC en ultrasonido basal.....	14
• Flujo sanguíneo ovárico basal.....	15
• Biopsia de tejido ovárico	16
Capítulo 2: ESTUDIOS DE RESERVA OVÁRICA DINÁMICOS	
• Test de citrato de clomifeno.....	17
• Test de agonista de GnRH (GAST).....	18
• Test de estimulación con FSH (EFORT).....	19
Capítulo 3: HORMONA ANTIMÜLLERIANA	
• Características y origen de la AMH.....	20
• Función de la AMH en la mujer adulta.....	21
• AMH y reserva ovárica	21
• AMH y ciclo menstrual	23

Capítulo 4: AMH Y DISTINTAS ENTIDADES CLÍNICAS

• Peso, BMI Y AMH.....	25
• Embarazo y AMH.....	25
• Síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS) y AMH.....	26
• Síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) y AMH.....	27
• Endometriosis y AMH.....	27
• Cáncer y AMH.....	27
OBJETIVOS.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	30
MATERIALES Y METODOS:	
• Población.....	31
• Determinaciones hormonales.....	31
• Estimulación ovárica.....	32
• Fertilización en el laboratorio.....	32
• Transferencia embrionaria.....	37
• Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	46
ANEXOS (Tablas y gráficos).....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

INTRODUCCIÓN

El término reserva ovárica es usado para describir el potencial funcional del ovario y refleja el número y calidad de los ovocitos. Toda la literatura sobre reserva ovárica se focaliza en la habilidad del ovario de responder a la estimulación con gonadotropinas en el contexto de fertilización in vitro (FIV) (Maheshwari et al., 2006).

Aunque no hay consenso, muchos autores definen a la baja respondedora como aquella paciente con ciclos ovulatorios espontáneos, que responde en un ciclo de hiperestimulación ovárica de FIV con cuatro folículos o menos, o bien, con niveles de estradiol menores a 500 pg/ml el día de la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG). Algunos además agregan como requisito que este tipo de respuesta se presente al menos en dos ocasiones (Karande and Gleicher, 1999).

Un buen test de reserva ovárica debería ser predictivo de concepción, con o sin tratamiento, y debería indicar por cuanto tiempo los niveles presentes de actividad ovárica pueden ser mantenidos antes de que disminuya la fertilidad por envejecimiento ovárico (Maheshwari et al., 2006).

En una población subfétil que se encuentra en tratamientos de fertilidad, un test de reserva ovárica debería ayudarnos a:

- (i) predecir las posibilidades de embarazo y nacimientos con o sin tratamiento, y
- (ii) elegir una dosis óptima de estimulación ovárica en aquellas pacientes que necesiten ser hiperestimuladas.

Por lo tanto, un test de reserva ovárica efectivo debería tener un rol primordial en guiar el manejo de la pareja infértil y facilitar la individualización de los tratamientos. En los últimos años, varios marcadores de reserva ovárica han sido descritos en la literatura (Maheshwari et al., 2006):

- Estudios estáticos: edad, hormona foliculoestimulante o FSH basal, estradiol sérico basal, relación LH (hormona luteinizante)/FSH basales, inhibina B basal,

hormona anti-Mülleriana (AMH) basal, volumen ovárico basal, cuenta de folículos antrales basales (AFC), flujo sanguíneo ovárico basal, biopsia de tejido ovárico.

- Estudios dinámicos: test de citrato de clomifeno, test de estimulación con agonistas de la GnRH (GAST) y test de reserva ovárica administrando FSH exógena (EFORT).

La edad, la FSH en el día 3, la inhibina B, la AFC, el volumen ovárico y muchos test dinámicos han demostrado correlacionarse con la respuesta en reproducción asistida. De todas maneras, el valor predictivo de cada uno permanece controversial. (Navot et al., 1987a; Muasher et al., 1988; Fanchin et al., 1994; Faddy and Gosden, 1996; Lass et al., 1997a; Tomas et al., 1997; Hall et al., 1999; Ravhon et al., 2000; Bancsi et al., 2002).

En los últimos años, la AMH ha sido presentada como un marcador sensible de:

- envejecimiento ovárico (van Rooij et al., 2002; Fanchin et al., 2003a; van Rooij et al., 2005),
- de respuesta a las gonadotropinas en mujeres en tratamientos de fertilización in vitro (Seifer et al., 2002; Fanchin et al., 2003; Hazout et al., 2004) y,
- del número de folículos antrales en pacientes normales y con síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS) (Cook et al., 2002; Laven et al., 2004; van Rooij et al., 2005).

Por toda la evidencia presente actualmente sobre AMH, nos resulta atractiva la posibilidad de mejorar el diagnóstico de reserva ovárica ya que el grupo de pacientes con baja reserva va en constante crecimiento en las clínicas de reproducción asistida.

La factibilidad de medición en cualquier momento del ciclo menstrual y en pacientes bajo tratamiento con anticonceptivos hormonales (La Marca et al., 2005b; La Marca et al., 2006b; Hehenkamp et al., 2006), nos brindaría la posibilidad de tener al alcance una herramienta diagnóstica rápida que beneficiaría a todas las pacientes, en especial a un gran porcentaje de nuestra población que tiene barreras geográficas de acceso a la atención especializada en reproducción. Por todo lo anterior nos resulta atractivo incorporar este marcador a nuestra práctica diaria, por lo que iniciamos el siguiente trabajo.

RESUMEN

Objetivos: Conocer el valor predictivo de la AMH como marcador de reserva ovárica y comparar diferentes marcadores de reserva ovárica en las pacientes en tratamientos de fertilidad.

Tipo de estudio: prospectivo.

Lugar: Instituto de Ciencias en Reproducción Humana, VIDA, del Hospital Puerta de Hierro, Guadalajara, México.

Materiales y métodos: se incluyeron 54 pacientes (19-45 años de edad) bajo tratamientos de alta complejidad desde marzo a julio de 2007. Se les midió FSH, LH, estradiol y AMH en el día 2 o 3 de su ciclo menstrual previo a iniciar el tratamiento de fertilidad. Todas las pacientes requerían captura folicular como parte de su tratamiento.

Resultados: 41 pacientes tuvieron respuesta ovárica normal y 13 baja reserva ovárica (obtención de 4 ovocitos o menos en la captura folicular, o bien, cancelación del ciclo por lograr 2 o menos folículos en desarrollo después de un protocolo de hiperestimulación).

Según el análisis de regresión logística simple y el área bajo la curva ROC la AMH es un buen predictor de reserva ovárica.

Se calcularon curvas ROC para AMH, FSH, edad, y los modelos construidos (edad por AMH) y, de acuerdo a los valores del área bajo la curva, observamos que el predictor menos eficiente es la FSH, mientras que el más eficiente es el modelo con interacción (AMH por edad).

Conclusiones: Podemos concluir que la AMH es una hormona útil en la evaluación de la reserva ovárica. La edad aumenta su valor predictivo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es el valor predictivo de la AMH como marcador de reserva ovárica y cuál es su valor frente a otros marcadores de reserva ovárica en las pacientes bajo tratamientos de fertilidad?

ANTECEDENTES

Capítulo 1: ESTUDIOS ESTÁTICOS DE RESERVA OVÁRICA

EDAD

En la perimenopausia, los órganos del sistema neuroendocrino y las gónadas disminuyen su función con el paso del tiempo. Esto resulta muy evidente con los ovarios, que en la etapa intrauterina, alrededor del quinto mes de gestación, disponen de alrededor de 5 a 7 millones de folículos primordiales, para el nacimiento esta cantidad disminuye a 1 o 2 millones y en la pubertad sólo se encuentran 400,000 a 500,000, de los cuales en la etapa reproductiva sólo alrededor de 400 llegarán a la ovulación. Visto de otra manera, el envejecimiento en los ovarios se inicia desde antes de nacer y se acelera la tasa de atresia folicular varios años antes de la menopausia (Efraín Pérez Peña, 2007).

A pesar de que la reserva ovárica declina con la edad, esto es una actividad biológica y no sólo una función cronológica. En efecto, el aspecto más importante de la disminución de la reserva ovárica es su altamente variable edad de aparición (Scott and Hofmann, 1995b).

FSH BASAL

La concentración sérica de FSH en el día tercero del ciclo es una estimación indirecta de la reserva ovárica, ya que refleja la cantidad de estradiol e inhibina B que una cohorte folicular dada está produciendo y su efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis (Winslow, et al. 1991).

El valor de FSH brinda mayor información si se lo correlaciona con el nivel basal de estradiol. Pacientes con niveles elevados de FSH (> 10 UI/L) tienen 4.1 veces más riesgo de tener una baja respuesta en su primer ciclo de tratamiento que las pacientes con niveles de FSH normal y si la FSH es normal pero el nivel de estradiol está elevado

(> 60 pg/ml), el riesgo de pobre respuesta aumenta a 4.3 veces con respecto a las pacientes que tienen estradiol y FSH normal (Evers et al., 1998).

Shermann y Korenman, en 1976, publicaron los cambios endocrinológicos normales que preceden al climaterio, describiendo que la alteración más temprana es una elevación de la FSH en fase folicular precoz. A pesar de que estos estudios no se referían al potencial reproductivo, se documentó que el aumento de FSH coincidía con el momento en que la reserva ovárica disminuía.

Posteriormente, Scott en un estudio retrospectivo de una gran casuística, de 758 ciclos de FIV publicado en 1989, encontró que la tasa de embarazo disminuye marcadamente conforme el nivel de FSH se incrementa, siendo la tasa de embarazo en curso menor de un 5% cuando el valor de FSH es mayor a 25 UI/l. La edad tuvo un menor valor predictivo que el valor de FSH basal en este grupo de pacientes.

Desde entonces, se han publicado muchos estudios de pacientes de programas de reproducción asistida que evalúan la concentración de FSH en día 3, tomando distintos parámetros como resultado, como son la respuesta ovárica, el crecimiento folicular, el número de ovocitos maduros obtenidos, o las tasas de embarazo o de cancelación. También varía el valor de corte de FSH considerado para definir una reserva ovárica normal, lo que hace difícil comparar estos trabajos.

Si se utiliza un valor de corte de 10 UI de FSH sérica en un día 2 a 4 del ciclo, las tasas de embarazo con técnicas de reproducción asistida son inferiores en el grupo con un valor mayor a 10, sin embargo, el estudio estadístico con curva ROC demuestra una baja sensibilidad y especificidad para este valor de corte. Si se eleva este valor de corte, la especificidad aumenta, pero la sensibilidad disminuye notablemente para predecir mala respuesta ovárica a la estimulación (Mondión et al., 2001).

Un nivel sérico de FSH basal igual o mayor a 20 UI/l, en una mujer menor de 35 años, en presencia de ciclos menstruales normales, indica falla ovárica prematura (Muasher et al., 1988).

Un punto importante a considerar, al usar el nivel de FSH en día tercero como predictor de reserva ovárica, es la variabilidad interciclo de sus niveles, que en promedio fue de 4.2 ± 0.4 UI/l con un rango entre 1 a 42 UI/l en 81 mujeres estudiadas por Scott en 1990. Las pacientes con una gran variabilidad interciclo y en que uno de los valores es alto, fueron malas respondedoras a la estimulación con gonadotrofinas, independientemente del valor basal del ciclo de tratamiento.

También hay que tener en cuenta las posibles diferencias según el ensayo ocupado para medir el valor de FSH y las diferencias entre laboratorios.

Al parecer, en mujeres sanas con ciclos regulares, el valor de FSH es similar entre los días 2 y 5 del ciclo, lo que flexibilizaría levemente el día de la toma de muestra (Hansen et al., 1996).

Algunos autores proponen el análisis multivariado como método de análisis en cada clínica, y la utilidad de acompañar la medición basal de FSH con otros índices de reserva ovárica para maximizar su utilidad (Broekmans et al., 2000).

ESTRADIOL SÉRICO BASAL

Existe una relación directa entre la edad avanzada de una mujer y unos niveles elevados de estradiol, lo que indica que la reserva funcional ovárica se encuentra comprometida.

Unos valores basales de estradiol superiores a 80 pg/ml, frecuentes al final de la treintena, se asocian con una peor respuesta ovulatoria (Evers et al., 1998).

Un reclutamiento y dominancia folicular avanzada en el día tercero podría ser el responsable de la fase folicular más corta en las mujeres de mayor edad, lo que se expresaría en concentraciones séricas de estradiol mayores que lo esperable para ese día del ciclo.

En un estudio publicado por Bancsi et al. (2003), al hacer un análisis univariado de los valores de área bajo la curva ROC para distintos predictores de reserva ovárica, se encontró que el valor de estradiol en día tercero del ciclo era el peor de todos los parámetros estudiados.

INHIBINA B BASAL

La inhibina es un péptido dimérico compuesto por una subunidad- α y una subunidad- β 1 (inhibina A) o por una subunidad- α y una subunidad- β 2 (inhibina B). Ambas son producidas por las células de la granulosa.

La inhibina A parece ser producida por el folículo dominante, ya que aumenta justo después del incremento de estradiol en la fase folicular tardía.

En cambio, la inhibina B posiblemente es secretada por la cohorte de folículos en desarrollo de un ciclo determinado, porque su concentración aumenta en la transición lúteo-folicular y se hace máxima en la fase medio folicular, por lo que reflejaría la cantidad o calidad de folículos en desarrollo (Hall et al. 1999, Santero et al., 1999).

Seifer en 1997, usando un valor de corte de 45 pg/ml, demostró que en el grupo de menor valor de inhibina B se rescataron menos ovocitos en la aspiración y la tasa de cancelación fue 3 veces mayor.

Posteriormente, el mismo autor en un trabajo de casos y controles con 109 pacientes, encontró que la medición de inhibina B era un marcador más precoz de disminución de reserva ovárica que la medición de FSH en día 3, definiendo como pacientes con reserva ovárica disminuida a aquellas con pobre respuesta a los protocolos de estimulación y con bajas tasas de embarazos (Seifer et al., 1999).

Corson en 1999, en un estudio de 106 pacientes, encontró una tasa de embarazo sin diferencias estadísticamente significativas para pacientes con inhibina B mayor o menor a 45 pg/ml (31.8 y 34.5% respectivamente), y al comparar los resultados de la medición de inhibina B con los resultados del test de clomifeno, éste último sí mostró diferencias significativas entre un test normal o alterado para tasas de embarazo.

RELACIÓN FSH/LH

Lenton, en 1988, observó que a lo largo del período reproductivo de la mujer, la alteración más precoz que ocurre conforme va avanzando en edad es el aumento de los niveles de FSH, y años después, se produce el aumento de LH. Es por esto que consideró que lo más precoz para evaluar la pérdida de la capacidad reproductiva era un aumento de la relación FSH/LH.

De esta forma, Mukherjee en 1996 evaluó este examen en 74 ciclos de FIV de mujeres con FSH normal en el día tercero. Una relación FSH/LH ≥ 3.6 tuvo una sensibilidad de un 85.7% y una especificidad de un 95% para pobre respuesta a la estimulación, y las pacientes pertenecientes a este grupo presentaron niveles séricos de estradiol y un número de ovocitos aspirados significativamente menores que el grupo con relación FSH/LH menor a 3.6.

En otro trabajo publicado el año 2001 se validaron estos resultados, al encontrar que una tasa mayor a 3 se correlacionaba con un menor número de ovocitos aspirados, y menor tasa de implantación y embarazo (Barroso et al., 2001).

EVALUACIÓN ECOGRÁFICA DEL VOLUMEN OVÁRICO

Basado en el hecho de que el tamaño ovárico disminuye con la edad, se han publicado varios trabajos sobre el rol de la medición del volumen ovárico en la evaluación de la reserva ovárica.

Lass en 1997 comparó el volumen ovárico en 2 grupos de mujeres con infertilidad, programadas para un procedimiento de FIV. Definiendo un volumen ovárico mayor de 3 cm³ como normal, encontró que las mujeres con un volumen menor tenían una mayor tasa de cancelación y un mayor requerimiento de gonadotrofinas, con igual tasa de embarazo en ambos grupos (Lass et al., 1997a).

Posteriormente, en 1999 Syrop reportó que el volumen ovárico era un buen predictor de respuesta ovárica en protocolos de estimulación, siendo incluso mejor que la medición de FSH en día 3 pero con un bajo coeficiente de probabilidad para embarazo.

En el trabajo de Bancsi publicado en el 2003, en una comparación sobre distintos test de reserva ovárica se concluye que el volumen ovárico tiene un valor limitado.

NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES EN ULTRASONIDO BASAL (AFC)

También se ha visto que el número de folículos antrales disminuye con la edad. Al evaluar el número de éstos por una ecografía ginecológica en la fase folicular precoz, se ha reportado que un número bajo de folículos se relaciona con una mayor tasa de cancelación (Chang et al., 1998) y con una menor respuesta a la estimulación ovárica (Pellicer et al., 1998).

Finalmente, en el estudio prospectivo publicado por Bancsi, en febrero de 2003, se realizó un análisis univariado del valor de las áreas bajo las curvas ROC de distintos marcadores de reserva ovárica entre ellos, edad, valor basal de estradiol, valor de FSH, inhibina B, y la medición ecográfica en fase folicular precoz del volumen ovárico y del número de folículos antrales, como predictores de mala respuesta ovárica a la

estimulación (desarrollo de menos de 3 folículos o recuperación de menos de 4 ovocitos en la aspiración). Se encontró que el mejor marcador era el número de folículos antrales, seguido por el nivel de FSH basal.

A pesar de que la AFC es uno de los mejores predictores de respuesta ovárica a la hiperestimulación (Dumesic *et al.*, 2001; Bancsi *et al.*, 2003; Popovic-Todorovic *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2003), aun no hay una definición precisa de la medida de los folículos antrales. En la literatura se citan diámetros que varían de 2 a 10 mm y 2 a 5 mm (Frattarelli *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2003; Bancsi *et al.*, 2004b; Durmusoglu *et al.*, 2004).

La capacidad de la AFC para predecir embarazo es limitada (Bancsi *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2003; Hendriks *et al.* 2005). Esto se debe probablemente a que la AFC se relaciona con el número de ovocitos obtenidos en un ciclo y es bien sabido que, para lograr un embarazo en reproducción asistida, además de la cantidad importa también la calidad de los ovocitos que se obtienen.

Para predecir respuesta ovárica y resultados en reproducción asistida, la cuenta de AFC medida con ultrasonido de tercera dimensión (3D) no ofrece ventajas estadísticamente significativas sobre la medición con un ultrasonido de dos dimensiones convencional (2D) (Jayaprakasan *et al.*, 2007).

FLUJO SANGUÍNEO OVÁRICO BASAL

Ng en el 2004 estudió mujeres con fertilidad comprobada y observó por ultrasonido 3D y flujometría Doppler que el flujo sanguíneo del estroma ovárico disminuye significativamente pero sólo en las mujeres de 41 años o más. Por lo tanto, no es un marcador precoz de disminución de la reserva ovárica. El mismo autor, en el 2005 concluyó que la medida de los índices de flujo ovárico Doppler no tuvo valor predictivo para respuesta ovárica.

En un estudio publicado recientemente se concluyó que un flujo ovárico no detectable en el ultrasonido basal en por lo menos un ovario está vinculado a una baja reserva en mujeres infértiles (Younis., *et al.* 2007).

BIOPSIA DE TEJIDO OVÁRICO

La ausencia de una prueba diagnóstica fiable ha llevado a pensar que el mejor método sería la evaluación de la reserva ovárica directamente en el ovario. El número de folículos por unidad de volumen del tejido cortical del ovario puede calcularse matemáticamente y definirse como densidad folicular.

Lass realizó biopsias ováricas en mujeres infértiles. Este autor observó que la densidad folicular disminuye con la edad, de manera que las mujeres mayores de 35 años tienen tan sólo un tercio de los folículos de las mujeres más jóvenes y las mujeres con infertilidad de origen desconocido tienen menor número de folículos que las mujeres con infertilidad de origen tubario (Lass et al., 1997b).

A pesar de lo prometedora que puede resultar esta prueba, existe una serie de factores que limitan su uso:

- 1) la densidad de una porción del ovario no es representativa de todo el parénquima ovárico (Lambalk et al., 2004).
- 2) es una técnica cruenta y no exenta de riesgos, que aun puede alterar el pronóstico reproductivo.

Capítulo 2: ESTUDIOS DINÁMICOS DE RESERVA OVÁRICA

TEST DE CITRATO DE CLOMIFENO

Este examen sirve para identificar a las pacientes que tienen un mal pronóstico reproductivo por ser pobres respondedoras, ya que refleja la incapacidad de desarrollar una cohorte normal de folículos, con una baja producción de estrógenos incapaz de suprimir los valores de FSH.

Este test fue descrito inicialmente por Navot como una herramienta para evaluar la reserva ovárica en mujeres mayores de 35 años (Navot et al., 1987b).

Es un examen sencillo de realizar que consiste en la medición de los niveles de FSH en el día 3 (basal) y en el día 10 del ciclo post estimulación con citrato de clomifeno (CC). Se administran 100 mg/día por vía oral desde el día 5° al 9°, definiéndose el examen como normal cuando el valor de FSH post estimulación no se eleva respecto a la basal (Navot et al., 1987).

Otros autores, como Loumaye en 1990, evaluaron esta prueba definiendo como anormal la suma de ambos valores de FSH mayor a 26 UI/L, teniendo un valor predictivo positivo cercano al 100% para ausencia de embarazo.

Scott en 1993 realizó un seguimiento por 1 año a 236 pacientes infértiles con test de clomifeno. La incidencia global de test anormal fue del 10%. La incidencia de exámenes anormales varió con la edad, correspondiendo al 3% cuando eran menores de 30 años, 7% entre 30 y 34 años, 10% entre 35 y 39 años y 26% en mayores de 40 años. El resultado anormal se correlacionó con una tasa de embarazo marcadamente baja (9%), comparado con una tasa de embarazo de un 43% en las pacientes con reserva ovárica normal. Sólo 7 de las 23 pacientes con una prueba alterada tenían FSH elevada en día tercero, lo que revela que este examen puede ser más sensible que la medición aislada de FSH basal.

Estudios posteriores de este mismo autor han revelado que el mal resultado expresado en tasas de embarazo o en tasas de cancelación de ciclos de inducción de ovulación es independiente de la edad cuando el test de clomifeno se encuentra alterado (Scott et al., 1995a).

De todas formas, el valor predictivo para tasas de embarazo disminuye con la edad, haciéndose muy pobre cuando la paciente tiene más de 40 años.

Los resultados de los distintos estudios indican que el test de clomifeno debería ser capaz de diferenciar entre mujeres con reserva ovárica normal y mujeres con reserva ovárica disminuida.

TEST DE AGONISTA DE GnRH (GAST)

En un trabajo publicado por Padilla en 1990 se propuso un test adicional para diagnóstico de reserva ovárica, que consiste en evaluar los cambios precoces en los niveles de estradiol después de la administración de un análogo de GnRH, secundarios al incremento temporal en la secreción hipofisaria de LH y FSH.

Se administra 1 mg de acetato de leuprolida en el día 2 del ciclo, y se evalúa el nivel de estradiol en el día 2, 3, 4 y 5 del ciclo. Como se nota en la FIGURA 1, el incremento de estradiol al doble de lo basal ocurre en el día 3, con caída al día 4 en una respuesta tipo A. En la tipo B la elevación ocurre en el día 4 o 5, con caída al día siguiente. En la respuesta tipo C hay elevación en el día 3 que continúa sin caer el 4 y el 5. En la D el estradiol no se eleva en ninguno de los días. Esta prueba correlaciona con los resultados en reproducción asistida de alta complejidad, con buenos resultados para las curvas A y B, malos para la C y pésimos para la D (Padilla et al., 1990).

Simplificando, una elevación del estradiol dos veces o más del valor basal en respuesta al agonista de GnRH es predictor de buenos resultados en FIV. Cuanto más precoz es la elevación del nivel sérico de estrógenos, mejor era la tasa de embarazo obtenida en ese ciclo. (Padilla et al., 1990; Winslow et al., 1991; Ranieri et al., 1998).

Winslow et al., (1991), evaluaron la correlación entre el resultado del examen y algunos de los parámetros de éxito en ciclos de FIV como el número de ovocitos maduros obtenidos y la tasa de embarazo.

En un estudio donde se calculó el coeficiente de probabilidad de embarazo se demostró que la eficiencia de este examen para diferenciar entre un examen normal y uno alterado parece limitada (Bukman et al., 2001). Además, no se ha definido la variabilidad interciclo de esta prueba y es de muy alto costo como para ser utilizado en la población general infértil.

TEST DE ESTIMULACIÓN CON FSH (EFORT)

Esta prueba, inicialmente diseñada por Fanchin en 1994, consiste en medir FSH y estradiol sérico en el día tercero del ciclo, luego se inyecta por vía intramuscular 300 UI de FSH, y 24 horas post inyección se mide nuevamente el valor de FSH y estradiol. Según los resultados reportados por este autor, en 52 ciclos realizados se obtuvo diferencias significativas al comparar la variación de estradiol con el nivel de FSH en día 3, considerando como anormal una FSH mayor a 11 UI/l y una diferencia de estradiol menor a 30 pg/ml. Este examen no ha sido evaluado por otros y a pesar de que es más simple de realizar que el test de clomifeno, tiene un costo económico importante por las 300 unidades de FSH requeridas.

Capítulo 3: HORMONA ANTIMÜLLERIANA

CARACTERISTICAS Y ORIGEN DE LA AMH

La hormona Anti-Mülleriana (AMH), también llamada sustancia inhibidora Mülleriana o factor inhibidor Mülleriano, es una glicoproteína dimérica con un peso molecular de 140 kDa.

Esta hormona pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y está esencialmente involucrada en la regresión de los conductos Müllerianos en el feto masculino, el paso inicial en la organogénesis del tracto genital masculino (Di Clemente et al., 2003).

En contraste con otros miembros de la familia, los cuales se expresan en varios órganos y tienen variadas actividades biológicas dependiendo del contexto celular, la AMH sólo se expresa en las gónadas y ejerce efectos inhibitorios en el desarrollo y función de los órganos reproductores. El efecto más claro de la AMH es su capacidad de inducir regresión del conducto Mülleriano, el precursor de los órganos genitales internos femeninos. En ausencia de AMH, el conducto Mülleriano de ambos sexos se desarrolla a útero, trompas de Falopio y parte superior de la vagina (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991).

Los niveles séricos de AMH a lo largo de la vida son más bajos en mujeres que en hombres.

En las mujeres, los niveles séricos son casi indetectables al nacimiento (Rajpert-De Meyts et al., 1999) se incrementa sutilmente en los primeros 2 a 4 años de vida; hace un pico máximo en la pubertad, se mantiene estable durante la adultez y disminuye posteriormente como signo de disminución de la reserva ovárica (Lee et al., 1996; La Marca et al., 2005a).

En mujeres, la AMH se expresa en células de la granulosa de folículos pre-antrales y antrales pequeños (Durlinger et al., 2002a) y se continua expresando en los folículos en crecimiento hasta que ellos han alcanzado la medida y el grado de diferenciación en el cual son seleccionados para la dominancia. En el humano, esto ocurre en el estadio en que el folículo antral mide de 4 a 6 mm (Rajpert-De Meyts et al., 1999; Weenen et al., 2004).

FUNCIÓN DE LA AMH EN LA MUJER ADULTA

El rol exacto de la AMH en el ovario no está enteramente claro, pero las funciones propuestas incluyen inhibición del reclutamiento folicular, inhibición de la aromatasas y disminución de la sensibilidad de los folículos a la FSH (Josso, et al., 2001, Durlinger et al., 2001).

La AMH parece regular el desarrollo folicular temprano (Durlinger et al., 2002a), específicamente la transición de folículos primordiales a folículos en crecimiento (Durlinger et al., 1999).

Las ratas femeninas homocigotas AMH-knockout tienen más folículos pre-antrales y antrales en crecimiento que los tipos salvajes (Durlinger et al., 2002a) y se ha demostrado que su reserva folicular disminuye antes.

La AMH es capaz de inhibir el inicio del crecimiento de folículos primordiales en cultivos de ovarios de ratas recién nacidas (Durlinger et al., 2002a). También la AMH ha demostrado inhibir el crecimiento folicular FSH inducido en ratas femeninas (Durlinger et al., 2001). Datos recientes indican que la expresión de la AMH en el ovario humano es similar a lo ya observado en ratones y ratas (Weenen et al., 2004), sugiriendo un rol importante en la regulación del crecimiento temprano de los folículos. Estudios realizados en animales han sugerido que la AMH, probablemente vía su receptor específico tipo II expresado en las células de la granulosa y teca, puede reducir la actividad de la aromatasas y la cantidad de receptores de LH en células de la granulosa estimuladas por FSH (di Clemente et al., 1992) e inhibir la producción de testosterona en las células de la teca (Teixeira et al., 2001).

En un estudio en humanos, se ha demostrado que variantes genéticas en la AMH y en el receptor II de AMH están asociadas con los niveles de la fase folicular de E2, sugiriendo la participación de la AMH en la regulación de la sensibilidad de la FSH en el ovario (Kevenaar et al., 2007).

AMH Y RESERVA OVÁRICA

La hormona anti-Mülleriana (AMH), un nuevo marcador endocrino, ha sido evaluada recientemente por varios grupos como un marcador de respuesta ovárica (Seifer et al.,

2002; Van Rooij et al., 2002; Fanchin et al., 2003a; Hazout et al., 2004; Muttukrishna et al., 2004; Eldar-Geva et al., 2005; Peñarrubia et al., 2005; Tremellen et al., 2005; Ficicioglu et al., 2006).

La AMH disminuye con el aumento de la edad en mujeres normoovulatorias (de Vet et al., 2002) y se correlaciona fuertemente con el número de folículos antrales. De ahí que la AMH puede ser usada como un marcador de envejecimiento ovárico (de Vet et al., 2002; van Rooij et al., 2002; Fanchin et al., 2003a).

Se ha demostrado que las pobres respondedoras durante la estimulación ovárica de FIV han tenido reducidos valores de AMH en la fase folicular precoz (van Rooij et al., 2002; Seifer et al., 2002; Fanchin et al., 2003b).

En un estudio reciente se encontró que la AMH es un buen predictor de baja respuesta y cancelación de ciclos con una muy pequeña variación interciclo (McIlveen et al., 2007). Se ha propuesto a la AMH como un prometedor marcador de reserva ovárica (De Vet et al., 2002; Seifer et al., 2002; Van Rooij et al., 2002), cuya confiabilidad supera a la de la inhibina B, estradiol y FSH en el día 3 del ciclo (Fanchin et al., 2003a). La AMH tiene por lo menos tres características biológicas que no tienen los predictores hormonales convencionales de reserva ovárica:

Primero, se expresa en las células de la granulosa de varios folículos en crecimiento, desde primarios hasta antrales tempranos (Baarends et al., 1995; Durlinger et al., 2002a; Weenen et al., 2004).

Segundo, los folículos que crecen más allá de antrales tempranos pierden progresivamente su capacidad de expresar AMH (Baarends et al., 1995; Fanchin et al., 2003b).

Tercero, a pesar de que los mecanismos involucrados en la producción e inhibición de la producción de AMH permanecen desconocidos, todo indica que sería FSH independiente (Durlinger et al., 2002b).

Por lo anterior, estas características fisiológicas de la AMH suponen la hipótesis que la medición periférica de AMH podría proveer información sobre la actividad de un gran número de folículos con y sin influencia hormonal.

AMH Y CICLO MENSTRUAL

Los niveles séricos de AMH han sido recientemente medidos en diferentes momentos del ciclo menstrual y los resultados sugieren una completa ausencia de fluctuación (La Marca et al., 2006b; Hehenkamp et al., 2006). Esto puede ser consistente con el continuo crecimiento no cíclico de pequeños folículos a través del ciclo menstrual (La Marca et al., 2006b).

La ausencia de fluctuación de la AMH a través del ciclo menstrual (La Marca et al., 2006b; Hehenkamp et al., 2006) hace suponer que puede ser usada como un marcador de respuesta ovárica independientemente del día del ciclo en el cual se tome la muestra de sangre.

La ausencia de modificaciones en el suero de los niveles de AMH a través del ciclo menstrual es una clara demostración de que la expresión de esta hormona no está regulada por las gonadotropinas. Acorde con esto, se ha observado situaciones asociadas con un muy bajo nivel de FSH, como el hipogonadismo hipogonadotrópico y el embarazo, sin modificaciones en los niveles séricos de AMH (La Marca et al., 2006b; La Marca et al., 2005b).

El crecimiento folicular temprano en humanos parece ser independiente de la estimulación por gonadotropinas. Los folículos parecen ser dependientes de FSH sólo en el estadio final de desarrollo. En humanos, el desarrollo hasta el estadio antral continua a través de toda la vida hasta la depleción de los folículos cerca de la menopausia, esto se produce aun en condiciones bajo las cuales las gonadotropinas endógenas están sustancialmente disminuidas (Richardson and Nelson, 1990). Tales condiciones incluyen la etapa prepuberal, embarazo y uso de anticonceptivos.

La reproductividad interciclo de la AMH en tres ciclos menstruales consecutivos se encontró que fue superior que la de FSH, inhibina B y que la de la cuenta de folículos antrales en el ultrasonido basal (AFC) (Fanchin et al., 2005).

En estudios previos, la capacidad de la AMH en identificar pobres respondedoras fue muy similar a la cuenta de folículos antrales (Van Rooij et al., 2002; Eldar-Geva et al., 2005; Ficicioglu et al., 2006).

Los niveles plasmáticos de AMH no cambian durante la fase folicular del ciclo menstrual y la administración de FSH exógena es seguida por una significativa reducción en los niveles de AMH, lo cual es probablemente secundario al efecto de las gonadotropinas sobre el desarrollo folicular (La Marca, et al., 2004).

En contraste con los ciclos menstruales normales en los cuales los niveles de AMH permanecen constantes entre los días 2 y 6 (La Marca et al., 2004), los ciclos estimulados se caracterizan por un progresivo declinar de esta hormona hasta llegar a la fase folicular tardía (Fanchin et al., 2003b).

Esta reducción de los niveles de AMH durante la hiperestimulación ovárica controlada puede fácilmente ser explicada por el aumento del crecimiento de los pequeños folículos causando diferenciación de las células de la granulosa, alterando así la habilidad de producir AMH (Baarends et al., 1995). La atresia folicular, los estrógenos y los andrógenos pueden adicionalmente contribuir a la disminución de AMH (Baarends et al., 1995; Teixeira et al., 2001).

En otro estudio se demuestra que a medida que disminuyen progresivamente los pequeños folículos antrales y se incrementan los grandes, ocurre una reducción de los niveles periféricos de AMH. Consistentemente, la AMH en un ciclo de hiperestimulación ovárica se correlaciona con el número de folículos menores de 12 mm pero no con los mayores de 12 mm (Fanchin et al., 2003b).

Estos datos sugieren que la AMH es secretada preferentemente y en forma continua por pequeños folículos antrales durante la hiperestimulación, y que la diferenciación de las células de la granulosa modifica la capacidad de expresión de AMH (Baarends et al., 1995).

La AMH se relaciona estrechamente con la cuenta de folículos antrales tempranos AFC (de Vet et al., 2002, Fanchin et al., 2003a), esta relación fue mucho menor con los niveles de inhibina B, E2, FSH y LH.

Capítulo 4: AMH Y DISTINTAS ENTIDADES CLÍNICAS

PESO, INDICE DE MASA CORPORAL (BMI) Y AMH

El índice de masa corporal ($BMI = \text{peso}/\text{talla}^2$) y la causa de infertilidad pueden influenciar en la respuesta a las gonadotropinas (Crosignani et al., 1994; Roseboom et al., 1995; Tinkanen et al., 1999; Loh et al., 2002) y se ha reportado que la AMH tiende a ser más baja en mujeres obesas que en las no obesas (Pigny et al., 2003).

Esto se contradice con el hallazgo de otro estudio en que las mujeres con sobrepeso y obesas tuvieron un desarrollo folicular similar a las mujeres de peso normal. La captura de ovocitos y la AMH tampoco se modificaron por el BMI en el rango examinado. La reducida fertilidad descrita para mujeres con un BMI mayor a 27 kg/m^2 (Lintsen et al., 2005) no parece originarse en la dinámica folicular según este último autor.

EMBARAZO Y AMH

Los niveles de AMH circulante materna son similares a aquellos encontrados en la fase folicular de mujeres no embarazadas.

Los estudios indican que la placenta no produce ni puede secretar AMH a la circulación materna. En realidad, se ha demostrado que la AMH es expresada sólo en las gónadas (Teixeira et al., 2001).

Los resultados de un estudio sobre AMH y embarazo sugiere que el reclutamiento folicular inicial no es abolido durante el embarazo ya que la AMH no experimenta cambios.

También ha sido demostrado que los niveles séricos maternos de AMH no varían según el sexo fetal (La Marca et al, 2005b).

SINDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS (PCOS) Y AMH

Si la AMH constituye un importante regulador de la reserva ovárica (Durlinger et al., 1999), una producción aumentada intraovárica podría retrasar el proceso de disminución de folículos primordiales y de este modo, posponer la edad de la menopausia.

Se podría pensar que el envejecimiento ovárico está retrasado en pacientes con poliquistosis ovárica ya que la AMH, un importante inhibidor de la disminución folicular, está incrementada (Durlinger et al., 1999).

En realidad, estudios transversales han sugerido que las mujeres con poliquistosis ovárica alcanzan la menopausia a edades más tardías (Dahlgren et al., 1992).

Además, se ha reportado que las irregularidades menstruales mejoran con el incremento de la edad (Dahlgren et al., 1992; Elting et al., 2000; Bili et al., 2001), posiblemente asociado a una disminución en la cohorte de folículos (Elting et al., 2003).

La AMH está incrementada en mujeres infértiles anovuladoras normogonadotrópicas normoestrogénicas comparadas con controles normales con ciclos regulares (Fallat et al., 1997; Cook et al., 2002; Pigny et al., 2003; Laven et al., 2004).

Los niveles de AMH son 2 a 3 veces más altos en mujeres con PCOS comparados con mujeres sanas. De la misma manera, se ha comprobado que la AMH declina menos rápidamente en mujeres con anovulación tipo 2 de la OMS que en controles normoovuladoras. Esto puede indicar una vida reproductiva más prolongada en estas pacientes (Mulders et al., 2004).

La metformina tiene efecto positivo documentado sobre la regularidad menstrual, la función ovulatoria y el hiperandrogenismo en mujeres con PCOS (Velazquez et al., 1994; Nestler and Jakubowicz, 1997; Morin-Papunen et al., 1998; Elter et al., 2002).

En mujeres con PCOS, la AMH se encuentra 2 a 3 veces más alta durante la vida reproductiva pero disminuye durante el tratamiento con metformina, como también disminuye la cantidad de folículos y el volumen ovárico. Esto puede indicar que la metformina tiene efectos beneficiosos sobre el crecimiento folicular en mujeres con PCOS. La medida de la AMH podría ser una herramienta útil para estimar el número de folículos como también ayudar al diagnóstico de PCOS (Piltonen et al., 2005).

SINDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS) Y AMH

Recientemente se ha publicado un estudio en el cual se incluyeron 274 pacientes y se las dividió según el valor de AMH basal en 3 grupos. Se observó que las 21 pacientes que desarrollaron de OHSS se encontraban en el grupo de AMH más alta (> 2.5 ng/ml) (Lee et al., 2007).

ENDOMETRIOSIS Y AMH

En un estudio se comparó la reserva ovárica y la cohorte folicular en dos grupos: pacientes con endometriosis mínima-moderada y pacientes con factor tubario.

La FSH sérica fue similar en ambos grupos pero las pacientes con endometriosis tuvieron valores más bajos de AMH: 1.26 ± 0.7 ng/ml vs 2.02 ± 0.72 ng/ml. Las pacientes con endometriosis tuvieron similar número de folículos en el ultrasonido basal pero sus tamaños fueron más variados (Lemos et al., 2007).

Duru y col. evaluaron los niveles de AMH en día 3 en: pacientes controles normoovuladoras y en pacientes con endometriomas > 45 mm antes y después de la cirugía. Observaron que los valores de AMH en pacientes con endometriosis no mejoran luego de la cirugía (1.39 ± 1.16 vs 1.62 ± 1.09 , $p=0.86$).

Así mismo, observaron que niveles de AMH pre y postquirúrgica de las pacientes con endometriosis son más bajos que en las normoovuladoras (1.39 ± 1.16 y 1.62 ± 1.09 vs 3.98 ± 0.51 ng/ml) (Duru et al., 2007).

CANCER Y AMH

Casi todos los agentes quimioterápicos disminuyen la función ovárica. Raddatz (2007) analizó los efectos de la quimioterapia en pacientes con una edad promedio de 24 años. Concluyó que la AMH y la inhibina B son parámetros mucho más sensibles para analizar el daño ovárico que la FSH y la amenorrea secundaria. En el mismo trabajo se demuestra que el uso conjunto de agonista de la GnRH con los quimioterápicos no disminuye los efectos nocivos de los fármacos oncológicos.

Con anterioridad ya se ha evaluado y concluido que las pacientes con antecedentes de quimioterapia y ciclos menstruales normales tienen una menor reserva ovárica a pesar de contar con valores de FSH < 10 UI/l (Larsen., et al, 2003).

OBJETIVOS

Objetivos Principales

Conocer el valor predictivo de la AMH como marcador de reserva ovárica y comparar diferentes marcadores de reserva ovárica en las pacientes en tratamientos de fertilidad atendidas en el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana del Hospital Puerta de Hierro de la ciudad de Guadalajara (Jalisco) México; durante el período de marzo a julio de 2007.

Objetivos Secundarios

1. Caracterizar la población en estudio: edad, tiempo de búsqueda de embarazo y causa de infertilidad.
2. Mencionar los métodos más utilizados en la actualidad para medir reserva ovárica.
3. Enumerar las medidas terapéuticas empleadas según la causa de infertilidad (FIV, FIV/ICSI, ICSI).
4. Conocer las dosis de gonadotropinas empleadas y días promedio de estimulación.
5. Mencionar la tasa de embarazos simples, múltiples y la tasa de abortos.

JUSTIFICACIÓN

- 1) La valoración de la reserva ovárica es un estudio fundamental en las parejas infértiles.
- 2) La baja reserva ovárica es una causa cada vez más frecuente de infertilidad, ya que la mujer posterga la maternidad hasta edades avanzadas.
- 3) Es un trastorno de difícil manejo.
- 4) Es difícil establecer con seguridad el diagnóstico de baja reserva ovárica porque aun no existe un estudio de certeza.
- 5) En los ciclos de reproducción asistida se utilizan numerosos métodos diagnósticos y distintas modalidades terapéuticas, lo cual implica un importante costo económico y emocional para las parejas, por lo que, el abordaje debe ser metódico y preciso.
- 6) En México no encontramos estudios sobre hormona anti-Mülleriana y reserva ovárica por lo cual su estudio brindará información aun no valorada sobre el tema.
- 7) Los resultados y las conclusiones de esta investigación podrían utilizarse de referencia para la elaboración de normas en reproducción asistida, lo que ayudaría al mejoramiento de las tasas de concepción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Este estudio prospectivo se realizó con 54 pacientes atendidas en el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana, VIDA, del Hospital Puerta de Hierro, Guadalajara (Jalisco), México. Se incluyeron pacientes bajo tratamientos de alta complejidad desde marzo a julio de 2007.

El rango de edad de las pacientes fue de 19 a 45 años.

Criterios de inclusión: toda mujer que requiera captura folicular como parte de su tratamiento, con perfil ovárico basal y AMH en día 2 o 3 del ciclo.

Criterios de exclusión: pacientes que realizaron tratamientos alternativos como ovodonación.

Determinaciones hormonales

En el día 2 o 3 del ciclo menstrual, se tomaron las muestras para medir los niveles de FSH, LH, estradiol y AMH. Ese mismo día se realizó un ultrasonido transvaginal basal para descartar la presencia de quistes en el ovario.

Las determinaciones de FSH, LH, y estradiol se realizaron el mismo día de la venopuntura y se congelaron muestras de suero a -20 °C para la posterior medición de AMH.

Las determinaciones de FSH, LH y estradiol se obtuvieron por inmunoquimioluminiscencia (IMMULITE®).

La AMH fue determinada en suero por método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) mediante el kit DSL-10-14400 ACTIVE® MIS/AMH (laboratorio DSL, Webster, Texas). La sensibilidad de detección del kit es de 0.017 ng/ml. En el presente estudio los valores se expresan en ng/ml.

Las unidades de expresión de AMH encontradas en la literatura son (Fleming et al., 2006): $\text{ng/ml} = \text{mcg/l} = \text{pmol/l} \div 7.143$

Estimulación ovárica

Antes de comenzar el ciclo de estimulación ovárica todas las pacientes fueron sometidas a examen físico general y ginecológico, también se descartó enfermedad tiroidea.

A todas las parejas se les realizó pruebas de HBs Ag (antígeno australiano), anti-HVC (anti-hepatitis C) y anti-HIV (anti-virus de inmunodeficiencia humana) y se analizó por lo menos una muestra de semen de cada pareja.

A las pacientes se les realizó un ciclo de hiperestimulación ovárica controlada utilizando antagonistas. Se comenzó la estimulación en el 2º o 3º día del ciclo menstrual con FSHr (hormona foliculoestimulante recombinante) o menotropinas 225-375 UI diarias y en algunos casos se agregó 2.5 mg diarios de letrozole durante los cinco primeros días de estimulación. Este esquema de estimulación se llevó a cabo durante 6-12 días. El antagonista se inició cuando hubo un folículo de 14 mm o más de uno de 13 mm. Se utilizaron dosis diarias de 0.25 mg de cetorelix subcutáneo hasta lograr dos o más folículos mayores o iguales a 18 mm, momento en que se administró 10.000 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana) intramuscular.

Dos pacientes no fueron estimuladas. Se les realizó la captura folicular y maduración in vitro de sus ovocitos.

Los ciclos fueron cancelados durante la estimulación si se obtuvieron menos de 2 folículos en crecimiento.

A las 37 horas de la hCG se procedió a realizar la punción folicular.

Fertilización en el laboratorio

Capacitación de la Muestra Espermática

El semen procedente de eyaculado se evaluó para elegir la técnica de capacitación espermática adecuada para recuperar la mayor cantidad de espermatozoides viables. Los métodos utilizados para la capacitación fueron el Swim - up y el de gradientes de Percoll:

- En el método de Swim - up los espermatozoides móviles se separaron del plasma seminal por deslizamiento natatorio hacia arriba de los mismos. Para

ello, se colocó la muestra de semen en un tubo redondo Falcon® y posteriormente se adicionó medio HTF (Human Tubal Fluid simple In Vitro Care®) en relación 1:1. Se homogeneizó la muestra y se centrifugó a 60 G (gravidades) por 10 minutos. Una vez centrifugado se decantó el medio excedente y únicamente se dejó el pellet formado. Al tubo se le adicionó 500 µl de medio y se lo dejó reposar a un ángulo de 45° durante 45 minutos en la incubadora con CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C; una vez transcurrido este tiempo se recuperó el sobrenadante.

- El método de gradientes de Percoll permite una mejor selección de los espermatozoides en base a la morfología. En casos de oligoastenoteratozoospermia severa se realizó un lavado simple de la muestra para concentrar los espermatozoides presentes y reducir las células que se encuentran en el líquido seminal.

Captura folicular

La captura folicular se realizó bajo sedación y con guía ultrasonográfica. Para ellos se utilizó una aguja 19 Gauge OPS® Single lumen (CCD International Laboratory) y bajo una presión de 100 mmHg.

Los ovocitos fueron recolectados del líquido folicular, lavados con HTF HEPES (In Vitro Care®) y colocados posteriormente en una caja de cultivo; donde se dejaron incubando con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C por 2 horas. Dependiendo de la calidad espermática de la muestra y de la indicación de la paciente se realizó FIV, FIV/ICSI o ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoide).

1) Fertilización In - vitro

Los ovocitos recolectados fueron lavados, y colocados en una caja de cultivo en microgotas de HTF cubiertas con parafina líquida (LifeGlobal®), luego de lo cual se dejaron incubando con 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C.

Una vez capacitada la muestra se realizó una dilución de la misma con el medio de

cultivo HTF logrando una concentración espermática de 200,000 espermatozoides por mililitro.

Posteriormente se preparó la caja de inseminación, colocando microgotas (el número de microgotas fue variable de acuerdo con el número de ovocitos) de la dilución de la muestra de semen en una caja 1008 (NUNC®). En la parte superior de la caja se colocaron 3 gotas de medio para lavado HTF simple cubriéndolas con parafina líquida.

Una vez preparada la caja de inseminación se colocó en la incubadora por 15 minutos antes de realizar la inseminación, esto para permitir que se establezca el nivel de CO₂ y la temperatura.

Ya transcurridos los 15 minutos se procedió a realizar la inseminación. Con una pipeta Pasteur de vidrio estéril y previamente flameada, se tomó cada ovocito y se colocó en una microgota de la dilución de la caja de inseminación.

La caja de inseminación con los ovocitos se dejó incubando con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C.

Después de 16 a 18 horas de haber realizado la inseminación, los ovocitos se decumularon y una vez removidas todas las células del cúmulus se colocaron en una caja de cultivo (IVC - ONE, In Vitro Care®) y se evaluó la fecundación.

Se corroboró que la fecundación fue exitosa por la presencia de 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares. En el día 2 se evaluó la división y se decidió si se transferían en día 2 o si se dejaban un día más en cultivo.

2) ICSI

En el ICSI los ovocitos se liberaron de las células del cúmulus por medios enzimáticos y mecánicos, esto 2 a 4 horas después de que se realizó la aspiración folicular.

El óvulo se denudó primero pipeteándolo en una solución de hialuronidasa (In Vitro Care®) que varió en concentración de 80 a 100 UI y a una temperatura de 37 °C, la duración de la exposición del ovocito a la enzima fue limitada, porque de no ser así, el ovocito puede realizar una activación partenogénica.

Posterior a la liberación enzimática de las células del cúmulus, se realizó la denudación mecánica en un medio de cultivo con buffer HEPES (In Vitro Care®) y pipetas Pasteur estériles de vidrio alargadas finamente por medio de calor o con puntas para pipeta

existentes en el mercado con diámetros que varían desde los 175 hasta los 125 μm .

Una vez desnudados los ovocitos, se observaron en el microscopio invertido para evaluar su madurez y calidad y luego se dejaron en reposo en la incubadora por un periodo mayor a 20 minutos.

Inmovilización de Espermatozoides

Una vez capacitada la muestra se realizó la inmovilización del espermatozoide, el cual es un punto crucial para la realización exitosa del ICSI y considerado un procedimiento necesario para que ocurra la fertilización.

Mediante este paso se desestabiliza la membrana plasmática del espermatozoide, esto permite la liberación del factor citosólico del espermatozoide, el cual es necesario para inducir la activación ovocitaria. Este es un requisito para que se lleve a cabo la descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino.

Este procedimiento se realizó en una placa de ICSI con cuatro gotas centrales de PVP (polivinil pirrolidona, In Vitro Care®), en dos de ellas se colocó parte de la muestra de espermatozoides. Esto facilitó la inmovilización ya que hace que la movilidad espermática se torne mas lenta debido a la viscosidad de dicha solución.

Alrededor de las microgotas de PVP se colocaron microgotas de un medio con buffer HEPES, en las cuales se realizó la inyección de los ovocitos. Por último las gotas se cubrieron con parafina líquida.

La inmovilización de los espermatozoides consiste en frotar la cola contra la placa de ICSI logrando esto con la micropipeta de inyección (MIC-50-30; HUMAGEN®) con un movimiento rápido de izquierda a derecha o viceversa lo que da como resultado que la cola sufra una fractura en un punto, preferentemente por debajo de la pieza media, debido a que esta región contiene el centriolo proximal el cual es necesario para la formación del huso bipolar en la primera división mitótica.

Inyección del Ovocito

Durante el ICSI se enfatizó en la selección e inmovilización de espermatozoides viables, esto es que presenten una buena movilidad y que no sean teratozoospermicos; en el

correcto posicionamiento del ovocito previo a la inyección y la ruptura del oolema para la liberación del espermatozoide al citoplasma del ovocito.

Posterior a la inmovilización del espermatozoide, se lo tomó nuevamente con la micropipeta de inyección que contiene PVP aspirándolo por la cola. El ovocito se sujetó con ayuda de la micropipeta holding (MPH-SM-30; HUMAGEN®) mediante succión lo que permitió mantenerlo en una posición adecuada. El ovocito debe posicionarse de tal manera que el cuerpo polar quede a hora seis o a las doce de las manecillas del reloj, con lo que se asegura que al momento de la inyección la micropipeta no penetre cerca de donde presuntamente se localiza el huso meiótico.

La micropipeta de inyección se introdujo en el plano ecuatorial del ovocito penetrando la zona pelúcida y la membrana plasmática hasta llegar a un sitio cercano al opuesto de la inyección.

Con el espermatozoide en la punta de la micropipeta, se aspiró el ooplasma hasta observar por una aceleración del flujo que la ruptura de la membrana se ha realizado correctamente. Esto asegura que el espermatozoide sea colocado en el citoplasma del óvulo y posteriormente se inicie la activación.

Una vez depositado el espermatozoide se retiró lentamente la micropipeta de inyección y se observó la restauración de la membrana en el sitio de inyección. Luego se liberó el ovocito de la pipeta de holding y fue colocado en una caja con medio de cultivo (IVC-TWO; In vitro care®).

Esta caja se dejó en la incubadora de CO₂ hasta evaluar fecundación 12 – 16 horas después, corroborando esto con la presencia de 2 pronúcleos y 2 cuerpos polares.

En el día 2 se evaluó la división y la calidad del embrión y se determinó si se transferían en ese día o si se dejan en cultivo para transferir en un día 3.

3) FIV/ICSI

A las pacientes que se someten por primera vez a un ciclo de fertilización in vitro se les realiza preferentemente FIV/ICSI; esto siempre y cuando haya 10 o más óvulos y la muestra de semen lo permite. En este caso a la mitad de los óvulos se les realiza FIV y a la otra mitad ICSI. Se sigue el mismo proceso descrito anteriormente en las dos técnicas.

Maduración in Vitro de ovocitos

Desde el día 2-4 del ciclo menstrual se vigiló el crecimiento folicular y endometrial, sin dejar que el folículo dominante alcance los 10 mm. Se administraron 10,000 UI de hCG intramuscular 37 horas antes de la captura folicular.

La aspiración de los ovocitos se realizó bajo sedación utilizando una aguja de 19 Gauge OPS® Single lumen (CCD International Laboratory), igual que para los ciclos estimulados con gonadotropinas. La presión de aspiración fue de 50-60 mmHg o 7.5 kPa, lo que equivale a la mitad de la presión habitual.

Para la recolección del líquido folicular se utilizaron tubos de ensayo con solución salina al 0.9% y 2 UI/ml de heparina, a 37 °C. Una vez identificados en el laboratorio los complejos cúmulo corona ovocito (CCCO), se incubaron en medio de cultivo para maduración (Ri-Cheng Chian®)

Se controló la maduración, que toma habitualmente 24-48 horas. Una vez maduros, los CCCO se decumularon para ICSI según la técnica ya descrita.

El día de la punción folicular se reevaluó a la paciente y se administraron estrógenos vía oral según el espesor endometrial:

< 6mm: 10mg de Valerato de Estradiol/ día.

> 6mm: 6mg de Valerato de Estradiol/ día.

La administración del estradiol se comenzó el mismo día de la punción folicular y, al día siguiente, se inició Progesterona oil 50mg/día IM.

Transferencia Embrionaria

La transferencia de los embriones fue realizada en día 2 o día 3 dependiendo de la calidad embrionaria y del número de embriones.

La selección embrionaria se realizó de acuerdo al tamaño de las blastómeras y el grado de fragmentación. La escala de graduación varía de 1 (embrión de excelente calidad) a 5 (embrión de mala calidad):

- Grado 1: Blastómeras de igual tamaño y acorde al día de desarrollo, sin fragmentación.

- Grado 2: Blastómeras de igual tamaño, con fragmentación citoplasmática que cubre menos del 10% de la superficie del embrión; o bien, blastómeras asimétricas sin fragmentación.
- Grado 3: Blastómeras simétricas o asimétricas y fragmentación del 10 al 25%.
- Grado 4: Blastómeras de igual o desigual tamaño y con fragmentación citoplasmática moderada a importante que cubre hasta el 50% de la superficie del embrión.
- Grado 5: Embriones con fragmentación intensa que ocupa más del 50% de su superficie.

La transferencia de los embriones fue realizada 48-72 horas después de la captura folicular. Se transfirieron hasta 4 embriones utilizando catéteres Frydman® Ultrasoft. Los embriones se depositaron a un centímetro del fondo uterino, bajo visualización por ultrasonido transabdominal y vejiga llena.

Posterior a la transferencia las pacientes recibieron progesterona oil 50 mg intramuscular por día, ácido fólico y 4 mg de estradiol hasta la prueba de embarazo y luego se reevaluó la continuidad del tratamiento.

A los 14 días de transferencia se realizó una cuantificación de subunidad beta de hCG en sangre para confirmar embarazo.

Análisis estadístico

Para analizar la relación entre respuesta ovárica a la hiperestimulación ovárica controlada y los valores de AMH, FSH y edad, se emplearon regresión logística tanto simple como múltiple. También se construyeron curvas ROC para comparar la sensibilidad y especificidad entre las variables y para estimar el punto de corte para AMH.

RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 54 pacientes. La edad promedio fue de 34.3 años (19 a 45 años).

El periodo medio de infertilidad fue de 5.3 años (rango: 0 a 20 años). Sólo una paciente no tuvo búsqueda de embarazo (tiempo de infertilidad 0 años) ya que quiso preservar fertilidad para un futuro.

El promedio total de gonadotropinas empleadas en las pacientes que llegaron a la punción bajo hiperestimulación ovárica controlada fue de: 2903 UI (1200-5400).

El promedio de días de estimulación fue de 9 días (6-12 días).

Cuatro pacientes fueron canceladas antes de la captura folicular por falta de respuesta. Una paciente quiso preservar fertilidad por lo cual se vitrificaron sus óvulos. Otra paciente llegó a la captura pero no se obtuvieron ovocitos.

De las 48 pacientes restantes a 8 se les realizó FIV, a 12 FIV/ICSI y a 28 ICSI (en este último grupo se incluyeron 2 pacientes a las cuales se les maduraron los óvulos in vitro y luego se inyectaron).

Las causas de infertilidad fueron las siguientes: 1) factor masculino: 14 pacientes, 2) factor tubárico: 6 pacientes, 3) factor ovárico: 18, 4) ESCA (esterilidad sin causa aparente): 9, y 5) Endometriosis: 7 pacientes.

El objetivo principal fue conocer la respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada, la cantidad de ovocitos capturados e identificar a las pacientes con baja reserva.

Para nuestro estudio se definió baja reserva ovárica como la obtención de 4 ovocitos o menos en la captura folicular (baja respondedora), o bien a la cancelación del ciclo por obtener 2 o menos folículos en desarrollo después de un protocolo de hiperestimulación.

En la TABLA 1 se muestran las características de las pacientes: edad, años de infertilidad, FSH basal y AMH basal. Estos datos se analizan en el grupo total, en el grupo de baja reserva y en las pacientes que presentaron buena respuesta.

Se efectuó análisis de regresión logística simple para evaluar la relación de los niveles de AMH con la presencia de baja respuesta ovárica (TABLAS 2 y 3).

El valor del estadístico G es significativo ($p < 0.05$) y el estimador de máxima verosimilitud B es significativamente diferente de 0 ($p < 0.05$), lo que nos permite concluir que la AMH se relaciona con la probabilidad de buena respuesta ovárica.

Para obtener un punto de corte que maximice la sensibilidad y especificidad, se efectuó una curva ROC comparando los valores de AMH con la respuesta ovárica observada (FIGURA 2).

El área bajo la curva es significativamente diferente de 0.5 ($p < 0.05$), por lo que también con esto podemos concluir que los valores de AMH se relacionan con la probabilidad de tener una buena respuesta ovárica (TABLA 4).

La TABLA 5 muestra las coordenadas de la curva ROC para AMH. Si tratamos de buscar un punto de corte para la aplicación clínica, en el cual tengamos una alta sensibilidad y especificidad, vemos que con un valor de AMH de 1.3 ng/ml la sensibilidad esperada es de 85.7 % y la especificidad se mantiene elevada, de aproximadamente un 83.3%.

Otro de nuestros objetivos del análisis, fue comparar la AMH con otros predictores de buena respuesta ovárica que se han descrito. En el presente estudio, se compararon la AMH, la FSH y la edad.

Se efectuó regresión logística única tanto para la edad como para la FSH (TABLAS: 6, 7, 8 y 9).

Estos valores muestran que la edad y la FSH también se relacionan con la respuesta ovárica ($p < 0.05$), pero como se puede observar, los pseudo-coeficientes de determinación calculados mediante r cuadrada de Cox y Snell y de Nagelkerke son menores que los obtenidos con AMH (al igual que en regresión lineal, el valor entre más cercano a 1, significa que la relación es mayor), lo que nos sugiere que la AMH puede ser un mejor predictor.

Debido a que existe fundamento biológico para pensar que estas variables pudieran estar interrelacionadas, se analizó estadísticamente si la edad y la FSH modifican la capacidad predictiva de la AMH. Para ello, se construyeron dos modelos de regresión logística múltiple (TABLA 10), uno en el que se introdujeron las variables AMH, FSH y edad, y otro en el que además de estas variables, se analizó si había interacción entre AMH y edad.

Cuando se analizó estadísticamente si la edad y la FSH modifican la capacidad predictiva de la AMH, se comprobó que la AMH tiene capacidad de predecir reserva independientemente de las otras variables.

Como se puede observar, el modelo final (paso 2 de TABLA 10) no toma en cuenta la FSH, ya que su presencia no mejora el rendimiento del modelo.

Algo similar sucede en el modelo con interacción (TABLA 11). La FSH no añade mayor significación al modelo por lo que es excluida. Sin embargo, podemos concluir que la edad modifica el efecto de la AMH, ya que cuando se añade al modelo la interacción (AMH por edad), se modifican significativamente los parámetros de la ecuación, de tal modo que en el modelo final, sólo se toma en cuenta la AMH y la interacción (AMH por edad).

Por último, para comparar su rendimiento como predictores, se calcularon curvas ROC para AMH, FSH, edad, y los modelos construidos (FIGURA 3).

De acuerdo a los valores del área bajo la curva (TABLA 12), observamos que el predictor menos eficiente es la FSH, mientras que el más eficiente es el modelo con interacción (AMH por edad). Sin embargo, los intervalos de confianza se traslapan entre sí, por lo que no podemos decir que hay una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. De cualquier modo, debido al tamaño de muestra, estos resultados deben ser tomados con cautela.

Como observamos interacción entre edad y AMH, se efectuó un análisis de regresión lineal entre estas dos variables, el cual resultó estadísticamente significativo (coeficiente de determinación de 0.171) (TABLA 13). En la FIGURA 4 se observa que edad y AMH están inversamente relacionados (la pendiente es negativa).

De las 48 pacientes que tuvieron punción folicular y en las cuales se obtuvieron óvulos, 45 pacientes lograron embriones para transferir (una paciente vitrificó sus óvulos y otras dos no lograron embriones transferibles).

En total 22 parejas ($22/45 = 48$, 89%) lograron una prueba positiva de embarazo.

Cinco embarazos fueron dobles, uno fue triple, por lo que el 27% ($6/22$) de los embarazos fue múltiple.

Un embarazo terminó en aborto ($1/22 = 4.5\%$) y otro fue un embarazo bioquímico ($1/22 = 4.5\%$). Esta baja incidencia puede ser explicada quizás por el corto seguimiento en algunas pacientes.

Sólo una baja respondedora que llegó a la punción folicular y tuvo embriones para transferir, logró embarazo ($1/6 = 16\%$). Esta paciente de 35 años de edad tuvo una FSH basal de 20.6 UI/l y una AMH de 0.25 ng/ml. Se capturaron 3 ovocitos y se transfirieron 3 embriones, lográndose un embarazo doble.

Respecto a las pacientes de maduración in vitro de ovocitos, de una se aspiraron 7 CCCO de los cuales maduraron 6, se transfirieron 3 embriones en día 3 y tuvo un embarazo bioquímico; de la otra paciente, se obtuvieron 22 CCCO, 15 maduraron in

vitro, se transfirieron 3 embriones en día 3, se logró un embarazo simple y criopreservaron 6 embriones.

DISCUSIÓN

El primer objetivo fue demostrar la utilidad de esta hormona. Según el análisis de regresión logística simple y el área bajo la curva ROC, concordamos con otros autores (McIlveen et al., 2007; Seifer et al., 2002; Fanchin et al., 2003; Hazout et al., 2004), en que la AMH es un buen predictor de reserva ovárica.

Los valores de corte separando pacientes de buen y mal pronóstico son escasos en la literatura. Tampoco existen criterios internacionales para la medición de AMH, lo cual puede contribuir a la discordancia entre diferentes estudios y hacer difícil la comparación de los valores de distintos laboratorios (Peñarrubia et al., 2005).

Para nuestra utilidad práctica buscamos un valor de corte para predecir baja respuesta y cancelación de ciclos. Con un valor de AMH de 1.3 ng/ml, la sensibilidad (verdaderos positivos) esperada es de 85.7 % y la tasa de falsos positivos se mantiene relativamente baja, en aproximadamente un 16.7%.

Comparando con otras publicaciones, un valor de 4.9 pmol/l (0.69 ng/ml) discriminó entre ciclos cancelados y no cancelados (Peñarrubia et al., 2005) y un valor de corte de 8.1 pmol/l (1.13 ng/ml), podría predecir pobre respuesta ovárica en un ciclo de fertilización in vitro con una sensibilidad de 80% y una especificidad de 85% (Tremellen et al., 2005). Fişicioglu et al, 2006 han reportado que con un valor de corte de 0.25 ng/ml obtienen una sensibilidad y especificidad del 90.9% para predecir reserva ovárica.

Otro autor (Silberstein et al., 2006) utilizó la mediana de todas las mediciones de AMH (2.7 ng/ml al momento de la administración de la HCG) para distinguir dos grupos de estudio en términos de implantación ($P < 0.001$).

Interesantemente, según Ebner et al., 2006, usando la medición basal de AMH no puede estimarse la tasa de fertilización ni la calidad embrionaria. Esto se contradice con el trabajo de Silberstein et al. (2006) quien encontró embriones de mejor morfología y tasa de división en las pacientes con $AMH \geq 2.7$ ng/ml. Esto puede ser en parte explicado porque los autores midieron la AMH en el día de la administración de la HCG (no en el día 3 del ciclo), un momento en que los valores de AMH están usualmente disminuidos por la presencia de folículos grandes (Fanchin et al., 2003b) y ello podría hacer variar los resultados.

Eldar-Geva et al., 2005, publicó un valor basal de 18 pmol/l (2.52 ng/ml), el cual

permite una buena predicción para lograr un embarazo ($P < 0.01$).

Respecto a las tasas de implantación y embarazo se ha concluido en un estudio publicado recientemente que es posible medir reserva ovárica y predecir la respuesta ovárica a la hiperestimulación pero ningún test, incluido la AMH, es buen predictor de embarazo (McIlveen et al., 2007). Esto concuerda con publicaciones anteriores. En un meta análisis, se concluyó que la FSH basal no es un predictor útil de resultados en FIV (Bancsi et al., 2003), posiblemente por la variabilidad interciclo (Scott et al., 1990; Bancsi et al., 2004b). Varios estudios encontraron poca o nula evidencia de medir inhibina B en la fase folicular precoz para predecir embarazo en pacientes de FIV (Hall et al., 1999; Tinkanen et al., 1999; Creus et al., 2000; Ravhon et al., 2000; Dumesic et al., 2001). La capacidad de la AFC para predecir embarazo es limitada (Bancsi et al., 2002; Ng et al., 2003; Hendriks et al 2005). Estas conclusiones se deben probablemente a que los test de reserva ovárica se relacionan más con el número de ovocitos obtenidos en un ciclo que con la calidad ovocitaria.

Sería interesante ahora efectuar un estudio prospectivo con el punto de corte elegido para corroborar la sensibilidad y especificidad de la AMH para predecir buena respuesta y comprobar qué sucede con la predicción de implantación y embarazos.

Otro de los interrogantes planteados al iniciar el estudio de la AMH fue conocer su valor frente a edad y FSH basal.

El análisis de regresión logística única muestra que la edad y la FSH también se relacionan con la respuesta ovárica ($p < 0.05$), pero menos que la AMH, lo que nos sugiere que la AMH puede ser aún un mejor predictor.

Mediante el análisis de regresión logística múltiple se pudo comprobar estadísticamente que la edad y la FSH modifican la capacidad predictiva de la AMH, pero que la AMH tiene capacidad de predecir reserva independientemente de las otras variables.

Así mismo, un reporte previo muestra que si a la AMH la asociamos con FSH basal e inhibina B mejora la capacidad de predecir de la reserva ovárica (van Rooij et al., 2002).

En las curvas ROC para AMH, FSH, edad, y los modelos construidos (AMH x edad) observamos que el predictor menos eficiente es la FSH, mientras que el más eficiente es el modelo que toma en cuenta la interacción entre AMH y edad.

La asociación entre edad y AMH concuerda con los hallazgos publicados en la literatura (de vet et al., 2002; Fanchin et al., 2003a), y resulta interesante mostrar gráficamente cómo están inversamente relacionados.

CONCLUSIONES

Podemos afirmar ahora que la AMH es un buen predictor de reserva ovárica.

Para la aplicación clínica, tomando un valor de AMH de 1.3 ng/ml tendremos una sensibilidad de alrededor de 85.7 % y una especificidad de aproximadamente 83.3%. Esto nos permitirá poner en práctica un protocolo de hiperestimulación ovárica dirigido a las bajas respondedoras con escaso riesgo de desarrollo de síndrome de hiperestimulación ovárica.

La edad y la FSH también se relacionan con la respuesta ovárica, pero menos que la AMH lo que nos sugiere que la AMH puede ser aún un mejor predictor.

Si se analizan conjuntamente las variables AMH, edad y FSH, esta última no añade mayor valor predictivo.

Pudimos observar una relación negativa entre la AMH y la edad. Sin embargo, cuando se ajusta el modelo para esta interacción, la AMH sigue siendo significativa, por lo que la AMH es un factor independiente de la edad para predecir respuesta ovárica.

Esta revisión y los hallazgos en nuestras pacientes ponen a la AMH en un lugar preferencial dentro de los estudios de reserva ovárica si tenemos en cuenta que: su valor predictivo junto a la edad es óptimo, es fácil de medir (se mantiene estable durante el ciclo menstrual, no se modifica en situaciones en que las gonadotropinas endógenas están disminuidas como, por ejemplo, en la etapa prepuberal, el embarazo y la toma de anticonceptivos), no es operador dependiente como los estudios ultrasonográficos y probablemente tenga mucha utilidad en un futuro en el diagnóstico de ciertas patologías como PCOS, riesgo de OHSS, medición de reserva ovárica postquimioterapia y en la endometriosis.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Recordar que el factor ovárico es el indicador más influyente en los resultados reproductivos de alta complejidad. Por lo tanto, la detección oportuna de reserva ovárica disminuida, ofrece a la oportunidad de:

- Adecuar el tratamiento (alta o baja complejidad) con el objetivo de maximizar el pronóstico reproductivo.
- Elegir el protocolo de estimulación ovárica según respuesta esperada brindando la mayor posibilidad de embarazo por ciclo.
- Ofrecer alternativas, como por ejemplo donación de óvulos.
- Advertir a las pacientes que postergan la maternidad y poner al alcance técnicas como la vitrificación de óvulos.
- Evitar el desgaste emocional que implican los tratamientos con bajas tasas de éxito y
- Disminuir los costos a largo plazo evitando tratamientos reiterados con pobres resultados.

ANEXOS (GRÁFICOS)

FIGURA 1: TEST DE AGONISTA DE GnRH (Padilla et al., 1990).

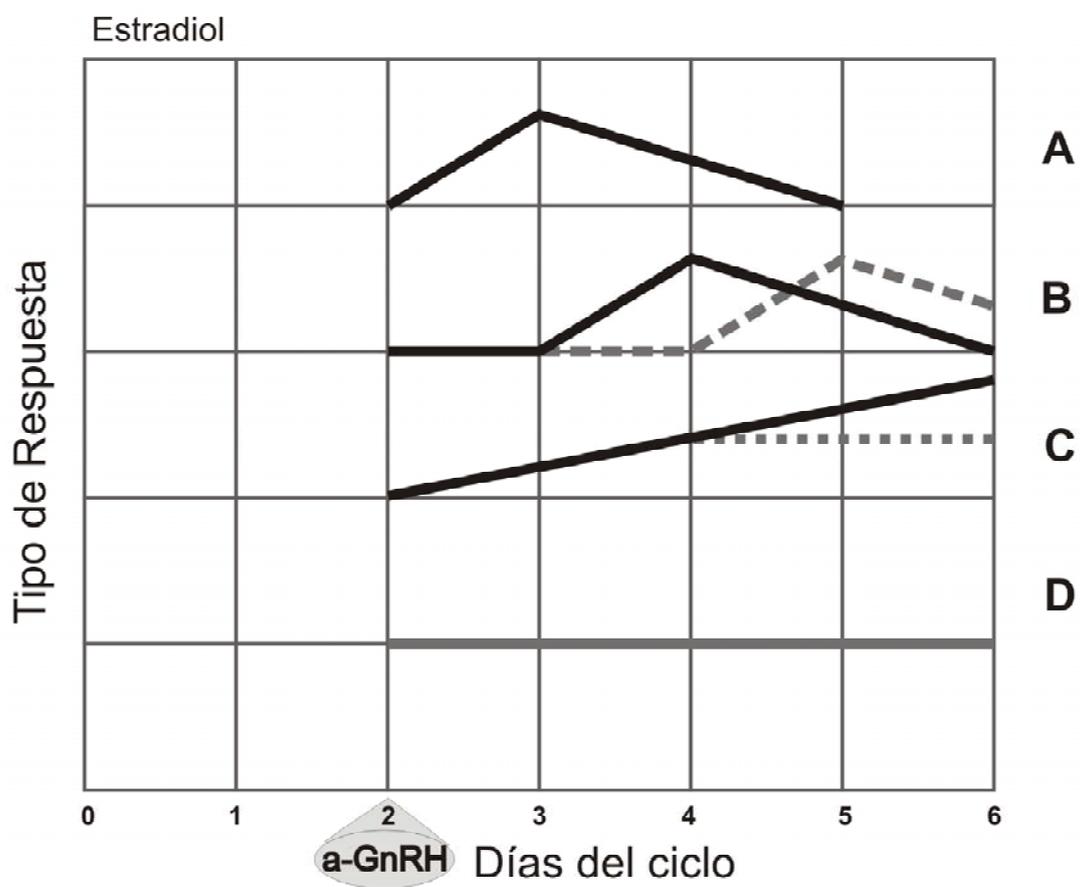


TABLA 1: datos calculados con SPSS para las variables dependiendo de la respuesta ovárica

Variables	Grupo de estudio (n=54)	Baja reserva (n=4 canceladas + 9 con ≤ 4 ovocitos)	Buenas respondedoras (n=41)
Edad	34.3 (19-45)	38.3 (29-45)	33.1 (19-45)
Años de infertilidad	5.3 (0-20)	8.7 (1-20)	4.3 (1-10)
FSH basal	10.6 (2.5-28.5)	15.4 (2.5-28.5)	9.3 (3.4-23.4)
AHM basal	2.97 (0.0-12.09)	0.59 (0.0-2.07)	3.7 (0.37-12.09)

TABLA 2: Resumen del modelo

Paso	Estadístico G	R ² de Cox & Snell	R ² de Nagelkerke
1	27.385	<u>0.424</u>	<u>0.650</u>

TABLA 3: Regresión logística entre edad y reserva ovárica

	B	Error estándar	Wald	df	Sig.	Exp(B)
AMH	2.449	0.749	10.678	1	0.001	11.575
Constante	-2.152	0.918	5.493	1	0.019	0.116

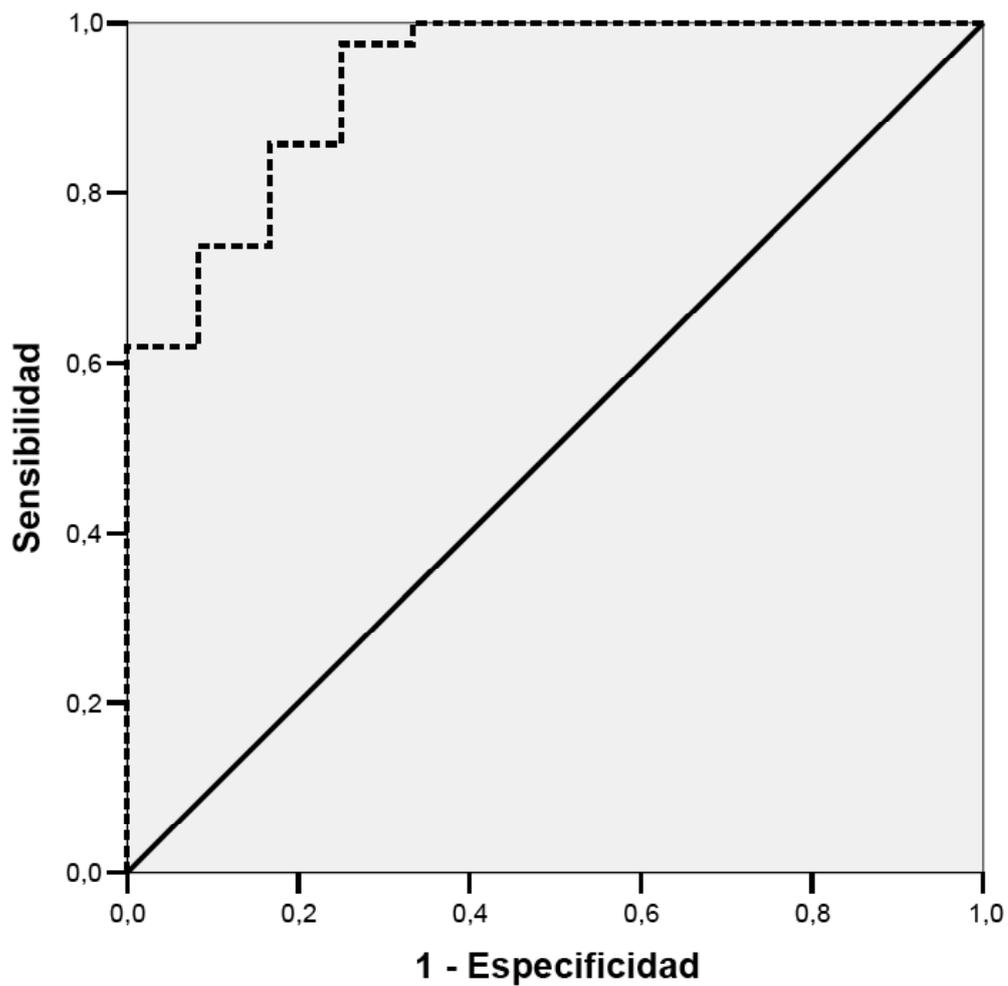


FIGURA 2: Curva ROC para AMH

TABLA 4: Área bajo la curva

Área	Error estándar (a)	P (b)	Intervalo de confianza al 95% asintótico	
			Límite inferior	Límite superior
0.933	0.039	0.00004	0.855	1.010

A Bajo suposición no paramétrica
 b Hipótesis nula: Área real = 0.5

TABLA 5: Coordenadas de la Curva

Buena respuesta ovárica si AMH igual o mayor a:	Sensibilidad (tasa de verdaderos positivos)	1-especificidad (tasa de falsos positivos)
-1.0000	1.000	1.000
0.0250	1.000	0.917
0.1050	1.000	0.833
0.1850	1.000	0.750
0.2300	1.000	0.667
0.2550	1.000	0.500
0.3050	1.000	0.417
0.3600	1.000	0.333
0.4800	0.976	0.333
0.7250	0.976	0.250
0.9700	0.952	0.250
1.0850	0.929	0.250
1.1050	0.905	0.250
1.1650	0.881	0.250
1.2450	0.857	0.250
<u>1.3350</u>	<u>0.857</u>	<u>0.167</u>
1.4550	0.833	0.167
1.5550	0.810	0.167
1.5950	0.786	0.167
1.6200	0.762	0.167
1.6600	0.738	0.167
1.7150	0.738	0.083
1.7650	0.714	0.083
1.7900	0.690	0.083
1.8900	0.643	0.083
2.0250	0.619	0.083
2.1500	0.619	0.000
2.2450	0.595	0.000
2.2750	0.571	0.000
2.4300	0.548	0.000
2.5900	0.524	0.000
2.6450	0.476	0.000
2.8300	0.452	0.000
3.0200	0.429	0.000
3.0800	0.405	0.000
3.2900	0.381	0.000
3.5350	0.357	0.000
3.6450	0.333	0.000
4.1100	0.310	0.000
4.6100	0.286	0.000
4.7400	0.262	0.000
5.0700	0.238	0.000
5.4050	0.214	0.000
5.4700	0.190	0.000
6.0550	0.167	0.000
6.8000	0.143	0.000
7.0200	0.119	0.000
7.3450	0.095	0.000
9.3200	0.071	0.000
11.4850	0.048	0.000
12.0250	0.024	0.000
13.0900	0.000	0.000

El valor mínimo de la prueba es -1. El valor máximo es +1. Los demás valores aislados consituyen el promedio de dos valores observados en la prueba ordenados de manera consecutiva.

TABLA 6: Resumen del modelo de regresión logística para la edad.

Paso	Estadístico G	Cox & Snell R ²	Nagelkerke R ²
1	47.724(a)	<u>0.161</u>	<u>0.247</u>

TABLA 7: Parámetros del modelo de regresión logística para edad y reserva ovárica

	B	Error estándar	Wald	df	Sig.	Exp(B)
edad	-0.222	0.085	6.860	1	0.009	0.801
Constante	9.221	3.168	8.472	1	0.004	10105.762

TABLA 8: Resumen del modelo de regresión logística para la edad

Paso	-2 Log verosimilitud	Cox & Snell R ²	Nagelkerke R ²
1	48.287(a)	<u>0.152</u>	<u>0.233</u>

TABLA 9: Parámetros del modelo de regresión logística para FSH y reserva ovárica

	B	Error estándar	Wald	df	Sig.	Exp(B)
FSH	-0.160	0.058	7.615	1	0.006	0.852
Constante	3.161	0.823	14.760	1	0.000	23.593

TABLA 10: Parámetros de modelo sin interacción

		B	Error estándar	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a)	AMH	2.449	0.749	10.678	1	0.001	11.575
	Constante	-2.152	0.918	5.493	1	0.019	0.116
Paso 2(b)	AMH	3.483	1.182	8.680	1	0.003	32.573
	edad	-0.422	0.194	4.716	1	0.030	0.656
	Constante	12.023	6.278	3.668	1	0.055	166606.536

a Variable paso 1: AMH.

b Variable paso 2: edad.

TABLA 11: Parámetros del modelo con interacción.

		B	Error estándar	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a)	AMH por edad	0.056	0.018	9.995	1	0.002	1.057
	Constante	-1.585	0.782	4.113	1	0.043	0.205
Paso 2(b)	Edad	-0.467	0.193	5.867	1	0.015	0.627
	AMH por edad	0.085	0.029	8.820	1	0.003	1.089
	Constante	13.929	6.227	5.005	1	0.025	1120738.198
Paso 3(c)	AMH	13.845	7.737	3.202	1	0.074	1029481.343
	edad	-0.199	0.259	0.590	1	0.442	0.820
	AMH por edad	-0.265	0.187	2.007	1	0.157	0.767
	Constante	3.899	8.988	0.188	1	0.664	49.347
Paso 4(c)	AMH	16.819	6.743	6.221	1	0.013	20151305.417
	AMH por edad	-0.351	0.153	5.238	1	0.022	0.704
	Constante	-3.176	1.242	6.540	1	0.011	0.042

a Variables del paso 1: AMH por edad.

b Variable del paso 2: edad.

c Variable del paso 3: AMH.

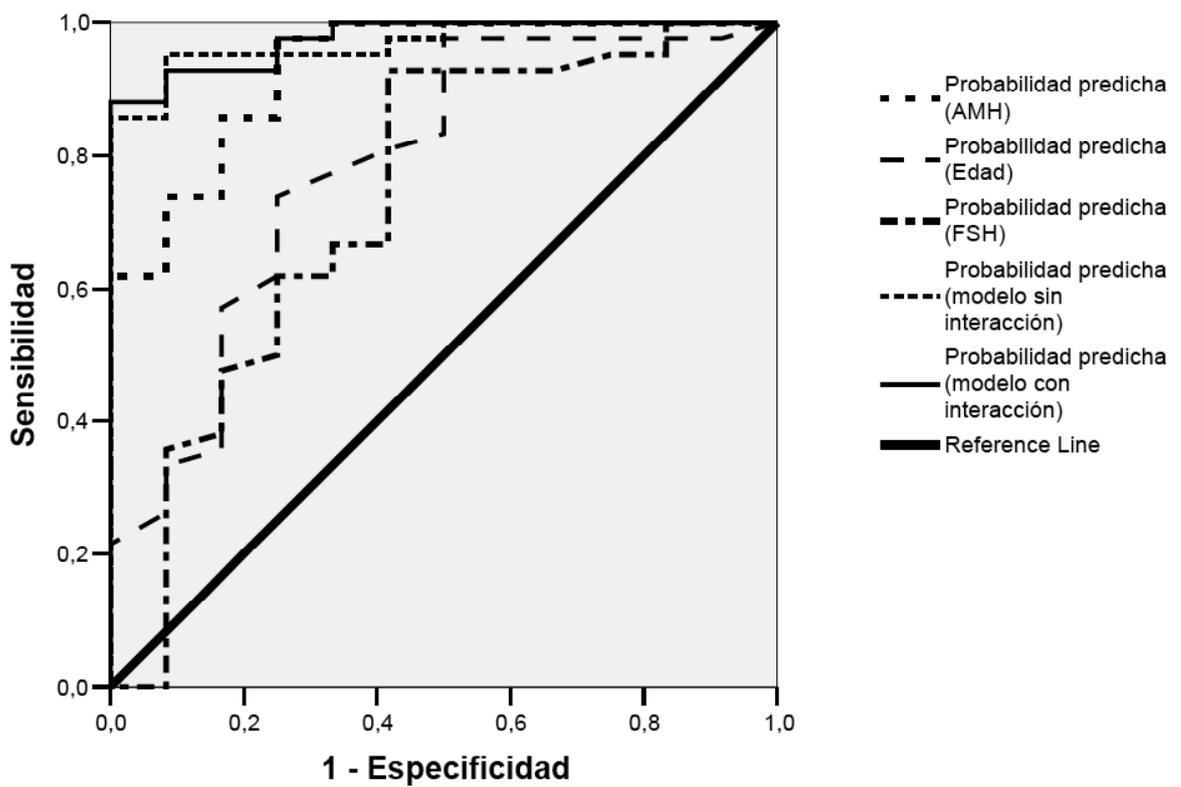


FIGURA 3: Curvas ROC para AMH, FSH, edad, modelo logístico con interacción y sin interacción. La curvas se construyeron empleando la probabilidad de buena respuesta ovárica predicha por cada uno de los modelos y la reserva ovárica observada.

TABLA 12: Área bajo la curva

Test Result Variable(s)	Area	Error(a) Estándar	Sig.asintótica (b)	Asintótico 95% Intervalo confianza	
				Límite inferior	Límite superior
Probabilidad predicha (AMH)	0.933	0.039	0.000	0.855	1.010
Probabilidad predicha (Edad)	0.785	0.080	0.003	0.629	0.941
Probabilidad predicha (FSH)	0.735	0.093	0.014	0.553	0.918
Probabilidad predicha (modelo sin interacción)	0.970	0.020	0.000	0.931	1.010
Probabilidad predicha (modelo con interacción)	0.976	0.017	0.000	0.943	1.009

a Bajo la suposición no paramétrica

b Hipótesis nula: area verdadera = 0.5

TABLA 13: coeficientes a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
Constante (edad)	10.243	2.250	-0.413	4.552	0.000
	-0.212	0.065		-3.273	0.002

a: variable dependiente: AMH

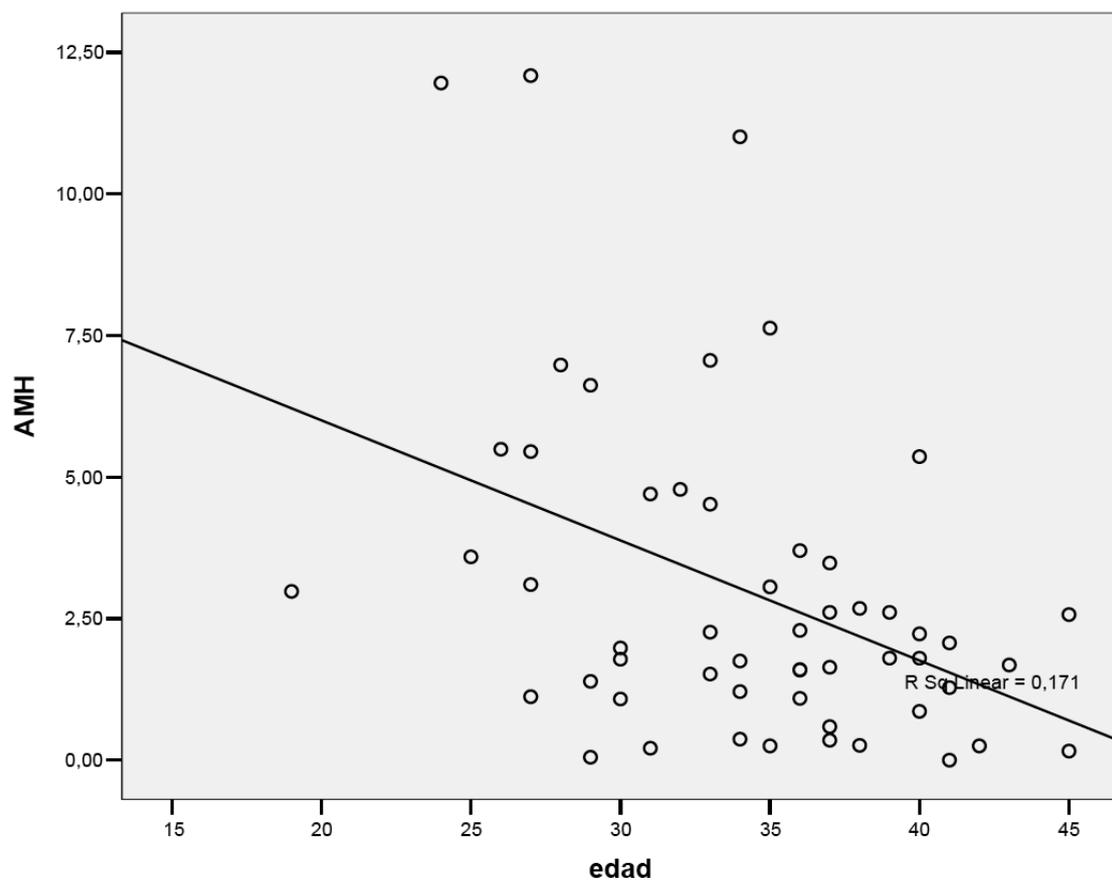


FIGURA 4

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leuwen EC, Themmen AP and Grootegoed LA (1995). Anti-müllerian hormone and antimüllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin- induced follicle growth. *Endocrinology* 136, 4951–4962.

Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD and te Velde ER (2002). Predictors of poor ovarian response in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 77, 328–336.

Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD and te Velde ER (2003). 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* 79, 1091–1100.

Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD and te Velde ER (2004a). Predicting poor ovarian response in IVF: use of repeat basal FSH measurement. *J Reprod Med* 4, 187–194.

Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD and te Velde ER (2004b). Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 81, 35–41.

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

Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ and Fauser BC (2002). Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil Steril* 78, 291–297.

Bili H, Laven J, Imani B, Eijkemans MJ and Fauser BC (2001). Age-related differences in features associated with polycystic ovary syndrome in normogonadotrophic oligo-amenorrhoeic infertile women of reproductive years. *Eur J Endocrinol* 145, 749–755.

Broekmans FJ, Bancsi LFJ, Looman CW et al. (2000). Comparison of basal markers of ovarian reserve in IVF: a prospective study. Abstracts of the 16th Annual Meeting of the ESHRE, Bologna, Italy.

Bukman A and Heineman MJ (2001). Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update* 7, 581-590.

Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH (1998). Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproduction technologies. *Fertil Steril* 69, 505-510.

Cook CL, Siow Y, Brenner AG and Fallat ME (2002). Relationship between serum mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 77, 141–146.

Corson SL, Gutman J, Batzet FR, Wallace H, Klein N, and Soules MR (1999). Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod* 14, 2818-2821.

Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, Vanrell JA and Balasch J (2000). Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod* 15, 2341–2346.

Crosignani PG, Ragni G, Parazzini F, Wyssling H, Lombroso G and Perotti L (1994). Anthropometric indicators and response to gonadotrophin for ovulation induction. *Hum Reprod* 9, 420–423.

Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F, Oden A, Janson PO, Mattson LA, Crona N and Lundberg PA (1992). Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and

circulating hormones. *Fertil Steril* 57, 505–513.

de Vet, A., Laven, J.S., de Jong, F.H., Themmen, A.P. and Fauser, B.C. (2002). Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 77, 357-362.

di Clemente, N., Ghaffari, S., Pepinsky, R.B., Pieau, C., Josso, N., Cate, R.L. and Vigier, B. (1992). A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-mullerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Development* 114, 721-727.

di Clemente N, Josso N, Gouedard L and Belville C (2003). Components of the anti-Mullerian hormone signaling pathway in gonads. *Mol Cell Endocrinol* 211, 9–14.

Dumesic DA, Damario MA, Session DR, Famuyide A, Lesnick TG, Thornhill AR and McNeilly AS (2001). Ovarian morphology and serum hormonal markers as predictors of ovarian follicle recruitment by gonadotropins for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2538–2543.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA and Themmen AP (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789–5796.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA et al. (2001). Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142, 4891–4899.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA and Themmen AP (2002a). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076–1084.

Durlinger AL, Visser JA and Themmen AP (2002b). Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124, 601–609.

Duru NK, Ceyhan T, Goktolga U, Hasimi A, Orhon E, Baser I (2007). Anti-Müllerian hormone is decreased in patients with ovarian endometrioma. 23rd Annual Meeting of the ESHRE 2007.

Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E and Tews G (2006). Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 21, 2022–2026.

Efraín Perez Pena (2007). Atención integral de la infertilidad. Mc Graw Hill, cap 21, pág 443.

Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E and Margalioth EJ (2005). Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 20, 3178–3183.

Elter K, Imir G and Durmusoglu F (2002). Clinical, endocrine and metabolic effects of metformin added to ethinyl estradiol-cyproterone acetate in non-obese women with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled study. *Hum Reprod* 17, 1729–1737.

Elting MW, Korsen TJ, Rekers-Mombarg LT and Schoemaker J (2000). Women with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when ageing. *Hum Reprod* 15, 24–28.

Elting MW, Kwee J, Korsen TJ, Rekers-Mombarg LT and Schoemaker J (2003). Aging women with polycystic ovary syndrome who achieve regular menstrual cycles have a smaller follicle cohort than those who continue to have irregular cycles. *Fertil Steril* 79, 1154–1160.

Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC and Dunselman GA (1998). Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 69,1010–

1014.

Faddy MJ and Gosden RG (1996). A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* 11, 1484–1486.

Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C and Carrillo A (1997). Müllerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril* 67, 962–965.

Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A and Frydman R (1994). Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting ‘poor responders’ in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 9, 1607–1611.

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R and Taieb J (2003a). Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH, LH on day 3. *Hum Reprod* 18, 323–327.

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R and Taieb J (2003b). Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 18, 328–332.

Fanchin R, Taieb J, Méndez Lozano DH, Ducot B, Frydman R and Bouyer J (2005). High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 20, 923–927.

Fişicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z (2006). Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 85, 592-596.

Fleming R, Deshpande N, Traynor I and Yates RWS (2006). Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod* 21, 1436–1441.

Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT and Segars JH (2003). A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 80, 350–355.

Hall JE, Welt CK and Cramer DW (1999). Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 14, 409–415.

Hansen LM, Batzer FR, Gutmann JN, Corson SL, Kelly MP, Gocial (1996). Evaluating ovarian reserve: follicle stimulating hormone and oestradiol variability during cycle days 2-5. *Hum Reprod* 11, 486-489.

Hansen KR, Morris JL, Thyer AC and Soules MR (2003). Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting. *Fertil Steril* 80, 577–583.

Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM and Cohen-Bacrie P (2004). Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 82, 1323–1329.

Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER and Broekmans FJ (2006). Anti-Müllerian Hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 4057–4063.

Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER and Broekmans FJ (2005). Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 83, 291–301.

Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR, Hopkisson JF, Campbell BK, Johnson IR, Raine-Fenning NJ (2007). Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Hum Reprod* 22, 1932-41.

Josso N, di Clemente N, Gouedard L (2001). Anti-Müllerian hormone and its Receptors. *Mol Cell Endocrinol* 179, 25–32.

Karande V and Gleicher N (1999). A rational approach to the management of low responders in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 14, 1744-8.

Kevenaar M, Temen A, Laven J, Sonntag B, Fong S, Uitterlinden A, Jong F, Pols H, Simoni M and Visser J (2007). Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 22, 1547–1554.

La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Fischer Tamaro L, Orvieto R, Levratti P and Volpe A (2004). Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 19, 2738–2741.

La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L and Volpe A (2005a). Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Invest* 12, 545–548.

La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V and Volpe A (2005b). Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod* 20, 1569–1572.

La Marca A, Pati M, Orvieto R, Stabile G, Carducci Artensio A and Volpe A (2006a). Serum anti-Mullerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertil Steril* 85, 1547–1549.

La Marca A, Stabile G, Carducci Artensio A and Volpe A (2006b). Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 21, 3103-3107

Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R (2004). Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Hum Reprod* 19, 1055-9.

Larsen EC, Müller J, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Andersen AN (2003). Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Hum Reprod* 18, 417-422.

Lass A, Skull J, McVeigh E, Margara R, Winston RM (1997a). Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod* 12, 294-297.

Lass A, Silye R, Abrams DC, Krausz T, Hovatta O, Margara R, Winston RM (1997b). Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 12, 1028-31.

Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH and Fauser BC (2004). Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 318–323.

Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D and MacLaughlin DT (1996). Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 571–576.

Lee M, Wu YL, Chen CP, Shih YT, Chen CI, Huang LS, Huang CC (2007). Anti-Müllerian hormone level strongly predicts IVF outcomes and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) occurrence. 23rd Annual Meeting of the ESHRE 2007.

Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS (2007). Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril* (artículo en impresión).

Lenton EA, Sexton L, Lee S (1998). Progressive changes in LH and FSH and LH/FSH ratio in women throughout reproductive life. *Maturitas* 10, 35-43.

Lintsen AM, Pasker-de Jong PC, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CA, Braat DD and van Leeuwen FE (2005). Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* 20, 1867–1875.

Loh S, Wang JX and Matthews CD (2002). The influence of body mass index, basal FSH and age on the response to gonadotrophin stimulation in non-polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod* 17, 1207–1211.

Loumaye E, Billion JM, Mine JM, et al. (1990). Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 53, 295-301.

Maheshwari A, Fowler P and Bhattacharya S (2006). Assessment of ovarian reserve: should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod* 21, 2729–2735.

Massin N, Gougeon A, Meduri G, Thibaud E, Laborde K, Matuchansky C, Constancis E, Vacher-Lavenu MC, Paniel B, Zorn JR, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P (2004). Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod* 19, 2555–2560.

McIlveen M, Skull JD and Ledger WL (2007). Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Human Reproduction* Vol.22, 778–785.

Mondión M, Camus A, Altieri E, et al. (2001). Valor de la medición de hormona folículo estimulante (FSH) del día tercero del ciclo en la predicción de la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas. Resumen de la XVII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana.

Morin-Papunen LC, Koivunen RM, Ruukonen A and Martikainen HK (1998). Metformin therapy improves the menstrual pattern with minimal endocrine and metabolic effects in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 69, 691–696.

Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis LM, Liu HC, Jones GS and

Rosenwaks Z (1988). The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 50, 298–307.

Mukherjee T, Copperman AB, Lapinski R, Sandler B, Bustillo M, Grunfeld L (1996). An elevated day three follicle-stimulating hormone: luteinizing hormone ratio (FSH : LH) in presence of a normal day 3 FSH predicts a poor response to controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 65, 588-593.

Mulders A, Laven J, Eijkemans M, de Jong F, Themmen A and Fauser B (2004). Changes in anti-Mullerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod* 19, 2036–2042.

Munsterberg A and Lovell-Badge R (1991). Expression of the mouse antimullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113, 613–624.

Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H and Sathanandan M (2004). Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 111, 1248–1253.

Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, Brzezinski A, Birkenfeld A and Schenker JG (1987a). Periovulatory 17 beta-estradiol pattern in conceptional and nonconceptional cycles during menotropin treatment of anovulatory infertility. *Fertil Steril* 47, 234–237.

Navot D, Rosenwaks Z, Mergalioth EJ (1987b). Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* 332, 645-647.

Nestler JE and Jakubowicz DJ (1997). Lean women with polycystic ovary syndrome respond to insulin reduction with decreases in ovarian P450c17 alpha activity and serum androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4075–4079.

Ng EH, Yeung WS, Fong DY and Ho PC (2003). Effects of age on hormonal and

ultrasound markers of ovarian reserve in Chinese women with proven fertility. *Hum Reprod* 18, 2169-2174.

Ng EH, Chan CC, Yeung WS, Ho PC (2004). Effect of age on ovarian stromal flow measured by three-dimensional ultrasound with power Doppler in Chinese women with proven fertility. *Hum Reprod* 19, 2132-7.

Ng EH, Tang OS, Chan CC, Ho PC (2005). Ovarian stromal blood flow in the prediction of ovarian response during in vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 20, 3147-3151.

Padilla SL, Bayati J and Garcia JE (1990). Prognostic value of the early serum estradiol response to leuprolide acetate in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 53, 288-294.

Pellicer A, Ardiles G, Neuspiller F, Remohí J, Simón C, Bonilla-Musoles F (1998). Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal basal levels of follicle stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography. *Fertil Steril* 70, 671-675.

Peñarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA and Balasch J (2005). Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist – gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 20, 915–922.

Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S and Dewailly D (2003). Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5957–5962.

Piltonen T, Morin-Papunen L, Koivunen R, Perheentupa A, Ruokonen A and Tapanainen J (2005). Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 20, 1820–1826

Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, Bangsboll S, Andersson AM and Andersen AN (2003). A prospective study of predictive factors of ovarian response in 'standard' IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage normogram. *Hum Reprod* 18, 781–787.

Raddatz J, Strowitzki T and von Wolf M (2007). AMH, Inhibin B and FSH to determine ovarian toxicity of chemotherapies and efficiency of GnRH-a in cancer patients. 23rd Annual Meeting of the ESHRE 2007.

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL and Skakkebaek NE (1999). Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3836–3844.

Ranieri DM, Quinn F, Makhlof A, Khadum I, Ghutmi W, McGarrigle H, Davies M and Serhal P (1998) Simultaneous evaluation of basal folliclestimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril* 70, 227–233.

Ravhon A, Lavery S, Michael S, Donaldson M, Margara R, Trew G and Winston R (2000). Dynamic assays of inhibin B and oestradiol following buserelin acetate administration as predictors of ovarian response in IVF. *Hum Reprod* 15, 2297–2301.

Richardson SJ and Nelson JF (1990). Follicular depletion during the menopausal transition. *Ann NY Acad Sci* 592, 13-20.

Roseboom TJ, Vermeiden JPW, Schoute E, Lens JW and Schats R (1995). The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patient, cause of infertility, number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple regression analysis. *Hum Reprod* 10, 3035–3041.

Santoro N, Adel T and Skurnick JH (1999). Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril* 71, 658-662.

Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z (1989). Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 51, 651-654.

Scott RT, Hofmann GE, Oehninger S and Muasher SJ (1990). Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 54, 297–302.

Scott RT, Leonardi MR, Hofmann GE, Illions EH, Neal GS, Navot D (1993). A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening in the general infertility population. *Obstet Gynecol* 82, 539-545.

Scott RT, Opsahl MS, Leonardi MR, Neall GS, Illions EH, Navot D (1995a). Life table analysis of pregnancy rates in a general infertility population relative to ovarian reserve and patient age. *Hum Reprod* 10, 1706-1710.

Scott RT and Hofmann GE (1995b). Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril* 63, 1–11.

Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA (1997). Day 3 serum inhibin B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 67, 110-144.

Seifer DB, Scott RT, Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, Danforth DR (1999). Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 72, 63-65.

Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B and Shelden RM (2002). Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 77, 468–471

Shermann BM, West JH, Korenman SG (1979). The menopausal transition: analysis for LH, FSH, estradiol and progesterone concentration during menstrual cycles of older women. *J Clin Endocrinol Metab* 42, 629-636.

Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL and Blazar AS (2006). Müllerian inhibitory substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 21, 159–163.

Syrop CH, Dawson JD, Husman KJ, Sparks AE, Van Voorhis BJ (1999). Ovarian volume may predict assisted reproductive outcome better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 14, 1752-1756.

Teixeira J, Maheswaran S and Donahoe PK (2001). Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 22, 657–674.

Tinkanen H, Blaüer M, Laippala P, Tuohimaa P and Kujansuu E (1999). Prognostic factors in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 72, 932–936.

Tomas C, Nuojuua-Huttunen S and Martikainen H (1997). Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 12, 220–223.

Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A and Lekamge DN (2005). Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 45, 20–24.

van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH and Themmen AP (2002). Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 17, 3065–3071.

van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP and Te Velde ER (2005). Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a

longitudinal study. *Fertil Steril* 83, 979–987.

Veeck LL (1999) Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In Veeck LL (ed) *An Atlas of Human Gametes and Conceptus*. Parthenon, New York, pp. 40–45.

Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F and Glueck CJ (1994). Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 43, 647–654.

Weenen C, Laven JS, von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser J, Kramer P, Fauser BC and Themmen AP (2004). Anti-Mullerian hormone (AMH) expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic recruitment. *Mol Hum Reprod* 10, 77–83.

Winslow KL, Toner JP, Brzyski RG, Oehninger SC, Acosta AA, Muasher SJ (1991). The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test - a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 56, 711-717.

Yong PY, Baird DT Thong KJ, McNeilly AS and Anderson RA (2003). Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod* 18, 35–44.

Younis JS, Haddad S, Matilsky M, Radin O, Ben-Ami M (2007). Undetectable basal ovarian stromal blood flow in infertile women is related to low ovarian reserve. *Gynecol Endocrinol* 23, 284-289.