

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO MÉDICO PUERTA DE HIERRO

“INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA VIDA”

“MEJOR RECUPERACIÓN OVOCITARIA CON ADICIÓN DE HORMONA DEL
CRECIMIENTO EN PACIENTES CON MALA RESPUESTA OVÁRICA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

PRESENTA:

DRA. ANABEL DEL CARMEN RONQUILLO VALVERDE

ASESOR:

DR ERNESTO PÉREZ LUNA

CIUDAD DE MÉXICO. JULIO 2017



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.

CENTRO MÉDICO PUERTA DE HIERRO
“INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA VIDA”

Dr. Efraín Pérez Peña
Director General

Dr. Ernesto Pérez Luna
Director de Educación e Investigación en Salud

Dr. Ernesto Pérez Luna
Asesor de Tesis

DEDICATORIAS

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento...Papá, Mamá, Api y Erick.

AGRADECIMIENTOS

Mamá y Papá: No dejo de pensar en los primeros pasos, si hay algo que se hacer bien es por ustedes y cuando llega el éxito por un esfuerzo no puedo dejar de recordar su cercanía, devoción y complicidad es decir su ejemplo, que ésta sea la recompensa por tantos años de entrega, desvelos, y apoyo, los amo con todo mi corazón.

Api: Apenas tienes una idea de todo lo que significas para mí, somos inseparables, hemos compartido tantas cosas que mis logros son tuyos también, eres mi bebe, mi mejor amiga, mi hermana, siempre estaremos juntas, te amo.

Erick: Aunque haya muchas diferencias entre nosotros, eres uno de mis motores para seguir adelante, gracias por regalarme momentos, los cuales siempre recordaré, te amo.

Don Pepe, Doña Lupita y Doña Fide mi agradecimiento eterno porque siempre han estado a lo largo de mi vida para darme experiencias y consejos de vida, gracias por las risas y consentirme tanto creo q no sería la mujer que soy sino fuera por el amor tan grande de Uds. mis abuelos y un beso enorme hasta el cielo para mi Abuelito Nino y mi Tia Tinita siempre están en mis pensamientos los amo.

A todas mis hermanas de vida Peka, Betty, Gaby, Faby, Liss, Natita, Cha, Gina, Clau, Lucy, Kika, Yunuen, Pao, Rosalris, Lore, Sol; no en orden de importancia pero saben que cada una tiene un lugar especial en mi corazón, porque he compartido miles de cosas con Uds. y siempre me han alentado a seguir adelante, gracias por todas la risas y las tardes interminables de amistad.

Conejo Pepito gracias por hacer mis días mejores desde que llegaste T.a.

A toda mi familia, tíos, tías, primos yo sé que siempre están pidiendo por mí y siempre que regreso a casa me apoyan incondicionalmente, los quiero.

Por último mi bebe perruno Chispita, eres mi otro yo y siempre estas ahí para alegrarme la vida, te amoo.

RESUMEN

ANTECEDENTES: Para mejorar la recuperación ovular en pacientes con baja respuesta ovárica se recomiendan múltiples estrategias con resultados variables, entre ellas destacan los adyuvantes a la estimulación ovárica como hormona del crecimiento, andrógenos y antioxidantes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: En el campo de la tecnología de reproducción asistida grandes pasos se han dado en términos de conocimiento clínico y desarrollo tecnológico especialmente en laboratorios de FIV. Y un reto en este campo son las pacientes definidas como “pobres respondedoras” ya que el número limitado de ovocitos recuperados permanece como el problema principal en optimizar la tasa de nacidos vivos. Existen varias estrategias para mejorar la respuesta en este tipo de pacientes, una de las cuales es adición de hormona del crecimiento durante la estimulación ovárica, por lo tanto el concepto de potenciar el efecto exógeno de las gonadotropinas con hormona del crecimiento, puede ser utilizado como un abordaje alternativo para mejorar la tasa de recuperación ovocitaria e influir de manera positiva en las tasas de embarazo en vez de cambiar la dosis o el tipo de gonadotropinas, en este tipo de pacientes. Ya que no existe bibliografía nacional el efecto sobre recuperación ovocitaria con adición de HG en pacientes llamadas “pobres respondedoras”.

JUSTIFICACIÓN: La hormona del crecimiento juega un importante rol en la esteroidogénesis ovárica y el desarrollo folicular. El tratamiento con hormona del crecimiento parece modular la acción de la FSH en las células de la granulosa regulando la síntesis local del factor de crecimiento tipo Insulina I (IGF-I), por lo que se espera una mayor recuperación ovocitaria en pacientes con mala respuesta en una estimulación y por lo cual se mejoran las probabilidades de tener éxito en un ciclo de tratamiento.

El beneficio de ésta estrategia se podría ver en menor cancelación de ciclos por pobre respuesta, mayor número de ovocitos maduros, con lo que se tendría mayor tasa de fertilización y mayores tasas de embarazo, lo cual se traduce en un beneficio importante para la paciente al reducir la cantidad de ciclos realizados con el consecuente desgaste económico e incrementar la probabilidad de embarazo en un plazo más corto.

OBJETIVOS: Determinar los resultados en términos de recuperación ovocitaria con la adición de hormona del crecimiento en pacientes con mala respuesta ovárica en ciclos previos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realizó un estudio observacional de cohorte descriptivo en el Centro Médico Puerta de Hierro Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Servicio Biología de la Reproducción, en pacientes con mala respuesta ovárica en ciclos realizados de 2015 a junio 2017. En cada paciente se revisó el expediente clínico en búsqueda de las variables determinadas en la hoja de recolección de datos. El análisis estadístico se realizó con el programa Prisma 5.0, con el cual se realizó una prueba de normalidad D'Agostino & Pearson ómnibus, aquellos datos que se comportaban de manera normal se analizaron con una T de student pareada y los datos que no se comportaron de manera normal se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney el cual calculó los valores de P, considerándose estadísticamente significativos aquellos < 0.05, se calcularon las medias y la desviaciones estándar de las variables demográficas.

RESULTADOS:

En este estudio incluimos 14 pacientes con un promedio de edad 37.6 años \pm 4.426 con un IMC de 23.15 \pm 2.97.

Se determinó el efecto de la hormona del crecimiento a través de las dosis totales de gonadotropinas que fueron significativamente más altas que cuando no se utilizó hormona del crecimiento en el protocolo con un valor de P= 0.0340, los días de estimulación fueron similares en ambos casos (P=0.0951), sin embargo el total de ovocitos recuperados fue significativamente más alto cuando se adicionó HG (P=0.0022), además el número de ovocitos MII fue significativamente mayor con HG (P=0.0064), por último en cuanto al grosor endometrial se observa una diferencia significativa (P= 0.0382).

CONCLUSIÓN: En la muestra en donde las mismas pacientes con EOC sin HGH funcionan como grupo control, los resultados muestran con HGH una mayor recuperación de ovocitos maduros, menor tasa de cancelación. Se requieren estudios prospectivos controlados y aleatorizados en un mayor número de casos de baja respuesta previa para confirmar esta impresión inicial.

INDICE

Antecedentes.....	8
Planteamiento del problema.....	16
Justificación.....	16
Objetivos.....	16
Hipótesis.....	17
Material y métodos.....	18
Resultados.....	22
Discusión.....	26
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29

ANTECEDENTES

La tendencia a finales del siglo XX de retrasar el nacimiento del primer niño hasta la edad en la que la fecundidad femenina o la capacidad reproductiva están disminuidas ha aumentado la incidencia de la infertilidad relacionada con la edad. La tendencia y sus consecuencias han estimulado el interés en los posibles factores en la mujer y en el hombre que pueden contribuir a la disminución de la fecundidad con la edad, así como en las consecuencias para el embarazo y el parto. En la mujer, el número de ovocitos disminuye con la edad hasta la menopausia, así como la calidad de los ovocitos en gran parte a una mayor cantidad de aneuploidías debido a factores tales como cambios en la integridad del huso meiótico. Aunque la edad masculina también afecta la probabilidad de concepción, las anomalías en los cromosomas del espermatozoide y en algunos componentes del semen son menos importantes que la frecuencia de las relaciones sexuales. La edad es tan precisa como cualquier otro predictor de concepción con tecnología de reproducción asistida. La disminución de la fecundidad se hace clínicamente relevante cuando las mujeres llegan a mitad de los 30, cuando incluso el tratamiento de reproducción asistida no puede compensar la disminución en la fecundidad asociada con retrasos en los intentos de concebir. Los embarazos entre mujeres mayores de 40 años están asociados con complicaciones, más nacimientos prematuros, mayor número de malformaciones congénitas y más intervenciones al nacer.¹

En el campo de la tecnología de reproducción asistida grandes pasos se han dado en términos de conocimiento clínico y desarrollo tecnológico especialmente en laboratorios de FIV.²

Y desde su comienzo, los resultados de éste han sido asociados con los resultados de la estimulación ovárica controlada y con el número de ovocitos obtenidos después de ésta y son primeramente determinados por la calidad ovocitaria generalmente considerada influida en menor medida por el espermatozoide^{3, 4,5}

La mayoría de programas de FIV utilizan esquemas de estimulación ovárica los cuales se enfocan en capturar folículos secundarios que han alcanzado el estadio

antral temprano en la fase folicular temprana. A este punto los folículos se convierten en sensibles a FSH y pueden ser seleccionados para crecimiento en el proceso cíclico de reclutamiento. Los tratamientos de fertilidad mediante técnicas de reproducción asistida particularmente con FIV, se han basado en aumentar la cantidad de FSH endógena ya sea con agentes orales como el citrato de clomifeno y más recientemente los inhibidores de la aromatasas o dando FSH exógena en una forma concentrada purificada (ya sea un derivado urinario o producido por tecnología recombinante). La administración exógena de FSH, particularmente cuando está soportada por análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas para prevenir la temprana luteinización, ha sido efectivo en el reclutamiento folicular y la generación de embarazos en tasas satisfactorias.⁶

Sin embargo hay una amplia variabilidad a la respuesta, algunas pacientes mostraran excesiva respuesta con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica mientras otras demostraran grados relativos de resistencia ovárica derivando en una recuperación de pocos ovocitos. El número de ovocitos es muy importante dado el fenómeno relacionado con la edad, el cual dicta que solo una proporción de ovocitos recuperados tendrá integridad maduracional para generar embriones de buena calidad con el subsecuente éxito en la implantación y asegurando embarazos; por ejemplo este nivel podría ser 20% de ovocitos en mujeres jóvenes (< 35 años) pero menos del 10% de ovocitos en mujeres mayores (>40 años).²

La dinámica del ciclo menstrual fue suficientemente bien entendida en los años 60s para permitir la evolución de regímenes exitosos de estimulación ovárica para tratamientos de fertilidad incluyendo la inevitable progresión hacia el FIV. Sin embargo, todos los regímenes se han basado únicamente en la importancia de la FSH como hormona clave para el reclutamiento folicular y maduración. En los últimos 20 años ha habido una intensa atención examinando la endocrinología ovárica y paracrinología usando avances en biología molecular para entender de mejor manera la foliculogénesis, las dinámicas cíclicas y el proceso relacionado con la edad y la pobre calidad de los ovocitos en mujeres de edad avanzada. Hay una comprensión en aumento que la foliculogénesis involucra eventos antes y

otros que tan solo la dependencia de FSH, con el rol de los factores de crecimiento como una consideración obvia. Sugerencias recientes informan que la LH puede mejorar la calidad embrionaria y la implantación ⁷ y el uso de dehidroepiandrosterona para el reclutamiento folicular en pacientes bajas respondedoras, éstos son dos ejemplos en donde estimulantes diferentes de FSH pueden ser necesitados. Críticamente, los regímenes pasados con únicamente FSH se han enfocado en el número de ovocitos más que la calidad.⁸

La falla repetida en FIV es la mayoría de las veces una fuente de estrés en pacientes, especialmente en el grupo de normo-respondedoras en donde se esperan resultados aceptables con la estimulación ovárica.⁹

Los ovocitos de este grupo de pacientes son usualmente clasificados como dismórficos; esto incluye aspectos anormales de citoplasma, espacio perivitelino y zona pelúcida.¹⁰ Las primeras divisiones están bajo el control de ARN mensajero y proteínas almacenadas durante la maduración, la calidad de éstas proteínas está directamente relacionada con la maduración citoplásmica, es decir la competencia necesaria para permitir el desarrollo preimplantatorio temprano en un tiempo adecuado.⁹

En pacientes definidas como “pobres respondedoras” el número limitado de ovocitos recuperados permanece como el problema principal en optimizar la tasa de nacidos vivos.

De hecho, como resultado de un bajo número de ovocitos recuperados, hay menos embriones para seleccionar y transferir y subsecuentemente estas pacientes tienen baja tasa de embarazo por transferencia y baja tasa acumulativa de embarazo por ciclo empezado comparado con respondedoras normales, así mismo aunque el concepto de pobre respuesta ovárica fue introducido desde hace 30 años, no se tiene una definición común en pacientes pobres respondedoras hasta el 2011. De hecho Polyzos y Devroey enfatizaron la enorme variabilidad de definiciones de pacientes pobre respondedoras y esto confirma la dificultad de obtener una exacta incidencia de ésta condición así como comparar resultados de diferentes ensayos y por lo tanto identificar el mejor tratamiento.²

La incidencia de pobres respondedoras a la estimulación ovárica ha sido reportada de 9-24%, y esta es atribuida a pacientes con edad avanzada y por razones iatrogénicas como cirugía ovárica, adhesiones pélvicas, obesidad dado por el IMC.⁹

Recientemente ha habido un interés en mejorar la capacidad reproductiva de mujeres mayores por el cambio de la estructura social y la tendencia mundial de retrasar el matrimonio y los nacimientos.⁹

La tasa de nacimiento en mujeres de 45-49 años es 0.5 por cada 1000 mujeres, indicando que esto se ha incrementado más de dos veces.⁹

La disminución de la fertilidad es secundario a disminución de la calidad ovocitaria que está relacionada con anormalidades de cromátide única y hay poca evidencia de que los factores uterinos tengan un impacto significativo en la infertilidad relacionada con la edad.⁹

La sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) realizó un consenso acerca de la definición de baja respondedora llamado los criterios de Bologna los cuales incluyen:¹¹

Al menos 2 de los siguientes 3 características:

1. Edad materna avanzada (>40) o algún otro factor de riesgo para pobre respuesta ovárica
2. Previa respuesta ovárica pobre (<3 ovocitos con protocolo de estimulación convencional)
3. Test de reserva ovárica anormal (Cuenta de folículos antrales < 5-7 o AMH < 0.5-1.1ng/mL)

Es deseable que ésta clasificación sea usada en el futuro en estudios manejando pobre reserva ovárica.¹¹ Se puede observar un declinamiento fisiológico en la herencia folicular en cada mujer a través del tiempo con un marcado aumento en la tasa de desaparición folicular desde los 37 hasta los 38 años.² Desde este momento hasta la menopausia toma acerca de 10 a 13 años. En pobres respondedoras el mecanismo de insuficiencia ovárica es determinado prematuramente y no completamente entendido. Algunas causas de decremento

en la reserva ovárica han sido identificadas: cirugía ovárica especialmente en caso de endometrioma¹², defectos genéticos, quimioterapia, radioterapia, desórdenes autoinmunes, ovario único, tabaquismo crónico e infertilidad inexplicable.¹³ Además, nuevos factores de riesgo de respuesta baja ovárica han sido propuestos: Diabetes Mellitus Tipo I¹⁴, B-talasemia dependiente de transfusión¹⁵, embolización de arterias uterinas para el tratamiento de leiomiomas uterinos.^{16, 17} Sin embargo, en la mayoría de los casos los mecanismos involucrados en la depleción folicular no están claros.¹³ Ha sido sugerido que el número reducido de ovocitos pudiera estar correlacionado a una reducción en la calidad, lo cual es clínicamente trasladado a una reducción en las tasas de implantación y un aumento de las pérdidas tempranas del embarazo¹⁸.

A la inversa, por la falta de una correlación clara entre la “calidad” y “cantidad”, diferentes autores han sugerido que las pobres respondedoras “per se” no representan una baja probabilidad de éxito en FIV, siendo la edad el predictor más importante de tasas de nacidos vivos ^{19, 20}. Sin embargo, estudios muy grandes han mostrado que este grupo de pacientes tienen tasas de embarazo reducidas comparadas con las normo-respondedoras independientemente del protocolo de tratamiento usado ²¹ y de la edad de la paciente ^{22, 23}.

Si bien fue un gran esfuerzo al hacer esta estandarización, los criterios de Bologna han fallado en distinguir entre alteraciones en la cantidad de ovocitos (estrictamente hablando de pobre respondedora en estimulación ovárica controlada) y en la calidad ovocitaria reflejados en el resultados de la TRA. Lo último reflejado en las tasas de embarazo y nacidos vivos. ⁴

En consideración los test de reserva ovárica incluidos en la definición de pobre respuesta ovárica se perpetúa la confusión entre la disminución en calidad y cantidad ovocitaria que no están ligados necesariamente. Así mismo el trabajo citado por el consenso de Bologna para apoyar que el test de reserva ovárica predice la magnitud de la respuesta en una estimulación (cantidad de ovocitos) indica que los test de reserva no predicen la probabilidad de embarazo. ²⁴

En este grupo de pacientes difíciles está claro que para optimizar los resultados clínicos en FIV no solo es importante predecir la reserva ovárica sino también,

especialmente adaptar el mejor protocolo de estimulación para explotar plenamente la reserva ovárica y optimizar el número de ovocitos recuperados.²

Se han realizado esfuerzos importantes para mejorar las tasas de embarazo en pobres respondedoras usando diversos protocolos de estimulación sin embargo a pesar de esto, las tasas de embarazo después de un FIV son muy bajas.⁹

Aunque no se puede subestimar el rol pivote que tienen las gonadotropinas, otros co-efectores en este tipo de pacientes como Factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y la hormona del crecimiento (GH) no pueden ser descartados en su rol mejorando la maduración citoplásmica. (Ptak *et al.*, 2006; De Matos *et al.* 2008).^{25, 26}

Una de las terapias adyuvantes propuestas para mejorar la estimulación ovárica controlada en los resultados de TRA consiste en una suplementación de HG a regímenes clásicos de estimulación. Los motivos para la suplementación con HG son múltiples. Durante la maduración folicular, un diálogo se establece entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes.⁴ El ovocito en crecimiento expresa un número de genes que juegan papeles pivote en el desarrollo folicular, es decir la presencia del ovocito es reconocida como indispensable para este desarrollo folicular.^{27,28}

Los factores primarios específicos del ovocito son el factor de diferenciación del crecimiento 9 y proteína morfogenética del hueso 15.²⁹ Esto afecta la función de las células de la granulosa y células de la teca, y su presencia es crucial para para proliferación de las células de la granulosa. En turno las células de la granulosa interactúan con el ovocito mediante una red de uniones GAP que forma un sincitio funcional. Por último la íntima conexión entre ovocito-células de la granulosa llevan a una apropiada maduración citoplásmica y nuclear del ovocito. Los factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2 (IGF-1 y 2) están presentes en el líquido folicular y se cree que juegan un rol crucial en la maduración citoplasmática.³⁰ Así mismo el IGF-1 se origina principalmente de niveles circulantes, y el IGF-2 la mayor parte se produce localmente.^{31,32} Además, los receptores para IGF-1 y IGF-2 han sido encontrados en las células de la granulosa donde su acción es modulada por un sistema complejo de proteínas fijadoras, que obstaculizan el efecto estimulador

sobre FSH en la producción de factores de crecimiento tipo insulina. A pesar de que la administración exógena de IGF-1 no tuvo efecto adverso en monos, una elevación similar fue encontrada en pacientes con SOP como un factor clave en maduración ovocitaria alterada^{33,34,35}, posiblemente por la disminución de la proteína fijadora de factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGFBP-1).³⁶

En varios modelos animales de maduración in vitro la administración exógena de HG aumenta el IGF-1 y 2 así como la competencia ovocitaria.^{37,38} La hormona del crecimiento posiblemente puede incrementar la capacidad de reparación del ADN en ovocitos como se muestra en células del hígado.³⁹ Ésta propiedad podría ser instrumental en la reversión de los cambios relacionados con la edad, posiblemente a través de la estimulación del factor de diferenciación de crecimiento 9 y la producción de la proteína morfogénica del hueso 15.^{40,41} En efecto, el envejecimiento ovocitaria está característicamente asociado con un aumento de las no disyunciones meióticas ⁴² en apoyo de esta hipótesis, Mendoza y cols.⁴³ mostraron una correlación positiva entre la habilidad de los ovocitos de evolucionar en embriones morfológicamente normales y los niveles de HG en el fluido folicular. Además varios reportes buscando la función de la HG in vitro indican que el IGF-1 mejora la respuesta a la estimulación con gonadotropinas.^{44,45,46}

La adición de hormona del crecimiento por su acción anti-apoptótica, mejora el medio ambiente intrafolicular y logra una mejor respuesta ovárica en cuanto a la calidad ovular.⁹

Se agrega hormona del crecimiento para estimular la producción de IGF-I por las células de la granulosa, en especial cuando la apoptosis está aumentada como en edad avanzada o bajas respondedoras. Esto favorece, en estas mismas células, la actividad de las aromatasas dependientes de la FSH. Para ello se administran 8 UI diarias junto con la FSH. Cuando en lugar de HGH se utiliza GRH con el mismo fin, los resultados no son consistentes, por lo cual su empleo es menor.⁹

Por lo tanto los resultados de los diferentes estudios infieren que con la administración de hormona del crecimiento se mejora la calidad ovocitaria cuando está deteriorada por la edad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el campo de la tecnología de reproducción asistida grandes pasos se han dado en términos de conocimiento clínico y desarrollo tecnológico especialmente en laboratorios de FIV. Y un reto en este campo son las pacientes definidas como “pobres respondedoras” ya que el número limitado de ovocitos recuperados permanece como el problema principal en optimizar la tasa de nacidos vivos. Existen varias estrategias para mejorar la respuesta en este tipo de pacientes, una de las cuales es adición de hormona del crecimiento durante la estimulación ovárica, por lo tanto el concepto de potenciar el efecto exógeno de las gonadotropinas con hormona del crecimiento, puede ser utilizado como un abordaje alternativo para mejorar la tasa de recuperación ovocitaria e influir de manera positiva en las tasas de embarazo en vez de cambiar la dosis o el tipo de gonadotropinas, en este tipo de pacientes. Ya que no existe bibliografía nacional el efecto sobre recuperación ovocitaria con adición de HG en pacientes llamadas “pobres respondedoras”.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el resultado de la adición de hormona del crecimiento sobre recuperación ovocitaria en pacientes con mala respuesta ovárica previa?

JUSTIFICACIÓN.

La hormona del crecimiento juega un importante rol en la esteroidogénesis ovárica y el desarrollo folicular. El tratamiento con hormona del crecimiento parece modular la acción de la FSH en las células de la granulosa regulando la síntesis local del factor de crecimiento tipo Insulina I (IGF-I), por lo que se espera una mayor recuperación ovocitaria en pacientes con mala respuesta en una estimulación y por lo cual se mejoran las probabilidades de tener éxito en un ciclo de tratamiento.

El beneficio de ésta estrategia se podría ver en menor cancelación de ciclos por pobre respuesta, mayor número de ovocitos maduros, con lo que se tendría mayor

tasa de fertilización y mayores tasas de embarazo, lo cual se traduce en un beneficio importante para la paciente al reducir la cantidad de ciclos realizados con el consecuente desgaste económico e incrementar la probabilidad de embarazo en un plazo más corto.

HIPÓTESIS

La adición de hormona del crecimiento en ciclos de estimulación en pacientes con mala respuesta ovárica incrementaría la recuperación ovocitaria total por ciclo realizado hasta en un 10%.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

Determinar los resultados en términos de recuperación ovocitaria con la adición de hormona del crecimiento en pacientes con mala respuesta ovárica en ciclos previos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Determinar si la adición de hormona del crecimiento aumenta el número de ovocitos maduros/inmaduros recuperados.

Determinar si la adición de hormona del crecimiento aumenta el número de ovocitos Metafase II en el ciclo de estimulación ovárica

Determinar si es menor la duración de la estimulación ovárica con adición de hormona del crecimiento.

Determinar si es menor la dosis de gonadotropinas con adición de hormona del crecimiento

Edd point primario: Número de ovocitos MII por ciclo

MATERIAL Y MÉTODOS.

LUGAR: Centro Médico Puerta de Hierro Instituto de Ciencias de la Reproducción Humana Vida. Servicio Biología de la Reproducción

TIPO DE ESTUDIO: Observacional de Cohorte, Descriptivo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Pacientes con mala respuesta ovárica (< 4-5 folículos) en la estimulación controlada previa.

Pacientes entre 30-45 años

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

Pacientes sin adición de hormona del crecimiento durante ciclos de estimulación.

Pacientes que tuvieran algún proceso oncológico activo.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Pacientes que no se administren hormona del crecimiento de acuerdo a las indicaciones del médico.

VARIABLES

Variables de estudio

VARIABLES	DEFINICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE	INTERRELACIÓN
EDAD	Periodo de vida del paciente al momento de la valoración clínica.	AÑOS	CUANTITATIVA DISCRETA	INDEPENDIENTE
DOSIS GONADOTROPINAS	Dosis de fármacos que se utilizan para estimular a la paciente y lograr crecimiento folicular	UI	CUANTITATIVA CONTINUA	INDEPENDIENTE
DOSIS DE HG	Dosis de fármaco que se utilizan para mejorar la respuesta a la estimulación en pacientes con baja respuesta previa	UI	CUANTITATIVA CONTINUA	INDEPENDIENTE
DURACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN	Número de días de estimulación ovárica para conseguir la mayor cantidad de desarrollo folicular y ovocitario en reproducción asistida.	DIAS	CUANTITATIVA DISCRETA	DEPENDIENTE

OVOCITOS TOTALES RECUPERADOS	Número de ovocitos maduros/inmaduros	NÚMERO	CUANTITATIVA DISCRETA	DEPENDIENTE
OVOCITOS METAFASE II RECUPERADOS	Número de ovocitos maduros	NÚMERO	CUANTITATIVA DISCRETA	DEPENDIENTE

PROCEDIMIENTOS

Descripción:

En el servicio de Biología de la Reproducción, se identificaron a todas las pacientes bajas respondedoras a las que se les haya administrado Hormona del crecimiento en un ciclo siguiente del previo en el cual no se había obtenido una buena respuesta se obtuvieron los expedientes clínicos del archivo clínico para la obtención de los datos que a continuación se señalan:

Nombre, edad, IMC, pacientes con diagnóstico de bajas respondedoras por respuesta previa en primer ciclo a las cuales en segundo ciclo se les adiciono hormona del crecimiento en un protocolo fijo con antagonistas y gonadotropinas, posterior a esto se revisaron expedientes en donde además de las variables explicadas, se obtuvieron dosis totales de gonadotropinas, días totales de estimulación, número total de ovocitos recuperados, número de ovocitos metafase II, y grosor endometrial.

Análisis estadístico

En todas las variables se calculó el promedio y la desviación estándar.

Para demostrar el efecto de hormona del crecimiento se compararon todas las variables antes y después de la adición de la misma, a través de T student pareada.

Recursos humanos:

- Asesor de tesis.
- Investigador de tesis.
- Revisores de tesis.

Recursos materiales:

- Base de datos del Instituto Vida en el Hospital Centro Médico Puerta de Hierro
- Expedientes clínicos del archivo.
- Hojas de captura de datos.
- Equipos de oficina.

Financiamiento

Por el tipo de estudio no se requirió financiamiento externo ni recursos financieros del hospital

Aspectos éticos

El estudio no involucra directamente a las pacientes de acuerdo a los principios de justicia, equidad, beneficencia y no maleficencia. Cumple con los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki y los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud, así como las recomendaciones de las Guías de la Buena Práctica Clínica.

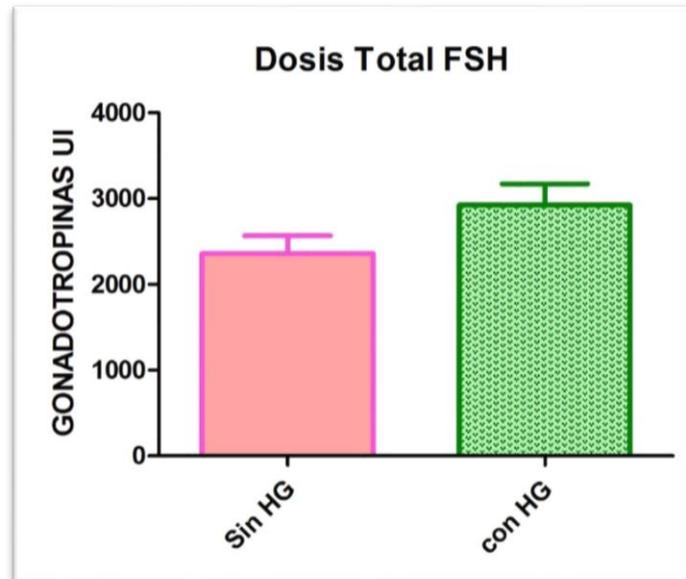
De acuerdo con lo estipulado en el reglamento de la Ley General de Salud, en materia de investigación para la salud, título segundo “De los Aspectos Éticos de la investigación en seres humanos”, capítulo I “Disposiciones Comunes”, artículo 17 sección I de dicha ley, la investigación actual se considera como “Investigación sin riesgo” para las pacientes, puesto que los datos se obtuvieron de los expedientes clínicos.

RESULTADOS

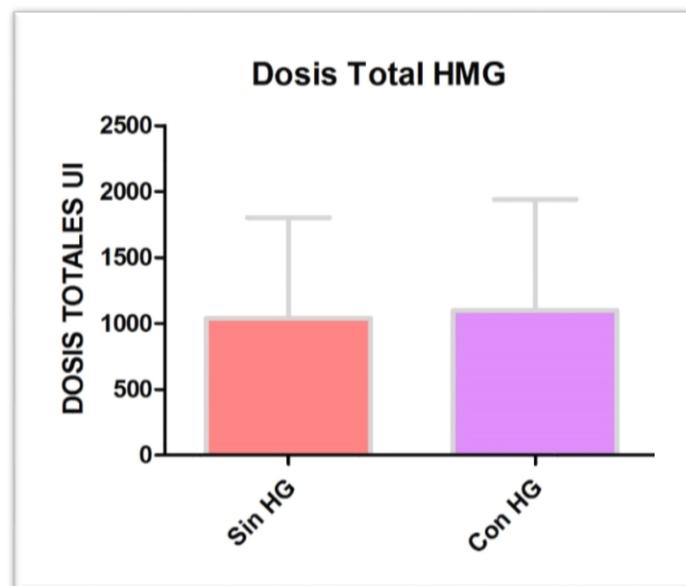
En este estudio se encontraron 40 pacientes en las cuales se utilizó hormona del crecimiento como coadyuvante a la estimulación ovárica de las cuales se incluyeron 14 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, las cuales tenían un promedio de edad $37.6 \text{ años} \pm 4.426$ con un IMC de 23.15 ± 2.97 .

Se determinó el efecto de la hormona del crecimiento a través de las dosis totales de gonadotropinas que fueron significativamente más altas que cuando no se utilizó hormona del crecimiento en el protocolo con un valor de $P= 0.0340$, los días de estimulación fueron similares en ambos casos ($P=0.0951$), sin embargo el total de ovocitos recuperados fue significativamente más alto cuando se adicionó HG ($P=0.0022$), además el número de ovocitos MII fue significativamente mayor con HG ($P=0.0064$), por último en cuanto al grosor endometrial se observa una diferencia significativa ($P= 0.0382$).

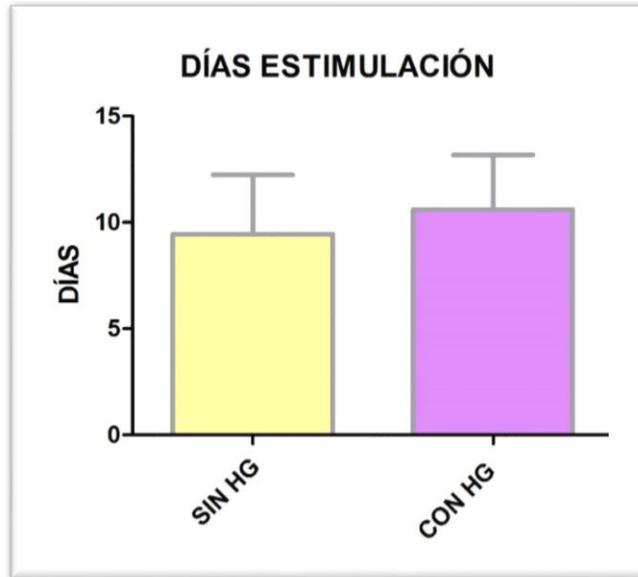
	DOSIS FSH (UI)	DOSIS HMG (UI)	DÍAS ESTIMULACIÓN	# TOTAL OVOCITOS	# TOTAL DE OVOCITOS MII	GROSOR ENDOMETRIAL (mm)
SIN HG	2360±756	1038±763 .5	9.462±2.78	4.154±2.911	3.000±2.4 15	9.000±1.09
CON HG	2925±892 .7	1096±845	10.62±2.567	7.769±3.193	6.000±3.536	10.12±1.917
VALOR P	0.0340	0.3901	0.0951	0.0022	0.0064	0.0382



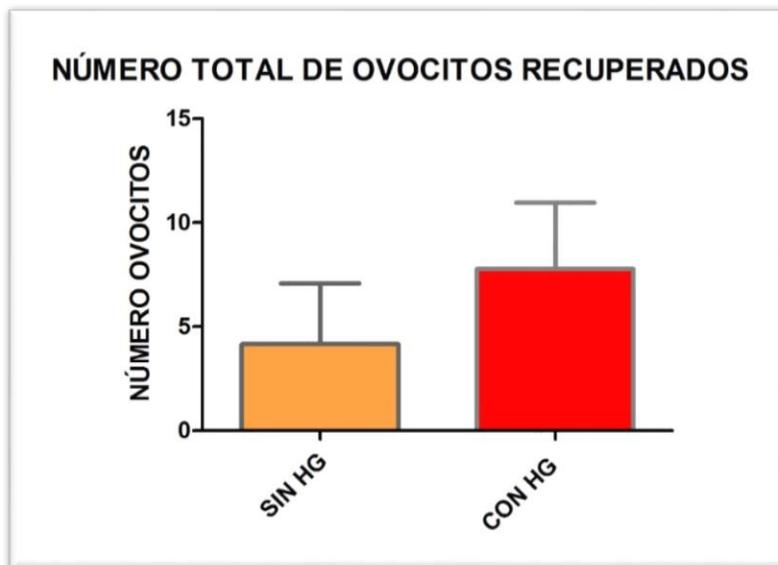
En cuanto a las dosis utilizadas de FSHr se observó la tendencia a aumentar dosis de las mismas en el ciclo que se usó hormona del crecimiento con una estadística significativa $P= 0.0340$, esto se explica ya que en el primer ciclo con el número de ovocitos y las características de las pacientes no hubo la respuesta deseada.



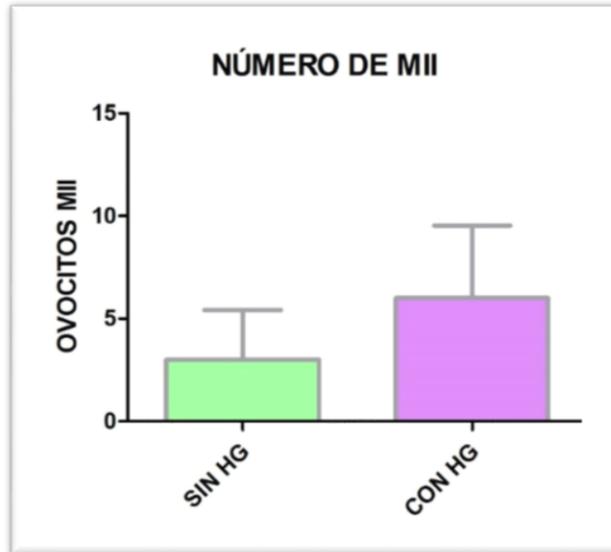
Las dosis de HMG no mostraron significancia estadística con un total de dosis en UI durante el ciclo sin HG de 1038 UI vs 1096 UI en el ciclo que se usó HG con una $P= 0.3901$



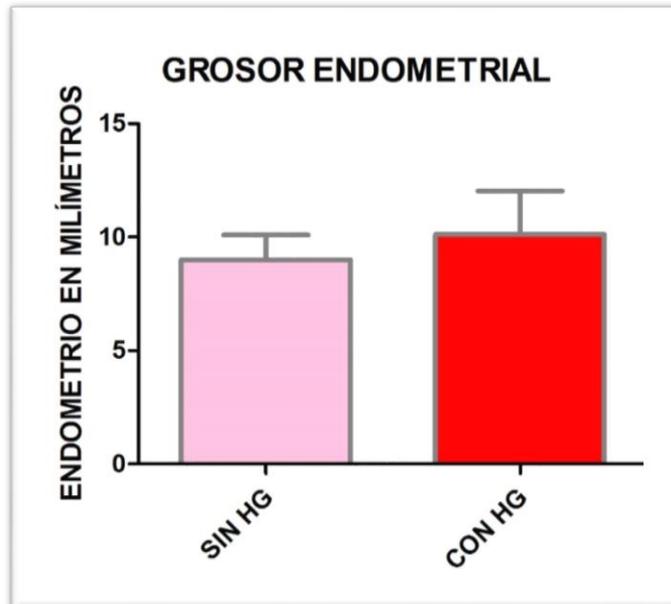
En cuanto a los días de estimulación como se muestra en la tabla número 3, los resultados fueron similares no encontrando significancia estadística en ambos casos ($P=0.0951$), sin embargo los días muestran una ligera tendencia a disminuir con el uso de hormona del crecimiento.



El total de ovocitos recuperados fue significativamente más alto 4.154 sin hormona del crecimiento vs 7.769 en pacientes que se adicionó HG con una significancia estadística ($P=0.0022$), con los cual empezamos a observar las ventajas del uso de la misma en pacientes con baja respuesta ovárica.



El número de ovocitos MII fue mayor con HG 6.000 vs 3.000 sin hormona del crecimiento, es decir casi el doble y esto se traduce con una significancia estadística ($P=0.0064$).



Por último es importante también mencionar que en el ciclo donde se utilizó hormona del crecimiento se observó un grosor endometrial más adecuado a diferencia del ciclo en el que no se realizó uso de la misma, con una diferencia significativa ($P= 0.0382$).

DISCUSIÓN

En este estudio quisimos detectar el efecto de adicionar hormona del crecimiento a protocolo de estimulación de antagonista en 14 bajas respondedoras sometidas a ciclos de FIV/ICSI. Nosotros encontramos que el número total de ovocitos recolectados así como el número de ovocitos metafase II fue significativamente mayor en el ciclo que se adiciono hormona del crecimiento. La información de estudios animales y humanos sugieren que la hormona del crecimiento juega un papel crítico en el proceso de esteroideogénesis ovárica y en el desarrollo de los folículos. Se cree que juega un papel importante en la función ovárica, estimula el desarrollo folicular, la producción estrogénica y la maduración ovocitaria. Esto puede explicar que aunque no hubo una significancia estadística en cuanto a los duración de la estimulación, si se observó una tendencia a la disminución de días en pacientes con adición de HG.

Los resultados en cuanto a ovocitos totales recolectados y por lo tanto mayor número de MII, a pesar de que en este estudio no se tomó en cuenta tasas de fertilización o tasas de embarazo, ya que varias pacientes únicamente vitrificaron óvulos, presentan una importante mejoría.

En cultivo la hormona del crecimiento estimula la esteroidogénesis ya sea directamente o a través del mejoramiento del efecto de la FSH. El efecto positivo de la hormona del crecimiento en el mejoramiento de la maduración nuclear y citoplásmica actuando independientemente de la IGF-I está bien documentado en ratones, vacas y monos. La hormona del crecimiento permite una maduración total en ovocitos humanos.³⁸ El receptor de hormona del crecimiento está presente en las células del cumulo así como en los ovocitos y su señalización puede estar dada por dos caminos mediante el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) o la respuesta del elemento de unión al cAMP (CREB). Estudios evaluando el efecto benéfico del tratamiento co-estimulador de la HG han tenido resultados discordantes^{47, 48} por la variedad de las etiologías como pacientes añosas⁴⁹, pobre respondedoras y pacientes teniendo deficiencia de hormona del crecimiento⁵⁰. El más reciente estudio de Cochrane mostro un efecto positivo de la HG en pacientes pobre respondedoras⁵¹.

La aceleración de la meiosis por la hormona del crecimiento afecta la primera divisiones más que al proceso de fertilización, el ARN mensajero para el receptor de hormona del crecimiento en humanos está presente en el ovocito y en las células del cumulo durante la fase final de la maduración ovocitaria.⁵² Así como también el receptor de HG y su ARN mensajero se encuentran en embriones humanos durante el desarrollo preimplantatorio,

sin embargo hay cierta controversia ya que su acción positiva está limitada a una población especial que tiene que ver con la edad y las pacientes pobre respondedoras^{49,51} Más recientemente se ha propuesto que la suplementación con GH puede mejorar la calidad embrionaria en pacientes con deficiencia de GH.⁵⁰

Mendoza y colaboradores; notaron que la concentración de la hormona del crecimiento en el líquido folicular está asociado con fallas en los tratamientos de reproducción asistida, y es obvio que en algunos pacientes esta concentración pueda estar por debajo de un nivel crítico afectando la función ovárica, especialmente durante las fases tardías de la maduración ovocitaria.

La hormona del crecimiento exógena tiende a corregir ese efecto negativo⁵⁰.

Las fortalezas del estudio fue que las pacientes estudiadas e incluidas fueron su mismo grupo control ya que en primer lugar la paciente se realizó un ciclo de antagonistas sin HG y posteriormente en las mismas condiciones se adiciono la misma, en cuanto a las deficiencias es un grupo pequeño de pacientes y como se menciono antes la heterogeneidad de las definiciones de baja respondedora pudieron tener un sesgo en los resultados por lo cual necesitaría series más largas para confirmar lo que en este estudio se ha demostrado.

CONCLUSIÓN

En la muestra en donde las mismas pacientes con EOC sin HGH funcionan como grupo control, los resultados muestran con HGH una mayor recuperación de ovocitos maduros, menor tasa de cancelación. Se requieren estudios prospectivos controlados y aleatorizados en un mayor número de casos de baja respuesta previa para confirmar esta impresión inicial.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Baird D, Collins J, Egozcue J, Evers L, Gianaroli L, Leridon H et al. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 2005; 11:261-76

² Ubaldi F, Vaiarelli A, D'Anna R, Rienzi L et al. Management of poor responders in IVF: is there anything new? *Biomed Res Int* 2014; 1-10.

³ Yovich JL, Stanger JD; Growth hormone supplementation improves implantation and pregnancy productivity rates for poor-prognosis patients undertaking IVF; *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 21:37– 49.

⁴ Ziegler D, Streuli I, Meldrum DR, Chapron C. The value of growth hormone supplements in ART for poor ovarian responders; *Fertil Steril* 2011; 96: 1069-1076

⁵ Eftekhar M, Aflatoonian A, Mohammadian F, Eftekhar T. Adjuvant growth hormone therapy in antagonist protocol in poor responders undergoing assisted reproductive technology. *Gynecol Obstet* 2013; 287:1017–1021.

⁶ Homburg R, West C, Torresani T, Jacobs H. Cotreatment with human growth hormone and gonadotropins for induction of ovulation: a controlled clinical trial. *Fertil Steril* 1990; 53:254–60.

⁷ Andersen AN, Devroey P, Arce JC. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Hum Reprod* 2006; 21: 3217– 3227

⁸ Barad D, Gleicher N. Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF. *Hum Reprod* 2006; 21: 2845– 2849

⁹ Hazout A, Junca Am, Menezo Y, Demouzon J, Cohen-Bacrie P. Effect of growth hormone on oocyte competence in patients with multiple IVF failures. *Reprod Biomed Online*. 2009; 18: 664–670

¹⁰ Van Blerkom, J. and Henry, G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically-mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum. Reprod* 1992; 7, 379–390

-
- ¹¹ Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011; 26:1616–1624.
- ¹² Raffi F, Metwally M, Amer S. "The impact of excision of ovarian endometrioma on ovarian reserve: a systematic review and meta-analysis," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97(9): 3146–3154.
- ¹³ de Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. "Primary ovarian insufficiency" *The Lancet* 2010; 376 (9744): 911–921.
- ¹⁴ Soto N, Iñiguez G, López P et al. "Anti-Müllerian hormone and inhibin B levels as markers of premature ovarian aging and transition to menopause in type 1 diabetes mellitus," *Human Reproduction* 2009; 24 (11):2838–2844.
- ¹⁵ Chang HH, Chen MJ, Lu MY et al. "Iron overload is associated with low anti-müllerian hormone in women with transfusion-dependent β -thalassaemia," *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2011, 118 (7): 825–831.
- ¹⁶ Hehenkamp WJK, Volkers NA, Broekmans FJM et al. "Loss of ovarian reserve after uterine artery embolization: a randomized comparison with hysterectomy," *Human Reproduction* 2007, 22 (7):1996–2005.
- ¹⁷ Tropeano G, Di Stasi C, Amoroso S, Gualano MR, Bonomo L, Scambia G. "Long-term effects of uterine fibroid embolization on ovarian reserve: a prospective cohort study" *Fertility and Sterility* 2010; 94 (6): 2296–2300.
- ¹⁸ Reproductive Endocrinology and Infertility Committee, Family Physicians Advisory Committee, Maternal-Fetal Medicine Committee, Executive and Council of the Society of Obstetricians, K. Liu, and A. Case, "Advanced reproductive age and fertility," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC* 2011; 33 (11): 1165–1175.
- ¹⁹ Ulug U, Ben-Shlomo I, Turan E, Erden HF, Ali Akman M, Bahceci M. "Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles," *Reproductive BioMedicine Online* 2003; 6 (4): 439–443.
- ²⁰ Zhen XM, Qiao J, Li R, Wang LN, Liu P. "The clinical analysis of poor ovarian response in in-vitro-fertilization embryo-transfer among Chinese couples," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2008; 25 (1):17–22.
- ²¹ Sunkara SK, Tuthill J, Khairy M et al. "Pituitary suppression regimens in poor responders undergoing IVF treatment: a systematic review and meta-analysis," *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15 (5): 539–546.

-
- ²² El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P. “Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve—an eight year study,” *Human Reproduction* 2002; 17 (6):1519–1524.
- ²³ Polyzos NP, Nwoye M, Corona R et al. “Live birth rates in Bologna poor responders treated with ovarian stimulation for IVF/ICSI” *Reproductive BioMedicine Online* 2014; 28 (4): 469–474.
- ²⁴ Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 2009; 30:465–93.
- ²⁵ de Matos DG, Miller K, Scott R et al. Leukemia inhibitory factor induces cumulus expansion in immature human and mouse oocytes and improves mouse two-cell rate and delivery rates when it is present during mouse in vitro oocyte maturation. *Fertility and Sterility* 2008; 90:2367–2375.
- ²⁶ Ptak G, Lopes F, Matsukawa K et al. Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization in vitro via an influence on the oocyte. *Theriogenology* 2006; 65:1891–1899.
- ²⁷ Siemer C, Smiljakovic T, Bhojwani M, Leiding C, Kanitz W, Kubelka M, et al. Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2009; 76:1208–19.
- ²⁸ Kang MK, Han SJ. Post-transcriptional and posttranslational regulation during mouse oocyte maturation. *BMB Rep* 2011; 44:147–57.
- ²⁹ Paulini F, Melo EO. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod Domest Anim* 2011; 46:354–61.
- ³⁰ Fraser HM. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4:18.
- ³¹ Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 2008; 14:143–58.
- ³² Epifano O, Dean J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:169–73.
- ³³ Lee PD, Giudice LC, Conover CA, Powell DR. Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216:319–57.
- ³⁴ Schoyer KD, Liu HC, Witkin S, Rosenwaks Z, Spandorfer SD. Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3) in IVF patients with polycystic ovary syndrome: correlations with outcome. *Fertil Steril* 2007; 88:139–44.

-
- ³⁵ Bahceci M, Ulug U, Turan E, Akman MA. Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 130:93–8.
- ³⁶ Kelly CJ, Stenton SR, Lashen H. Insulin-like growth factor binding protein-1 in PCOS: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011; 17:4–16.
- ³⁷ Pereira GR, Lorenzo PL, Carneiro GF, Ball BA, Goncalves PB, Pegoraro LM, et al. The effect of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of equine oocytes. *Zygote* 2011:1–8.
- ³⁸ Menezo YJ, Nicollet B, Rollet J, Hazout A. Pregnancy and delivery after in vitro maturation of naked ICSI-GV oocytes with GH and transfer of a frozen thawed blastocyst: case report. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23:47–9.
- ³⁹ Thompson BJ, Shang CA, Waters MJ. Identification of genes induced by growth hormone in rat liver using cDNA arrays. *Endocrinology* 2000; 141:4321–4.
- ⁴⁰ Hall VJ, Compton D, Stojkovic P, Nesbitt M, Herbert M, Murdoch A, et al. Developmental competence of human in vitro aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Hum Reprod* 2007; 22:52–62.
- ⁴¹ Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 2011; 78:9–21.
- ⁴² Dailey T, Dale B, Cohen J, Munne S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 1996; 59:176–84.
- ⁴³ Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002; 17:1017–22.
- ⁴⁴ Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 1985; 6:400–20.
- ⁴⁵ Davoren JB, Hsueh JW, Li CH. Somatomedin C augments FSH-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Am J Physiol* 1985; 249:E26–33.
- ⁴⁶ Homburg R, Eshel A, Abdalla HI, Jacobs HS. Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotrophins. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988; 29:113–7.

⁴⁷ Schoolcraft W, Schlenker T, Gee M 1997 improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responders IVF patients with a microdose follicle stimulating hormone flare, growth hormone protocol. *Fertility and Sterility* **67**, 93–97.

⁴⁸ Howles CM, Loumaye E, Germond M *et al.* 1999 Does GH releasing factor assist follicular development in poor responder patients undergoing ovarian stimulation for IVF? *Human Reproduction* **9**,1939–1943.

⁴⁹ Tesarik J, Hazout A, Mendoza C 2005 Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Human Reproduction* **20**, 2536–2541.

⁵⁰ Rajesh H, Yong YY, Zhu M *et al.* 2007 Growth hormone deficiency and supplementation at in-vitro fertilisation. *Singapore Medical Journal* **48**, 514–518.

⁵¹ Harper K, Proctor M, Hughes E 2003 Growth hormone for invitro fertilization. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD000099.

⁵² Ménézo YJ, el Mouatassim S, Chavier M *et al.* 2003 Human oocytes and preimplantation embryos express mRNA for growth hormone receptor. *Zygote* **11**, 293–297.