

Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y
Salud Pública e Inmunología Microbiológica Médica.

**“UTILIDAD DE LA TESTOSTERONA
TRANSDÉRMICA EN LA ESTIMULACIÓN
OVÁRICA DE MUJERES EN TRATAMIENTO
DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA”**

Tesis Doctoral presentada por:

Jenny María Álvarez Nieto

Director de Tesis:

Prof. Dr. Juan Antonio García Velasco

Madrid, 2014



Facultad de Ciencias de la Salud.
Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y
Salud Pública e Inmunología Microbiológica Médica.

D. Juan Antonio García Velasco, Doctor en medicina, Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología del Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e Inmunología Microbiológica Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud, perteneciente a la Universidad Rey Juan Carlos y Director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“UTILIDAD DE LA TESTOSTERONA TRANSDÉRMICA EN LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA DE MUJERES EN TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA”** presentado por Dña. Jenny María Álvarez Nieto, para optar al grado de Doctor por la Universidad Rey Juan Carlos, ha sido realizado bajo mi supervisión. Dicho trabajo reúne todos los requisitos para su presentación y defensa ante un tribunal.

Y para que así conste, expide y firmo la presente certificación en Madrid a 22 de Abril de 2014.

Fdo. Juan Antonio García Velasco.



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, es el resultado del esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de éxito.

A mi director de tesis, el Dr. Juan Antonio García Velasco a quien, desde el momento en el que tuve la suerte de conocerle, ha sido más que un director para mi tesis, es la persona quien, ante mis momentos de crisis, ha sabido decir la frase correcta en el momento más oportuno, quien ha sabido tenerme paciencia. Para mí ha sido un inmenso placer trabajar al lado de tan maravillosa persona, por confiar en mí, por permitirme robarle su tiempo y compartirlo conmigo en este proyecto que finalmente hoy es una realidad.

A Domingo Palacios, quien resultó ser un gran apoyo para mí en los momentos más clave de este trabajo.

A Alfredo Guillén, quien ha sido una pieza muy importante en esta investigación.

A Ricardo Delgado y a Francisco Borox quienes fueron los encargados de darme el soporte técnico y que me demostraron con su profesionalidad y humanidad, las personas especiales que son.

A Alonso Fernández, un gran compañero, él también ha contribuido con su granito de arena a que esta tesis hoy vea la luz.

A Guillermo Villoria, mi esposo, quien ha vivido conmigo días y noches de trabajo intenso, quien me ha ayudado en todo momento, su apoyo incondicional, por el intercambio de puntos de vista, por las discusiones enriquecedoras, por ayudarme a no perder el norte.

Y a mis padres por hacerme de mí la profesional que soy, por enseñarme que con constancia, perseverancia y honestidad, se logran abrir caminos, se llega lejos.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

“La mente que se abre a una nueva idea jamás regresa a su tamaño original”.
Albert Einstein.

RESUMEN.

Introducción: La baja respuesta ovárica es todavía considerada uno de los mayores retos en medicina reproductiva. Se han propuesto varias alternativas de tratamiento, sin la identificación de un tratamiento indiscutiblemente efectivo.

Objetivos. Evaluar si se presentan diferencias en el número de ovocitos en MII en pacientes de baja respuesta a la estimulación ovárica, tras ser sometidas a un tratamiento de androgenización folicular con testosterona transdérmica.

Objetivos específicos:

-Evaluar el número de folículos ≥ 14 mm y de ovocitos en metafase II aspirados el día de la punción.

-Evaluar la tasa de fecundación de estos ovocitos.

-Evaluar la calidad embrionaria en el Día 3.

-Evaluar el número de gestaciones clínicas y recién nacidos vivos.

Métodos. Estudio analítico, observacional de cohorte prospectivo, desarrollado en el **Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)** Madrid. Incluyó a 150 pacientes que fueron sometidas a ciclos de FIV/ICSI, desde Enero del año 2011 hasta Marzo de 2013. Se incluyeron pacientes de >18 y <39 años con IMC: $18-30 \text{ Kg/m}^2$ al momento de la FIV y con 1-2 ciclos previos con baja respuesta. 72/150 pacientes recibieron 2,4 mg/día de **Testosterona** transdérmica por 5 días. 78/150 pacientes no recibieron tratamiento previo con **Testosterona**. Ambos grupos recibieron ciclo de Anticonceptivos orales y tratamientos de reproducción asistida. La *variable primaria* de eficacia fue el número de ovocitos maduros obtenidos. Las *variables secundarias* incluyeron, días de estimulación, número de folículos >14 mm, embriones transferidos y número de embarazos por ciclo. Para la descripción de las variables cualitativas se han utilizado frecuencias absolutas y porcentajes; y en las variables

cualitativas con carácter ordinal se han utilizado, además, frecuencias y porcentajes acumulados. La descripción de las variables cuantitativas se ha realizado mediante media, desviación estándar (D.E.), mediana y cuartiles. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 21 (SPSS, Chicago, IL). Esta tesis ha sido aprobada por la comisión investigación del IVI.

Resultados. En el grupo con parches de **Testosterona**, con respecto a los valores basales, la **FSH** basal tuvo un valor inicial más alto cuando se comparó con el grupo que no empleó parches (12,1 vs 8,8), siendo la diferencia significativa, no siendo así en el caso de la **AMH**, que a pesar de ser menor en el grupo con parches, la diferencia no resultó significativa (1,5 vs 2,2). Sí se encontraron diferencias entre el número de folículos >14 mm (3,7 grupo con parches vs 4,7 grupo sin parches) y entre los embriones del día 3 (1,5 grupo con parche vs 2,2 grupo sin parche), sin embargo no se encontraron diferencias entre el porcentaje de embarazos bioquímicos (79% grupo con parches vs 39.7% grupo sin parches) o el porcentaje de embarazos clínicos (42,1% grupo con parches vs 39,1% grupo sin parches).

Conclusiones. El uso del parche de **Testosterona** en este grupo de pacientes no produjo diferencias significativas en la respuesta de pacientes con baja respuesta ovárica. Ante la estrategia de androgenización folicular, como alternativa para el tratamiento de la baja respuesta ovárica, es importante individualizar cada tratamiento de reproducción asistida según las características y necesidades de nuestras pacientes.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	5
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	14
INTRODUCCIÓN.	15
FOLICULOGÉNESIS	17
1.- <i>HISTORIA:</i>	17
2.- <i>FISIOLOGÍA DEL OVARIO:</i>	18
2.1.- <i>DESARROLLO FOLICULAR:</i>	20
2.2.- <i>RECLUTAMIENTO DEL FOLICULO ANTRAL:</i>	21
2.2.1.- Teoría 1: Reclutamiento continuo.	22
2.2.2- Teoría 2: Episodio único de reclutamiento.	23
2.2.3.- Tercera teoría: Cohorte folicular.	25
SELECCIÓN FOLICULAR	29
1.- <i>Dominancia folicular:</i>	29
2.- <i>Hormona folículoestimulante (FSH):</i>	29
3.- <i>Estradiol:</i>	31
4.- <i>Superfamilia: Factor de crecimiento transformante beta. (TGF-β)</i>	31
5.- <i>Factor de crecimiento ligado a la insulina: (IGF):</i>	34
6.- <i>Hormona Antimülleriana (AMH)</i>	35
7.- <i>Influencia del cuerpo lúteo en la selección folicular:</i>	37
DESARROLLO DEL FOLÍCULO PRE-OVULATORIO.	39
PAPEL DE LOS ANDRÓGENOS Y LA FOLICULOGÉNESIS.	41
1.- <i>EVIDENCIA PRE-CLÍNICA:</i>	41
2.- <i>EVIDENCIA CLÍNICA:</i>	46
BAJA RESPUESTA OVÁRICA	55
1.- <i>DEFINICIÓN:</i>	55

2.- <u>CRITERIOS DE BOLOGNA:</u>	56
3.- <u>PRUEBAS DE RESERVA OVÁRICA</u>	59
4.- <u>BAJA RESPUESTA PREVIA</u>	61
USO DE LOS ANDRÓGENOS COMO TRATAMIENTO DE LA BAJA RESPUESTA OVÁRICA.	65
SITUACIÓN ACTUAL EN EL MANEJO DE LA BAJA RESPUESTA OVÁRICA	71
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	81
<u>OBJETIVOS</u>	83
<u>IMPORTANCIA DE ESTA INVESTIGACIÓN</u>	83
MATERIAL Y MÉTODOS	87
TRATAMIENTOS DE ESTIMULACION.....	90
VARIABLES DE ESTUDIO:.....	93
RESULTADOS	95
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Razones por las cuales los resultados de los estudios publicados sobre la acción de los andrógenos son variables.....	54
Tabla 2: Valores iniciales, basales de los grupos de estudio.....	97
Tabla 3: Comparación de resultados entre todas las pacientes que recibieron tratamiento de estimulación ovárica..	100
Tabla 4: Datos basales descriptivos del grupo con FSH recombinante + hMGhp. .	102
Tabla 5: Datos basales descriptivos de los grupos con Clomifeno + hMGhp al comienzo del estudio.	102
Tabla 6: Comparación de resultados entre los grupos que recibieron FSH recombinante + hMGhp y el uso o no del parche de Testosterona transdérmica. ..	103
Tabla 7: Comparación de resultados entre los grupos que recibieron Clomifeno + hMGhp y el uso o no del parche de Testosterona transdérmica.	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: “Ex ovo omnia”.....	17
Figura 2: Teorías del reclutamiento folicular.....	22
Figura 3: Miembros de la superfamilia TGF-β.....	34
Figura 4: Modelo del papel de la AMH en el ovario.....	36
Figura 5: Relación entre la edad y la Baja respuesta Ovárica.....	57

INTRODUCCIÓN.

FOLICULOGÉNESIS

1.-HISTORIA:

Las primeras descripciones sobre como ocurre la reproducción, provienen de Hipócrates en el Siglo V antes de Cristo, quien aseguró que la generación de la especie ocurría a través de la unión de la eyaculación masculina y la sangre de la menstruación de una mujer (1).

Dos millones de años después, *William Harvey* da origen al término > “**ex ovo omnia**” que significa, “*a partir del huevo, todo*” (Figura 1). Es así como Harvey (1578-1670) describió el papel del ovocito en la reproducción (1). Este descubrimiento terminó con la larga serie de interrogantes científicas acerca de los mecanismos precisos de la reproducción humana.

L



Figura 1: “Ex ovo omnia”.
“A partir del huevo, todo”

William Harvey

Más tarde, en los años 1600, un período que marcaba una gran descubrimiento, *Regnier de Graaf* reconocía que el ovario es el productor del “ovocito” (1). Fue *Karl Ernest von Baer*, en 1827, quién descubrió que el ovocito de mamíferos se encuentra dentro del folículo ovárico (1). No fue hasta el siglo 20 que el ovocito humano fue descubierto, realizándose las primeras descripciones del folículo ovárico humano (1).

Muchos de los conocimientos actuales de la función del ovario en la mujer han sido extrapolaciones de los estudios desarrollados en primates, animales de granja y roedores. Sin embargo los avances en tecnología en los últimos 60 años han desarrollado herramientas no invasivas para la evaluación de la función ovárica en la mujer (1).

2.-FISIOLOGÍA DEL OVARIO:

El ovario es un órgano dinámico. Tanto el crecimiento como la regresión folicular son fenómenos fisiológicos complicados y que han sido de gran interés para los clínicos. El conocimiento actual de la dinámica folicular del ovario esta basada en el uso sinérgico del abordaje histológico, endocrinológico y ecográfico (2).

La ecografía transvaginal de alta resolución es un método muy efectivo para la monitorización del crecimiento folicular ovárico en la mujer (2).

Es posible la identificación de folículos de 2-5mm, por histología o ecografía durante todo el ciclo menstrual humano (3). Así mismo, tradicionalmente, se ha reconocido que, el reclutamiento de folículos antrales ocurre durante la fase folicular (2).

Sin embargo, el patrón de crecimiento y reclutamiento de los folículos ha sido motivo de gran debate en los últimos años (2). En otras palabras, el crecimiento folicular antral puede comenzar en diferentes fases del ciclo menstrual debido al equilibrio de los mecanismos endocrinos y los intra reguladores de ovario (4) que difiere de lo que se pensaba previamente.

La evaluación histológica del ovario aporta una información microscópica precisa a nivel estructural y funcional del crecimiento folicular en un momento en el

tiempo (1). El perfil endocrino sérico aporta información sobre la foliculogénesis de un día o múltiples días durante el ciclo, aunque de forma indirecta (1).

Los modelos conceptuales, para la comprensión de la función ovárica del ciclo menstrual, fueron desarrollados a partir de la información proporcionada por la combinación del uso de técnicas anatómicas y endocrinológicas. Sin embargo, no fue hasta el desarrollo de la ecografía abdominal a finales de 1970 que el conocimiento seriado del crecimiento y regresión de los folículos no se describió (1). La ecografía de alta resolución, usada por primera vez, a finales de 1980, dramáticamente mejoró la habilidad del clínico para visualizar las estructuras ováricas *in situ* (1).

El poder de resolución de la imagen por ecografía convencional es todavía mucho menor que con la histología y las medidas del tamaño folicular (diámetro, volumen) sólo muestran información limitada sobre la función ovárica. Sin embargo las mediciones de flujo de sangre por ecografía doppler (5), y las imágenes asistidas por computadora pueden aportar información importante sobre algunos aspectos fisiológicos de la función ovárica.

El desarrollo folicular ocurre de forma oscilatoria en la mayoría de las especies de animales domésticos y en humanos ya sea durante el ciclo estral, en animales, o el ciclo menstrual, en humanos (2). La disminución, en la fase lútea, del **Estradiol** y la **Inhibina A**, posterior a la regresión del cuerpo lúteo conduce a un aumento transitorio de los niveles séricos de **FSH**, y por lo tanto, el reclutamiento folicular (2). Sin embargo, el hecho de que se produzca una oleada en la fase lútea tardía o en la fase folicular temprana después de la luteólisis, así como si el desarrollo folicular, está limitado por los efectos inhibidores de la **Progesterona** en

la fase lútea, son parte de las interrogantes actuales de las nuevas investigaciones (2).

2.1.-DESARROLLO FOLICULAR:

Las primeras descripciones del desarrollo folicular en la mujer se hicieron usando el modelo histológico de la evaluación de los ovarios postmortem o posterior a una ooforectomía (1). Estos trabajos concluyeron que, la duración de la foliculogénesis humana desde la fase primordial hasta la fase preovulatoria se estima que es de >175 días (6).

El desarrollo folicular comienza en el cuarto mes de la vida fetal. En este momento, las células germinales han migrado desde el fondo de saco endodérmico hacia el anillo gonadal. La ovogonia entra en la primera división meiótica y se convierte en un ovocito primario. Las células somáticas originadas de la gónada primitiva rodean a la ovogonia formando los folículos ováricos rudimentarios (<0.1 mm de diámetro). Los folículos que contienen los ovocitos en *dictioteno* de la *meiosis I* van a conformar la reserva folicular ovárica (RFO), la cual prepara a la mujer para la vida reproductiva para toda su vida (1). El número de folículos que corresponden a la reserva folicular se estima en aproximadamente 7 millones a la semana 20 de la gestación (1). La depleción en la reserva ovárica folicular comienza durante la vida fetal y continúa a lo largo de la vida de mujer (7).

Los mecanismos propios de la progresión del desarrollo de los folículos humanos primordiales desde el reposo hasta el crecimiento no están definidos claramente (1).

La evidencia actual se enfoca en que el destino de cada folículo depende de un delicado balance entre la expresión y acción de los factores que promueven la proliferación celular folicular, el crecimiento y la diferenciación y aquellos que

promueven la apoptosis: algunos folículos primordiales inician el crecimiento mientras otros permanecen inactivos por meses o años. Los folículos preantrales (0.1-0.2 mm) se desarrollan independientemente de la acción de las gonodotropinas.

Durante la pubertad, la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas ocurre por la liberación pulsátil de la hormona folículoestimulante (**FSH**) y la hormona luteinizante (**LH**) lo cual culmina el desarrollo cíclico de los folículos antrales, comienzo de la ovulación y la ciclicidad menstrual (8).

2.2.-RECLUTAMIENTO DEL FOLICULO ANTRAL:

Los folículos antrales de 2-5 mm de diámetro se han detectado tanto histológicamente como por ecografía a lo largo del ciclo menstrual (4). En los últimos años se han llevado a cabo varios trabajos para caracterizar los cambios en el diámetro y número de folículos antrales durante el ciclo menstrual (1).

Algunos investigadores han sugerido que los folículos antrales de 2-5 mm se desarrollan continuamente, mientras otros han propuesto que son cohortes de folículos antrales que se desarrollan de una manera cíclica durante el ciclo menstrual. *Baerwald* y colaboradores, han documentado un nuevo enfoque del desarrollo folicular durante el ciclo menstrual (9). Según *Baerwald*, existen tres teorías que explican el reclutamiento folicular (1) (Figura 2):

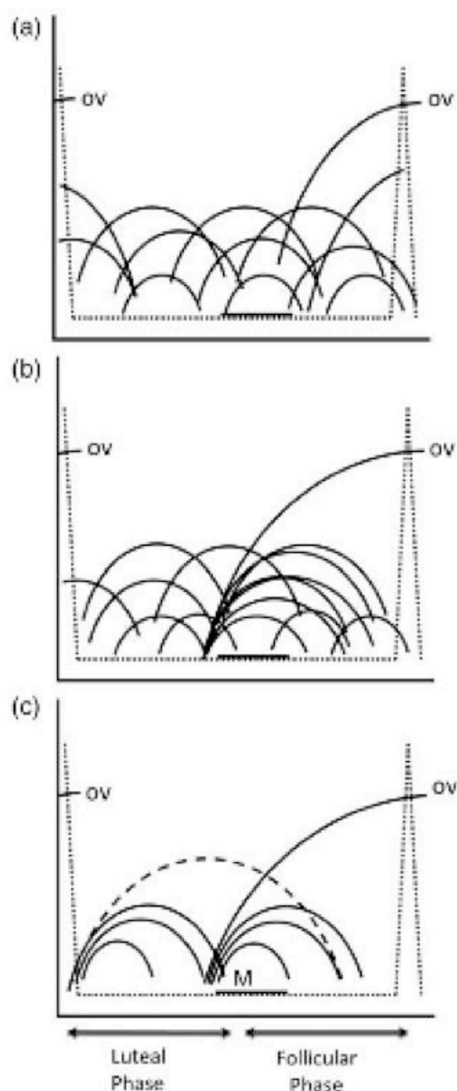


Figura 2: Teorías del reclutamiento folicular. Ilustración esquemática de las tres teorías diferentes de reclutamiento ovárico folicular. (a) Teoría del reclutamiento continuo. (b) Teoría del reclutamiento único. (c) Teoría de la cohorte folicular. M: menstruación. ov: ovulación (1).

Tomado de: Baerwald et al. 2012. Hum

Reprod 73-91.

2.2.1.- Teoría 1: Reclutamiento continuo.

El crecimiento folicular antral, temprano, ocurre continuamente durante el ciclo estral/menstrual. De los estudios en animales, la teoría del reclutamiento folicular continuo, ha evolucionado para el ciclo menstrual. De acuerdo con esta teoría, los folículos antrales $\leq 4-6\text{mm}$ son reclutados y crecen continuamente durante todas las etapas de la vida reproductiva, independientemente de las gonadotropinas. El folículo destinado a ovular es aquel proveniente de una cohorte continua de crecimiento de folículos, por tener el grado de madurez adecuado para responder a la acción de la **FSH**, posterior a la regresión luteal (1).

2.2.2- Teoría 2: Episodio único de reclutamiento.

Los trabajos iniciales con evaluaciones histológicas, endocrinas y por ecografía, han demostrado que una cohorte de folículos de 2-5 mm es reclutada al mismo tiempo de una fuente continua de folículos antrales durante cada ciclo menstrual. El incremento simple en el número de folículos de 2-5 mm detectado después de la regresión del cuerpo lúteo, en la fase lútea o en la fase folicular temprana del ciclo menstrual ha sido identificada como una fase importante del desarrollo folicular. Esta idea de que la cohorte reclutada representa un grupo de folículos, es comparable pero no idéntica a los estadios de desarrollo (10).

Luego de la regresión del cuerpo lúteo, las concentraciones de **Estradiol** y la **Inhibina** disminuyen dando lugar a un aumento de las concentraciones circulantes de **FSH**. El aumento de la **FSH**, a continuación de la luteólisis puede ser responsable de la prevención de la atresia de una cohorte de 2-5 mm de folículos antrales en cada ovario (1, 11). En consecuencia, el conocimiento de la prevención de la atresia, parte del concepto de que el reclutamiento folicular es inducido por el aumento de la **FSH**, con la idea de que cada folículo tiene un umbral de **FSH** por el cual por debajo del mismo no se produce el reclutamiento (1). Así mismo, el reclutamiento de una cohorte folicular (a través de la estimulación del crecimiento o prevención de la atresia) o más bien la selección del folículo dominante sucede en respuesta a una transitoria elevación de la **FSH** circulante (1).

El líquido antral de los folículos de la cohorte reclutada contiene bajas concentraciones de **Estradiol** pero relativamente altas concentraciones de **Andrógenos** (12). La **Inhibina B** producida por las células de la granulosa, en los folículos de la cohorte reclutada, actúa para inhibir la continua secreción de **FSH** durante la mitad de la fase folicular. Las concentraciones de **Inhibina A** son más

bajas durante la fase folicular y máximas durante la fase media lútea sugiriendo que el cuerpo lúteo es la fuente de la **Inhibina A** (1).

Durante a fase lútea del ciclo menstrual en la mujer y en primates no humanos, la producción de **Estradiol** y la **Inhibina A** por el cuerpo lúteo se piensa que suprime el desarrollo de folículos >4mm (13). La mayoría de los folículos antrales observados durante la fase lútea en las mujeres fueron atrésicos, lo que permite concluir que hay un limitado número de folículos antrales sanos que se pueden desarrollar bajo la influencia del cuerpo lúteo. Por otro lado, el desarrollo de folículos sanos en la fase lútea se ha demostrado al aislar el cuerpo lúteo, e incluso, durante la administración de gonadotropinas exógenas (1).

La producción del **Estradiol** y de **Inhibina** por el cuerpo lúteo se pensaba que ocurría únicamente en primates. Sin embargo, el desarrollo de los folículos en la fase lútea y la asimetría en la duración de la fase lútea y folicular, observadas en animales domésticos han sido atribuidos a la ausencia en la producción de **Estradiol** (y posiblemente de **Inhibina**) por el cuerpo lúteo (1).

Recientes estudios de la actividad aromatasa en yeguas han cambiado el conocimiento de que la producción de **Estradiol**, en la fase lútea, solo se produce en los primates (1).

Contrario a lo que los trabajos iniciales relacionados con los hallazgos histológicos y por ecografía que concluían que un simple incremento en el número de folículos de 2-5mm se observan durante la fase lútea tardía o la fase folicular temprana, los resultados de otros trabajos no indicaron cambios claros en el número de folículos antrales a lo largo del ciclo menstrual. En el estudio de *Pache y colaboradores*, se demostró que el número medio de folículos antrales (referido

como recuento de folículos antrales (RFA)) no fue diferente en las fase folicular temprana, fase folicular tardía o fase lútea (4).

En otro trabajo, ante la identificación del número de folículos antrales 2-5 y 2-10 mm no se encontraron diferencias entre la las fases folicular, pre-ovulatoria y lútea (temprana y tardía respectivamente en cada caso). Por otro lado, los incrementos no significativos observables en la media de folículos y folículos antrales en la fase lútea del ciclo menstrual, se han atribuido a diferencias interindividuales, siendo consideradas de poca importancia biológica (14).

2.2.3.- Tercera teoría: Cohorte folicular.

Al conocimiento actual de la existencia de un episodio único de reclutamiento durante el ciclo menstrual de la mujer, se le ha descrito la existencia de múltiples cohortes u olas de folículos reclutados (15). Una cohorte de desarrollo folicular se define como el crecimiento sincronizado de un grupo de folículos antrales que ocurre a intervalos regulares durante el ciclo menstrual, los folículos en cada cohorte son similares pero con diámetros distintos. (1).

Los trabajos iniciales sobre la dinámica folicular humana incluyen la evaluación histológica de los ovarios extirpados (1). Por otro lado, se han descrito hasta dos cohortes de crecimiento folicular >1mm, durante el ciclo menstrual. La primera ola se produce durante la fase folicular y la segunda durante la fase lútea (1), con un incremento del número de folículos antrales >4 mm en las fases folicular y lútea tardía. Sin embargo, los folículos de las fase lútea presentan menor número de células de la granulosa y una producción de **Estradiol** menor comparado con los de la fase folicular (16). Otros trabajos han demostrado la presencia de folículos antrales de 1-10 mm durante la fase lútea (17), siendo la mayoría de los folículos,

atrésicos sin embargo el incremento en el número de folículos antrales no atrésicos >1mm se han descrito en la fase lútea temprana vs la fase lútea media y la folicular tardía (1).

Las olas de desarrollo folicular han sido documentadas en mujeres sanas usando el ecografía transabdominal (18). Se han observado dos cohortes en mujeres con ciclos regulares de 30-35 días comparadas con una ola folicular en mujeres con ciclos de 26 a 30 días. *Baerwald y colaboradores*, en un trabajo en el empleando la ecografía transvaginal seriada así como, mediciones del perfil endocrino, se describe una razón adicional para apoyar la teoría de las cohortes de la foliculogénesis antral en la mujer (9). La documentación de la existencia de una ola mayor y otra menor durante la foliculogénesis, cambia la teoría tradicional de que una simple cohorte de folículos antrales crece sólo durante la fase folicular del ciclo menstrual (15).

Se ha observado la aparición de una cohorte de 4-14 folículos de >4-5mm en dos o tres momentos durante el intervalo interovulatorio (IOI) en una población de estudio grande. La mayoría de las mujeres (68%) presentaron dos olas de reclutamiento folicular durante el IOI, mientras que el resto (32%) presentaron 3 olas. Las mujeres con tres olas foliculares tuvieron una media de IOI de 29 días, la cual fue significativamente mayor que la media de IOI de 27 días en mujeres con 2 olas. En mujeres con dos olas foliculares se evidenció una ola anovulatoria al momento de la ovulación (fase lútea temprana) seguida de la aparición de una ola ovulatoria durante la fase folicular temprana. En las mujeres en quienes se evidenciaron la presencia tres olas, se identificó una ola anovulatoria al momento de la ovulación, la segunda anovulatoria durante la fase lútea media y tardía y la tercera, (ola ovulatoria) se identificó durante la fase folicular media (9).

Este patrón de aparición de 2 olas y patrones de 3 olas del desarrollo folicular ovárico se ha investigado en especies animales, tales como yeguas (19, 20), ganado (20, 21), wapitíes (22), y en sub - primates no humanos (23). Estos trabajos en animales han demostrado recientemente que la duración del IOI puede predecir el patrón de la ola (2 olas o 3 olas) (2), y que este posee una propensión a ser reproducible en seres humanos. Tomando el ciclo estral bovino por ejemplo (24), se ha observado que el patrón de la dos olas fue descrito en el 68 % IOIs y el patrón de la 3 olas en el 32 % IOIs, en el ciclo estral bovino. Los porcentajes anteriores son similares a los observados en humanos (9). También ha sido sorprendente observar que la mayoría (88 %) de IOIs con duración menor de 21 días, se mantenía el patrón de 2 olas, mientras que la mayoría (78 %) de IOIs que duraban más de 22 días fue del patrón de tercera ola. La repetitividad del patrón de oleada y la proporción de dos contra tres patrones de olas dentro de la manada no fueron influenciados por la época del año (24). Estas líneas de investigación sugieren que el patrón de 2 ó 3 olas puede ser repetible casi en cualquier ciclo estral del mismo individuo y se relaciona con la duración del IOI, lo que se relaciona fuertemente con las observaciones hechas en humanos (9, 15).

Por otra parte, los resultados de estos trabajos también han apoyado la hipótesis que el folículo tiene un papel regulador del folículo dominante de la primera ola. A pesar de estos hallazgos, se requieren más investigaciones con muestras de mayor tamaño en mujeres, así como las investigaciones sobre el mecanismo molecular y celular de la concentración de los folículos antrales en este patrón de ola (2).

La **Inhibina B** de las células de la granulosa de la cohorte reclutada inhibe la secreción continua de la **FSH** en la fase folicular media. Un segundo pico corto en la

Inhibina B se ha descrito 2 días después del pico de la **LH** en la mitad del ciclo, con la evidencia de un crecimiento folicular en la fase lútea. Sin embargo, el papel que juega la **Inhibina A**, **Inhibina B** y la **AMH** en regular el crecimiento folicular en la mujer, aún no ha sido explicado en su totalidad (1).

SELECCIÓN FOLICULAR

La selección folicular es el proceso por el cual un folículo dominante es elegido para ser reclutado de la cohorte para su crecimiento preferencial. La selección folicular ha sido generalmente descrita en la fase temprana a media folicular del ciclo menstrual con la consiguiente ovulación (4).

1.-Dominancia folicular:

La ablación del folículo dominante en monos y mujeres (25) ha demostrado que causa un retraso en el aumento pre ovulatorio de las gonadotropinas y la ovulación por dos semanas. Este retraso se debe a que en el momento de la cauterización para la ablación, el folículo dominante ya había sido seleccionado y que el resto de los folículos se encontraban evolucionando hacia la atresia (1). El retraso refleja el período de tiempo requerido por un nuevo grupo de folículos a ser reclutados, fuera del cual otro folículo dominante es seleccionado y ovulado. Estudios similares de ablación en ganado han demostrado que el folículo dominante suprime el crecimiento del resto de los folículos en la misma ola quedando suprimida la aparición de la siguiente cohorte folicular a través de un efecto inhibitor en la circulación de las concentraciones de **FSH** circulantes. Estos hallazgos en animales y en humanos apoyan la idea de que, el folículo dominante ejerce su acción morfológica y funcional una vez ocurrida la selección (1).

2.-Hormona folículoestimulante (FSH):

Es bien conocido que el incremento de las concentraciones circulantes de **FSH** es necesaria para el reclutamiento de una nueva cohorte folicular y la naturaleza del descenso post-aumento en la **FSH** es un factor crítico en la selección

del folículo dominante (1, 15). La duración del aumento en la **FSH** sobre el umbral crítico, determina el número de folículos dominantes seleccionados desde una cohorte para el crecimiento preferencial de un folículo. Este concepto ha sido denominado el “Concepto **FSH** umbral/ventana” (26). La duración de la elevación de la **FSH** por encima del umbral es corta para el desarrollo de un folículo dominante simple. En contraste, la ampliación de la ventana de la **FSH** permite que múltiples folículos sean seleccionados al mismo tiempo, como puede suceder en la especie poliovulatorias, tal es el caso de animales, así como durante la terapia de estimulación ovárica (26).

Hay evidencia en mujeres y animales domésticos de que el folículo dominante tiene un tamaño inicial, favorable para el crecimiento, sobre los demás folículos. El futuro folículo dominante probablemente tenga más células de la granulosa y más cantidad de receptores de **FSH**, permitiendo que sea más sensible a ésta comparado con los otros folículos no dominantes. Los folículos no dominantes, no son capaces de desarrollarse en una ambiente de descenso de la FSH y por lo tanto progresan hacia la atresia (15).

La selección folicular se ha descrito como un fenómeno que evita la atresia. Los folículos más pequeños en la cohorte son los menos capaces de competir para la disminución de los niveles de **FSH** y por lo tanto progresan hacia la atresia primero, seguido por regresión de los folículos progresivamente más grandes en la ola hasta que finalmente, sólo un folículo dominante sobrevive y continua su desarrollo (27).

3.-Estradiol:

En el día 5-8 del ciclo menstrual, la actividad aromatasa comienza en las células de la granulosa de los folículos de 6-8 mm, y con un folículo dominante que produce más 17- β -estradiol que otros folículos en la cohorte. El líquido folicular de los folículos dominantes contiene más estrógenos y menos andrógenos mientras que los folículos destinados a la atresia presentan una cantidad mayor de Andrógenos/Estrógenos. La producción de andrógenos inducida por la **LH**, en las células tecales, provee el sustrato para la producción de **Estradiol** en las células de la granulosa. El 17- β -estradiol producido por los folículos dominantes, es producto de la retroalimentación negativa a nivel hipofisario de la secreción de **FSH**, lo cual contribuye, en parte, a que durante la fase folicular disminuya los niveles de **FSH** y la inhibición del crecimiento de los folículos no dominantes. Los receptores de **LH** se forman en la superficie de las células de la granulosa del folículo dominante siguiendo a la secreción del **Estradiol** (28).

El folículo dominante por lo tanto se vuelve menos dependiente de la **FSH** y mas sensible a la **LH** durante el proceso de selección. La mayor producción de **Estradiol** y el cambio de sensibilidad de la **FSH** a la **LH** en el folículo dominante en la mujer también se ha confirmado con los resultados observados en vacas (1).

4.-Superfamilia: Factor de crecimiento transformante beta. (TGF- β)

Existe una comunicación bidireccional entre el ovocito y el cúmulo oóforo, y sus células regulan tanto la foliculogénesis como la ovogénesis (29). El ovocito y los factores derivados del folículo tienen un papel, dependiendo del estadio, en regular el crecimiento folicular antral. Forman parte de la superfamilia de factores del crecimiento: **Inhibina**, **Activina**, **Folistatina**, **TGF- β** , proteína morfogénica ósea

(**PMO**), factor de diferenciación de crecimiento y **AMH**. Son la mayoría de los factores de crecimiento que ejercen su acción a través de mecanismos de acción vía paracrina o autocrina para regular el crecimiento folicular y la maduración del ovocito.

Todos los folículos de la cohorte folicular, producen **Inhibina B**, la cual contribuye al descenso en la **FSH** que ocurre previo a la selección (30). Sin embargo el rol de la **Activina** en la selección del folículo dominante en la mujer no está bien claro.

La **Activina B** es producida por la hipófisis anterior y estimula la producción de **FSH** en los gonadotropos por mecanismos apocrinos/paracrinos (1, 31).

Se ha demostrado que la **Activina A** causa un efecto inhibitorio dosis-dependiente en la producción, inducida por la **LH**, de **Progesterona**, y **Oxitocina** en células de la granulosa bovina (in vitro), concluyéndose que la **Activina A** inhibe la luteinización espontánea en folículos maduros antrales (32). La **Inhibina A** de las células de la granulosa de folículos antrales en roedores, animales domésticos y humanos incrementan la producción de andrógenos en la teca inducida por **LH**, lo cual se ha pensado sirve de sustrato para la producción de **Estradiol** en el folículo dominante. A diferencia de la **Inhibina A**, ocurre un pico de **Inhibina B** en el líquido folicular en folículos de 9-10 mm en mujeres (33).

Por lo tanto, se ha propuesto que la transición ordenada de un ambiente folicular **Inhibina B/Activina** a un ambiente folicular **Inhibina A/Folistatina** es crítica para el desarrollo del folículo dominante en la mujer. La **Inhibina** y la **Activina** regulan la selección folicular en animales domésticos, sin embargo se han descrito diferencias especie-específica en la isoformas involucradas (34).

Los niveles de la **AMH** intrafolicular disminuyen gradualmente durante el crecimiento folicular hasta 8-10 mm (tiempo aproximado de la selección), disminuyendo drásticamente y permaneciendo baja a partir de entonces (33). La disminución de la concentración de **AMH** intrafolicular durante la selección del folículo ovulatorio sucede en asociación con un aumento de la expresión de la aromatasa en las células de la granulosa (1); describiéndose también niveles más altos de **AMH** en el cúmulo oóforo versus los niveles descritos en las células de la granulosa (35). Es posible que la disminución de la **AMH** cercano al momento de la selección pueda permitir la expresión de la aromatasa, sin embargo el papel específico de la **AMH** en la selección del folículo dominante no es del todo conocido (1).

Un trabajo inicial llevado a cabo en roedores ha comunicado que la **Activina** y **BMP-6** de las células de la granulosa actúan por mecanismos de control autocrino/paracrino mientras las moléculas derivadas del ovocito **GDF-9**, **BMP-15**, **BMP-6** actúan vía paracrina para promover la proliferación de las células de la granulosa y modular la **FSH** dependiente de la función folicular (36). Esto sugiere que, la exposición diferencial de estas moléculas señalan que puede ser una de las vías por la cual el folículo dominante se sensibilice a la **FSH** y así de este modo, ser seleccionado para el crecimiento folicular (1) (Figura 3).

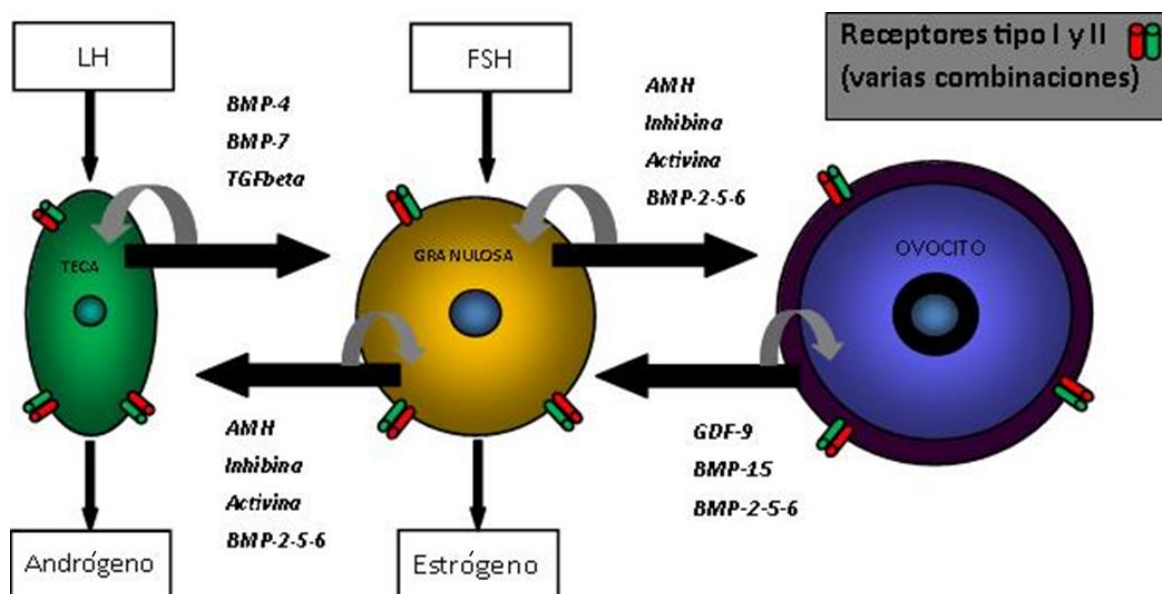


Figura 3: Miembros de la superfamilia TGF- β . Figura representativa de los miembros de la superfamilia TGF- β y los ligandos extracelulares implicados en la comunicación bidireccional entre las células de la teca, granulosa y el ovocito. Control paracrina (flechas negras) o autocrino (flecha gris) dependen de la expresión de las combinaciones apropiadas de los receptores tipo I y tipo II en la superficie celular (36).

Tomado de: Knight P, et al. *Reproduction*. 2006.132 101-206.

5.-Factor de crecimiento ligado a la insulina: (IGF):

El **IGF** juega un papel importante en la regulación ovárica del desarrollo folicular antral. Los niveles circulantes de IGF-I y IGF-II no han mostrado ser diferentes durante el ciclo menstrual humano (37). Sin embargo, se han descrito cambios en el líquido folicular de **IGF** (38). Se ha demostrado, *in vitro*, efectos sobre la función folicular, tanto del **IGF-I** como del **II**, sin embargo, el **IGF-II** parece ser el **IGF** principal en los ovarios de primates. Por otro lado, se ha identificado el ARNm del **IGF-I** y **II** en las células tecales de los folículos antrales pequeños, pero sólo el

ARNm del **IGF II** se ha identificado en las células de la granulosa de los folículos dominantes (39).

El **IGF-II** se incrementa, en el folículo dominante, al momento de la selección. Simultáneamente su biodisponibilidad se incrementa vía proteólisis del factor de crecimiento similar a la insulina unido a la proteína 4 (**IGFBP-4**) por la proteasa **IGFBP-4**. La **IGF II** (y también la **IGF-I**) estimula la actividad aromatasa, producción de **Estradiol** y **Progesterona** en las células de la granulosa y promueve la producción de andrógenos en las células de la teca del folículo dominante en crecimiento. En los folículos no dominantes, el **IGF** es sustituido por la **IGFBP-4** y la esteroidogénesis de las células tecales y de la granulosa se inhibe comenzando la atresia (40-42). El rol del **IGF-I** y **II** en la regulación del desarrollo del folículo antral en la mujer es similar al descrito en los roedores y animales de especies domésticas. Hay además evidencia en roedores que sugieren que la **Activina** folicular, **GDF-9**, **AMH** y **BMPs** puede regular la selección del folículo dominante a través de la modulación de los pasos señalados dependiente de **IGF** en las células (36).

6.-Hormona Antimülleriana (AMH)

La hormona antimülleriana (**AMH**) es producida por las células de la granulosa en los folículos primario, secundario, pre-antral y antral temprano (<4 mm). La **AMH** inhibe la iniciación del crecimiento del folículo primordial de la reserva ovárica. Aunque no está del todo comprendido, la **AMH** puede jugar un papel importante en la regulación del reclutamiento de la cohorte de los folículos antrales (43, 44). Se expresa inmediatamente después del reclutamiento y cesa su función folicular, una vez que los folículos han sido seleccionados para la ovulación. Se han diseñado investigaciones para describir la dinámica folicular y el rol de la **AMH** en ratones mutados para la **AMH** (AMH-null mice). En los ovarios de estos ratones de 4

meses de edad se encontraron el triple de folículos en crecimiento que en los ratones que contenían **AMH** (wildtype mice) acompañado de una disminución de la cohorte de folículos primordiales (45). El aumento del número de los folículos en crecimiento había comenzado ya a los 25 días post-natales, previo al comienzo del ciclo estrogénico. Este aumento del reclutamiento provocó luego de unos meses, a los 13 meses de edad, un agotamiento prematuro de la cohorte de folículos primordiales. Tomando como referencia de ovulación y la presencia del cuerpo lúteo, se comprobó que el 56% de los AMH-null mice habían dejado de ovular a los 16-17 meses de edad, mientras que el 82% de los wild-type mice continuaban ovulando.

Estos resultados demuestran que la **AMH** tendría un efecto inhibitorio en el reclutamiento folicular y que en ausencia de ésta, la tasa de reclutamiento se produce en forma más acelerada. Basado en los bajos niveles de **FSH** en los AMH-null mice, en comparación a los niveles de **FSH** encontrados en los wild-type mice, y el gran número de folículos en crecimiento, se puede decir que en ausencia de la **AMH** los folículos son más sensibles a la **FSH** (46) (Figura 6).

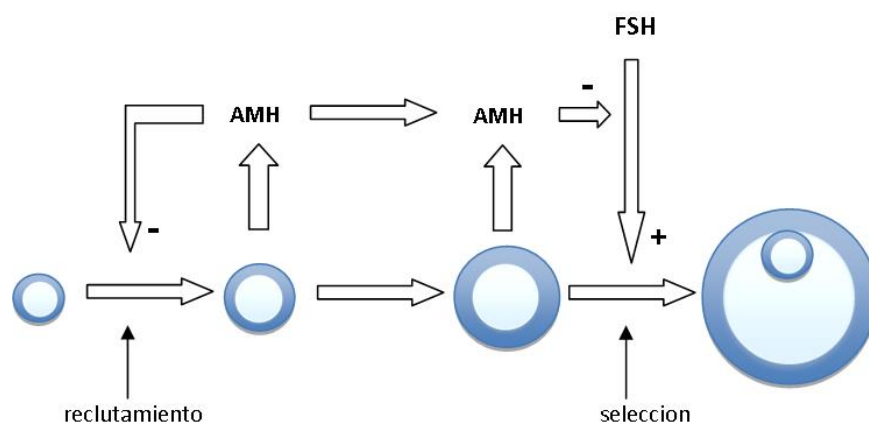


Figura 4: Modelo del papel de la AMH en el ovario. La foliculogénesis está representada por las flechas entre los folículos primordiales, preantral, antral y el folículo seleccionado, respectivamente. El Reclutamiento y la selección esta representada por las flechas discontinuas. La **AMH** es producida por los folículos en crecimiento y tiene un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento folicular y sobre la selección dependiente de **FSH** (44).

Tomado de: Themmen A. *Journal of the National Cancer Institute Monographs.* 2005 (34):18-21.

7.-Influencia del cuerpo lúteo en la selección folicular:

Se han realizado diferentes trabajos para determinar si la presencia del cuerpo lúteo (CL) puede influir en la selección del folículo dominante. Se ha descrito el desarrollo de 7 de los 8 folículos dominantes en el ovario contralateral a la ubicación del cuerpo lúteo previo a la ovulación en la mujer (47). Los folículos dominantes, los que se desarrollaron en el ovario contralateral, previo a la ovulación han mostrado tasas de **Estradiol/Androstenediona** mayores que el folículo dominante, desarrollado ipsilateralmente al cuerpo lúteo previo (48). Por otro lado, las tasas de embarazo en ciclos naturales de inseminación o FIV fueron más altas cuando el folículo ovulatorio se desarrolló contralateral al cuerpo lúteo de la ovulación previa (48). Las observaciones de la ovulación tanto en mujeres fértiles como infértiles, apoyan la teoría, de que la selección del folículo y la ovulación ocurre de forma aleatoria entre el ovario derecho y el izquierdo (15).

Tal como se ha mencionado anteriormente, la selección del folículo dominante tiene lugar en la fase folicular temprana del ciclo menstrual (49). Sin embargo la selección ha sido evidenciada más de una vez durante el ciclo menstrual normal en algunas mujeres sanas (15).

Se han descrito el desarrollo mayor y menor de cohortes de folículos en mujeres sanas en edad reproductiva (19). Una cohorte mayor de crecimiento es aquella en la cual un folículo dominante es seleccionado y una cohorte menor aquella en la cual la dominancia no se manifestó. La mayoría de las mujeres desarrollan una cohorte ovulatoria mayor en la fase folicular y 1 ó 2 cohortes anovulatorias, precediendo a la fase lútea. Sin embargo, 1 ó 2 folículos dominantes

pueden crecer pero, de igual manera, involucionar de forma previa a la selección del folículo en aproximadamente un cuarto de los ciclos menstruales naturales (15).

No se encontraron diferencias entre el tamaño y la duración del cuerpo lúteo, secreción de **Progesterona** o secreción de **Estradiol** en la fase lútea en mujeres con dos vs tres cohortes o en mujeres con cohortes mayores vs los casos de menor número de cohortes precediendo la ovulatoria (50). Sin embargo la presencia del cuerpo lúteo parece influenciar la selección folicular en la mujer con tres cohortes. Cuando se produce el crecimiento en la segunda de las tres cohortes en la mitad de la fase lútea, la selección de un folículo dominante no ocurre (por ejemplo: cuando una cohorte menor, anovulatoria se desarrolla). En comparación, si se produce el crecimiento de una segunda cohorte durante la fase lútea tardía o fase folicular temprana, se produce la selección de un folículo dominante (15).

El estadio funcional del folículo dominante que se desarrolla durante las cohortes anovulatorias precediendo la ovulatoria en mujeres no está del todo clara. Se ha demostrado que los niveles de **Estradiol** se incrementan en asociación con el desarrollo de cohortes de folículos anovulatorios durante la fase lútea tardía o temprana folicular, sin embargo la fuente de **Estradiol** no se conoce. En un trabajo previo, no se encontraron diferencias en las concentraciones de **Estradiol** circulante observadas en la fase lútea en mujeres con cohortes anovulatorias mayores versus las cohortes de crecimiento menores (51).

DESARROLLO DEL FOLÍCULO PRE-OVULATORIO.

El folículo dominante en la fase folicular final, continúa su desarrollo después de que es seleccionado y alcanza el estadio pre-ovulatorio de 16-29 mm en la fase folicular tardía (4, 15). Este folículo crece a 1-4 mm/día, observándose durante este tiempo, incrementos, descenso o no cambios en el ritmo de crecimiento previos al momento de la ovulación (52).

El folículo ovulatorio dominante crece ligeramente más rápido después de la selección comparado con la fase pre-ovulatoria (52).

El crecimiento preferencial del folículo dominante que ocurre a la mitad de la fase folicular se asocia con el incremento de la actividad aromatasa y una rápida elevación del 17- β -estradiol circulante y folicular (9, 47). La mayor respuesta a las gonadotropinas en el folículo dominante, comparado con los folículos no dominantes, es responsable, por mediación de la producción de **Estradiol**, de las células de la granulosa del folículo dominante, expresión del receptor de **LH** y continuo crecimiento preovulatorio (53).

El folículo dominante es responsable del 90% de la producción de estrógenos en el período preovulatorio (52).

Factores como, los intraováricos y endocrinos contribuyen al crecimiento folicular. El incremento de la expresión del ARNm de la aromatasa en las células de la granulosa en el folículo dominante pre-ovulatorio, está inversamente relacionado a las concentraciones de **AMH** en el líquido folicular (54). El incremento de los niveles de **Inhibina A** estimulan la producción de andrógenos por la células tecaes, lo cual actúa de sustrato para la continua secreción de estrógenos. El ARNm del **IGF-II** es expresado en grandes cantidades por las células de la granulosa de los folículos

preovulatorios y estimula la actividad aromatasa (55). El **GDF-9** derivado del ovocito y la **BMP-15** es necesaria para el desarrollo del folículo en el estadio ovulatorio y la **BMP-15** puede estar involucrada en la expansión del cúmulo ooforo (56).

PAPEL DE LOS ANDRÓGENOS Y LA FOLICULOGÉNESIS.

1.-EVIDENCIA PRE-CLÍNICA:

Las células de la teca aportan los andrógenos requeridos para el desarrollo folicular. Posteriormente son convertidos en las células de la granulosa por acción de la **P450** aromatasa en estrógenos, **Estrona** y **17- β -estradiol** (57). Los andrógenos, a través de la aromatasa, pueden ejercer su acción a través de los receptores de estrógenos.

En los estadios de la foliculogénesis dependiente de las gonadotropinas, la producción de andrógenos es controlada por la **LH** (58). In vitro, en cultivos de células de la teca, la producción de andrógenos se produce con bajos niveles de estimulación por la **LH**, pero por encima de los niveles altos de **LH**, la producción de **Androstenediona** (ASD) se inhibe y la secreción de progesterona es estimulada, dando lugar a la luteinización de las células de la teca (59).

Los andrógenos afectan la maduración folicular desde fases muy tempranas: en folículos bovinos. *Yang y Fortune* reportaron que la **Testosterona** estimula la transición entre el folículo primario y el secundario (60). Desde el punto de vista clínico, es relevante conocer que en los roedores y primates el ARNm del receptor de andrógenos y la proteína del RA se encuentran en una mayor concentración en los ovarios que contienen la mayor cantidad de folículos preantrales y folículos antrales iniciales. Estos decrecen luego con el avance de la maduración folicular, sugiriendo una importancia primaria para los andrógenos sobre todo en los estadios iniciales de la maduración folicular (61).

Belgorosky y colaboradores, demostraron que la **DHEA** en los ratones incrementa la tasa de crecimiento de los folículos primarios. También incrementa el

estrés oxidativo y disminuye el número de células ováricas viables mientras incrementan las células apoptóticas tempranas (62).

Varios trabajos apoyan el sinergismo directo entre los andrógenos y las gonadotropinas en el ovario. *Li y colaboradores* han revisado este sinergismo en algún grado para formular una nueva hipótesis, que proponía que durante la evolución de la expresión del Receptor de Andrógenos (RA), suceden de forma progresiva, cambios entre los ovocitos en las células de la teca, o pueden desaparecer estos receptores en los ovocitos, eliminando en los ovocitos de los mamíferos el paso no genómico de los andrógenos, a diferencia de las células somáticas, por lo tanto, reemplazan la función de los andrógenos y de los RA en promover el desarrollo meiótico con gonadotropinas (63).

Sin embargo, mientras los efectos de los andrógenos, en la maduración de los folículos en seres humanos aún continua siendo controvertidos, debido a que no existen investigaciones directas en humanos, los experimentos en roedores, demuestran fuertemente una función esencial de los andrógenos mediados por el receptor de andrógenos (RA) sobre las células de la granulosa, especialmente en estadios tempranos de la maduración de los folículos hasta los estadios preantrales (64).

Por otro lado, los andrógenos, por un largo tiempo se han sido considerado negativos para la maduración folicular normal, (64) y se han encontrado similitudes en la expresión del receptor en folículos de ratones y humanos, sin embargo el crecimiento folicular en humanos puede ser más andrógeno dependiente en humanos que en los ratones (64).

Los andrógenos también ejercen efectos inmunes con significancia sobre la función ovárica. *Shi y colaboradores*, describieron, en un modelo de ratones que los

glucocorticoides y los andrógenos mejoran por igual la falla ovárica prematura (FOP) (65). Ante la teoría de que en mujeres con diagnóstico de infertilidad, la autoinmunidad parece estar incrementada, se piensa que los andrógenos pueden también afectar de forma beneficiosa la función ovárica al servir como antagonistas en el caso de la predisposición autoinmune (66), la cual con bastante frecuencia, dirige su acción en contra del ovario (67).

Los hallazgos de *Hossein Rasdhihi y colaboradores* (68) y, últimamente por ensayos preclínicos en animales con ratones (69, 70) concluyen que, la deficiencia de andrógenos, así como el exceso de los mismos, podrían considerarse causa de infertilidad. (71)

Lutz y colaboradores, reportaron que sólo la **Testosterona** y la **ASD** potencialmente inducen la maduración del ovocito en ranas (*Xenopus*), mientras que la **DHT** actualmente inhibe la maduración y señalización inducida por la **hCG** (72). Cualquiera de los andrógenos induce la activación del ligando del RA. Todos potencialmente modulan la actividad de la **FSH** en el desarrollo de las células de la granulosa, y sirven como un importante modulador de la diferenciación de las células de la granulosa y la maduración folicular, especialmente durante la fase dependiente de la **FSH** en los estadios antrales tempranos (69).

Pero, así como se mencionó más arriba, todavía existen trabajos en ratón que enfatizan los efectos negativos de los andrógenos sobre la capacidad meiótica del ovocito a ciertas concentraciones (73), en la actualidad, las nuevas investigaciones se basan en el estudio del receptor de andrógenos (RA) en ratones, lo cual, es más complejo y potencialmente podría reflejar la relevancia práctica del uso terapéutico de los andrógenos en la inducción de la ovulación en humanos (74).

Las interacciones entre el activador del ligando del RA y la **FSH** puede ser vista como una forma de retroalimentación sinérgica desde las células de la granulosa como respuesta a la **FSH** en los estadios de desarrollo y con cambios en el metabolismo de los andrógenos. Esto puede deberse a, cambios en la expresión de las enzimas esteroideogénicas p450scc, p450arom y la 5- α -reductasa, determinando sucesivamente el tipo de andrógeno y la distribución relativa de los tres principales andrógenos en los folículos (69). Estos andrógenos, pueden afectar el desarrollo de los folículos en el genoma (RA) y por vía no genómica (difusión, etc.) y clínicamente se pueden evidenciar efectos sinérgicos de los andrógenos y la **FSH** en estos estadios de la maduración folicular.

En los modelos animales, *Yang y colaboradores* (75) han sugerido una relación causal entre el hiperandrogenismo y el SOPQ. Estos investigadores trataron de describir los mecanismos moleculares del exceso de andrógenos en un modelo de ratón con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ). Los cultivos de ovarios de ratón con **T**, principalmente contenían folículos primordiales, ellos demostraron incrementos en los folículos primarios vía fosfatidilinositol-3-quinasa/Akt, y demostraron además que los andrógenos inducen en la proteína Forkhead box (Foxo-3a) la activación y translocación de la proteína Foxo3a desde el núcleo del ovocito al citoplasma, como un paso previo en la activación de los folículos primordiales. Esta **Testosterona** puede, en efecto, mejorar el SOPQ y el reclutamiento folicular (76).

La **Testosterona** puede, sin embargo, también ser capaz de reducir la expresión del factor 9 de crecimiento y diferenciación a través de su receptor, en modelos de ratones, inducir la detención del desarrollo folicular (75). La **T** en este modelo, parece ser capaz de aumentar el reclutamiento del resto de los folículos

primordiales pero también, paradójicamente contribuye a detener el desarrollo folicular.

Las conclusiones obtenidas de la investigaciones de modelos animales con SOPQ, hasta el momento, pueden aportarnos dos afirmaciones fundamentales y de relevancia clínica, por lo que se puede decir que los andrógenos:

- Pueden favorecer el reclutamiento folicular
- Potencialmente pueden tener tanto efectos positivos como negativos sobre la maduración folicular, por lo que no sólo presentan efectos negativos como se creía hasta ahora (74).

El argumento de que los andrógenos pueden inducir a la atresia folicular, provenientes de los modelos de estudio en ratones, hace difícil considerar el hecho de que, en los casos de mujeres con hiperandrogenismo, se puede evidenciar una mayor cantidad de folículos en desarrollo que en mujeres con ciclo menstrual normal. Por ello, en el trabajo de *Vendola y colaboradores*, para evaluar los efectos de los andrógenos sobre el crecimiento folicular y el desarrollo de los mismos, se trataron con implantes de placebo, **Testosterona** o **Dihidrotestosterona** a “*monas Rhesus*”, y luego de los 3 a 10 días de tratamiento se realizaron cortes histológicos de los ovarios tras la extirpación de los mismos. Se evidenció un incremento significativo en el número de folículos mayores de 1mm. Por otro lado, la atresia folicular no se vio incrementada en los grupos tratados con Testosterona. Estos hallazgos permiten concluir que en un corto tiempo, al menos, los andrógenos no inducen la atresia folicular, mejorando el crecimiento folicular en los primates (77).

Se llevó a cabo un ensayo preclínico en “*monas Rhesus*”, que tuvo como objetivo evaluar las potenciales interacciones entre la **FSH** y los andrógenos en el desarrollo folicular. Para ello se estudiaron un grupo de monas a quienes se le

trataron con **Testosterona**, a un grupo, otro recibió **FSH** y otro grupo sin tratamiento. El objetivo fue la identificación de la localización de los RA y receptores de **FSH** así como los ARNm en los folículos en crecimiento. La evaluación histológica de los ovarios, tras la extirpación de los mismos mostró, en el grupo de tratamiento con andrógenos un incremento significativo de los receptores de **FSH** en aproximadamente un 50 a 100% dependiendo del tamaño folicular. Sin embargo en el grupo que recibió el tratamiento con **FSH** los niveles del ARNm para el RA sólo experimentó una elevación en los folículos primarios. El hallazgo de que la **Testosterona** aumenta la expresión folicular de los receptores de **FSH** y que los andrógenos promueven el crecimiento folicular y la biosíntesis de los estrógenos indirectamente, por amplificación del efecto de la **FHS**, puede parcialmente explicar la respuesta mejorada a la estimulación con gonadotropinas a las mujeres con ovario poliquístico (78).

2.-EVIDENCIA CLÍNICA:

Tal como se comentó anteriormente, los andrógenos han sido considerados por mucho tiempo, desde el punto de vista clínico, poco favorables para el desarrollo folicular. Así ha sido demostrado en modelos animales, y esta teoría ha sido sustentada por el hecho de que el hiperandrogenismo observado en los muchos clásicos síndromes de ovario poliquístico, asociados con anovulación y calidad del ovocito inferior en la FIV (79). Sin embargo el hiperandrogenismo asociado al SOPQ representa un buen punto de inicio para la revisión de los datos en humanos (74).

Tal conclusión también se demuestra por la evidencia clínica: la suplementación con dehidroepiandrosterona (**DHEA**) en la mujer con reserva ovárica

funcionalmente disminuida (ROFD) aumenta los resultados posteriores a la FIV y las probabilidades de embarazo en general (80).

La **DHEA** ha sido empleada para inducir fenotipos de Síndrome de Ovario Poliquístico (SOPQ) en ratas y ratones (64). Las observaciones de estos estudios permiten concluir que la **DHEA** afecta de forma beneficiosa y eficaz a la reserva ovárica funcional (ROF), calidad del embrión y promedio de probabilidades de embarazo en mujeres con ROD (81).

La **DHEA** en la mujer se convierte a **Testosterona** y en menor grado a **Estradiol** (82). Esta hormona, puede afectar el proceso a través de los receptores de andrógenos o los receptores de estrógenos (64).

La suplementación con **DHEA** con un mínimo de 6 semanas al menos, es suficiente para poder observar los efectos beneficiosos (81, 83) que comprueban el efecto de la **DHEA** durante los estadios de maduración folicular tempranos, coincidiendo además con la presencia de los RA (64).

Los folículos afectados de forma positiva, todavía requerirán entre varias semanas a meses para alcanzar los estadios sensibles a las gonadotropinas, donde se vuelven clínicamente relevantes, explicando la necesidad de la administración de al menos 6 semanas previas al ciclo de FIV. Durante este período la dinámica de conversión de la **DHEA** en otros andrógenos ofrece un modelo potencial para investigar los efectos de los andrógenos sobre la maduración de los folículos (64)

Luego de la administración de **DHEA** los niveles de **Testosterona (T)** se elevan, siendo esta elevación asociada estadísticamente con las probabilidades de embarazo ante una FIV. Los niveles aumentados de andrógenos se han asociado previamente con niveles elevados de **AMH**, siendo estos favorables para mejorar la reserva ovárica funcional (64).

La adecuada conversión de la **DHEA** a **T** aumenta las posibilidades de embarazo en mujeres con baja respuesta ovárica. Por otro lado las mujeres más jóvenes tienen mejores tasas de conversión que las mujeres mayores. Sin embargo, las mujeres >40 años pueden, potencialmente beneficiarse de la administración directa de **Testosterona**, por lo que la evaluación de los niveles de andrógenos en las mujeres con baja respuesta ovárica puede ser de gran utilidad (64).

Tal como resume *Lenie y Smitz* (69) los andrógenos a concentraciones sub-nanomolares ejercen efectos genómicos y no genenómicos. Como un factor de transcripción activada por ligando, el RA detecta concentraciones su-nanomolares en el citoplasma y convierte las señales de los andrógenos en cambios en la expresión genética (84). La señalización no rápida de los andrógenos, puede modular las actividades transcripcionales del receptor de andrógenos. Es de notar que entre los distintos tipos de células ováricas la mayor expresión de los receptores de andrógenos puede ser encontrados entre las células de la granulosa (74).

Los folículos preantrales y antrales constituyen en su mayoría lo que en la práctica clínica se conoce como reserva ovárica funcional (ROF) mejor evaluada por la **AMH**, y el recuento de los folículos antrales (RFA) (70). Los efectos positivos o negativos de los andrógenos, deberían, por lo tanto, estar reflejados en los niveles de **AMH** y RFA.

No todos los andrógenos son igual de agonistas para el RA, la **Testosterona** y su metabolito, **5- α -dihidrotestosterona** (DHT) son los agonistas mas potentes naturalmente conocidos (69). Tanto los ovarios como las glándulas adrenales producen tres distintos tipos de andrógenos durante la esteroidogénesis: **ASD**, **T** y **DHEA**. Dado que el agonismo con el receptor de andrógenos difiere, se describen diferentes efectos de los andrógenos. Por otro lado, también ha de considerarse la

posibilidad de que los metabolitos de estos andrógenos puedan expresar diferentes efectos, quizás a través de diferentes mecanismos y/o receptores. Los efectos estrogénicos, vía receptor de estrógenos son un posible ejemplo (69).

Quiao y Feng, recientemente han descrito la hiperandrogenemia como uno de los factores intra ováricos característicos del SOPQ que afectan la maduración del ovocito. Ellos notaron que la hiperandrogenemia es típicamente atribuida a la producción excesiva de andrógenos por lo ovarios con sustancial contribución de las células adrenales, y en menor cantidad por las células del tejido adiposo. Altos niveles de andrógenos en la mujer con resistencia a la insulina puede ser también debida a la inhibición de la producción hepática de las globulina transportadora de hormona sexual (SHBG) (79).

También, de acuerdo a los autores, las diferentes investigaciones sugieren eventos adversos de los altos niveles de andrógenos en el desarrollo folicular (85). Típicamente, los folículos pequeños del SOPQ son hiperandrogénicos debido la producción elevada de andrógenos por las células de la teca (86).

El SOPQ es un síndrome ovárico heterogéneo, caracterizado por una multitud de fenotipos reproductivo-endocrino y metabólico (79). Pero también se pudiera argumentar que el ovario poliquístico, en si mismo, representa un fenotipo ovárico, compartido por mujeres con niveles hiperandrogénicos o normo-androgénicos femeninos (79). Algunos pacientes con SOPQ son hiperandrogénicos, pero la hiperandrogenemia no es la única etiología de este síndrome.

Debido a la heterogeneidad de los pacientes con SOPQ, es difícil interpretar los datos publicados después de los tratamientos de infertilidad. Un numero mayor de pequeños folículos (folículos antrales de 2-5 mm) definen el diagnóstico, y no sorprende que, independientemente de la etiología, todos los pacientes con SOPQ

producen mayor cantidad de ovocitos después de la estimulación con gonadotropinas. Algunos autores han sugerido, que la desigualdad en la calidad de los ovocitos, conllevan una baja implantación y altas tasas de abortos así como de aneuploidias (87).

Weghofer y colaboradores, determinaron que, sobre todo, los pacientes con SOPQ producen un larga cantidad de embriones euploideos, sin embargo demostraron las tasas más bajas de embarazo y altas tasas de abortos (88), sugestiva de un factor de calidad no-cromosómico en los ovocitos.

Las diferencias presentadas en los resultados son debido principalmente a la heterogeneidad etiológica. Esto ha sido demostrado por un reciente artículo de un fenotipo de SOPQ, altamente asociado con un subtipo específico de **FMR1** (polimorfismo repetido del gen CAG) no asociado con obesidad ni con hiperandrogenismo pero que rápidamente pueden disminuir la reserva ovárica. Las mujeres afectadas a edades tempranas demostraron un SOPQ clásico pero las mujeres de edad media y mayor edad a menudo exhibieron una ROF disminuida anormalmente (67). El fenotipo del los SOPQ no tiene presencia estable en todos los pacientes que lo tienen y puede desaparecer.

Algunos resultados en animales son relevantes para un mejor entendimiento del SOPQ. Por ejemplo, se ha pensado que, la **Dehidroepiandrosterona** en modelos animales puede inducir fenotipos de SOPQ en ovarios normales al inicio del estudio. En humanos, frente a la suplementación por largos períodos de tiempo, en mujeres con reserva ovárica disminuida (ROD) se presenta como resultado un SOPQ típico (80).

Cabe destacar que la administración de **DHEA** como tratamiento para incrementar la reserva ovárica disminuida, se ha venido empleando de forma frecuente, según lo confirman las investigaciones publicadas (81).

La **DHEA** puede presentar distintos efectos inmunológicos en el ovario: el hiperandrogenismo inducido por la **DHEA** puede incrementar los linfocitos **T** en el tejido ovárico modificando el fenotipo por disminuir la células T colaboradores (CD4+) y disminuye la células supresoras/citotóxicas (CD8+) (62).

Sander y colaboradores han descrito incrementos en el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) (89). La células CD4 y CD8 y el TNF- α están íntimamente involucradas con la autoinmunidad, una observación importante, considerando la actividad antagónica de los andrógenos en lo que respecta al excesivo riesgo de autoinmunidad de la mujer (66).

Casson y colaboradores publicaron aumentos moderados en la producción de ovocitos luego de la suplementación por corto tiempo de **DHEA**, sin embargo fallaron en reconocer el potencial de su importancia clínica (90).

Se han descrito las correlaciones del modelo de ratón y el uso de **DHEA** en el caso de una mujer de 43 años con ROD severa, en quien se empleó la suplementación con **DHEA** por casi un año (y 9 ciclos de FIV) desarrollando ovarios con fenotipo de SOPQ y requiriendo la disminución de las dosis de gonadotropinas para evitar la hiperestimulación ovárica (80).

Los datos publicados sugieren que la suplementación con **DHEA** en mujeres con ROD aumenta el número de embriones, ovocitos y la calidad de los mismos, así como el incremento en las tasas de embarazos por FIV o espontáneos y reduce las aneuploidias embrionarias y la tasa de abortos (81).

Viendo los datos publicados de **DHEA** con los datos de los estudios en modelos animales, disponibles hasta la fecha, surgen incógnitas como las siguientes, las cuales valdría la pena tener en cuenta a la hora de hablar del uso de los andrógenos en tratamientos de infertilidad: ¿Podrían los andrógenos beneficiar el reclutamiento de los folículos primordiales?, ¿Porqué mejora la producción de los ovocitos con la suplementación extra a largo plazo con **DHEA**?. ¿Podrían afectar beneficiosamente los andrógenos, especialmente a los folículos preantrales y antrales?. ¿Porqué podría favorecer la producción de una cantidad extra de andrógenos, la calidad del huevo y el embrión?. Y si los andrógenos afectan beneficiosamente la maduración meiótica y ¿Porqué podría evitar la aneuploidia y abortos? (75).

Los niveles elevados de **T** y/o **LH** en la mujeres con SOPQ han sido ampliamente asociados con niveles elevados de **AMH** relacionándose con la causas del desarrollo alterado de un folículos y ovocito, así como una calidad embrionaria alterada (91). Niveles elevados de **AMH**, sin embargo, no necesariamente indican altos niveles intrafoliculares de **AMH**. Por ejemplo, la **AMH** recuperada por ovocito varía, basados en el genotipo y sub-genotipo de **FMR1** (74). El hecho de que los niveles intrafoliculares de **AMH** reflejen la calidad de la maduración folicular, ha sido, altamente discutida. Probablemente como muchos investigadores concluyeron que, altos niveles intrafoliculares de **AMH** en SOPQ ha obtenido la respuesta contraria a lo esperado (79).

Normalmente el gen ligado al *cromosoma X* candidato para el SOPQ es el gen del RA (92). El polimorfismo repetido del gen CAG se ha visto asociado con el fenotipo del SOPQ. *Van Nieuwerburgh y colaboradores* recientemente publicaron que repeticiones mas cortas del gen CAG en el gen del RA parecen pueden mejorar

la androgenicidad en el SOPQ. Específicamente, los pacientes con SOPQ bi-alélicos con menos de 21 repeticiones tienen mas bajos niveles de **DHT, ASD, LH, LH/FSH** y los signos clínicos de hiperandrogenismo, como acné e hirsutismo son menores, sin embargo estas afirmaciones no han sido confirmadas (93).

La prevalencia del polimorfismo puede, sin embargo, también tener diferencias raciales/étnicas, antecedentes de la población de estudio, como recientemente ha demostrado con la repetición del polimorfismo del gen CAG en el gen FMR1 (94). Estudiando la mujer del Sur de la India, se concluyó que el polimorfismo repetido de CAG, por si mismo, no representa un marcador útil para el SOPQ (95).

Hasta el momento, la revisión de la evidencia tanto, clínica como preclínica de que el uso de los andrógenos, al contrario de largas creencias al respecto, demuestra que no siempre tienen un efecto negativo sobre la maduración folicular, si no que, dentro de los rangos terapéuticos pueden ser clínicamente beneficiosos (74). Sin embargo los datos publicados tienen ciertas limitaciones, los cuales se pueden resumir en la Tabla 1.

Tabla 1

Razones por la cual los resultados publicados sobre los efectos de los andrógenos son variables.

No todos los andrógenos tienen afinidad por igual a los RA.

Los andrógenos pueden tener acción genómica y no genómica sobre la maduración folicular.

El mecanismo de acción de un andrógeno puede variar:

- **Basado en las concentraciones:** dependiendo sí se encuentra dentro o fuera de los rangos terapéuticos.
- **Basado en el sinergismo/antagonismo con otros factores:** sinergismo con FSH, etc.

Los andrógenos actúan sobre el folículo dependiendo del estadio de maduración:

- **Son más efectivos en los estadios antrales y preantrales.**
- **Duración de la administración del andrógeno.**

Los andrógenos pueden ser sólo/más efectivos en pacientes con hipoandrogenismo/ROD.

Población de estudio poco homogénea: por ejemplo pacientes con SOPQ

Tabla 1: Razones por las cuales los resultados de los estudios publicados sobre la acción de los andrógenos son variables (74).

Tomado de: Gleicher N, et al. Reproductive Biology and Endocrinology.

2011,9:116.

BAJA RESPUESTA OVÁRICA

1.-DEFINICIÓN:

La primera descripción de una paciente con una baja respuesta se remonta a 28 años atrás, describiendo una paciente con una respuesta folicular disminuida y niveles de estradiol bajos a la estimulación ovárica con **FSH/HMG**, dando por resultado un número de ovocitos recuperados disminuidos y por consiguiente una disminuida transferencia de embriones (96).

Han sido numerosas las publicaciones hechas hasta el momento, en relación a la baja respuesta ovárica, explicando la patogénesis, caracterización clínica y posibles tratamientos (96), sin embargo, las conclusiones hasta el momento han sido poco alentadoras, ya que no se ha demostrado suficiente evidencia para identificar el uso de una u otra estrategia para incrementar los resultados en las pacientes con baja respuesta (96), siendo uno de los problemas principales la poca evidencia, el poco consenso en la definición empleada para referirse a la baja respuesta ovárica en estos estudios, determinando así la necesidad de tener una definición universal que permita estandarizar la terminología y criterios empleados en los ensayos clínicos (96).

Aunque una definición universal de baja respuesta ovárica no ha sido utilizada en los trabajos más relevantes, que están actualmente disponibles en la literatura, la baja respuesta ovárica es considerada como la respuesta inadecuada a la estimulación. Es definida usualmente como por un número bajo de ovocitos recuperados o un bajo número de folículos desarrollados y baja concentración de estrógenos previo o durante el ciclo de FIV (Fecundación in vitro) (97).

Ante esta problemática, un grupo de trabajo, en Bologna (Congreso ESHRE 19-20 de Marzo del 2010) conformado por los grupos de interés de la mayoría de las investigaciones se reunieron con el objetivo de lograr un consenso en la definición y diagnóstico de la baja respuesta ovárica.

2.-CRITERIOS DE BOLOGNA:

CRITERIOS PREDICTIVOS

a.-Edad y otros factores de riesgo asociados con la Baja/pobre respuesta ovárica:

Es ampliamente aceptado que la baja respuesta ovárica puede ser la manifestación temprana del envejecimiento ovárico y de una reserva ovárica disminuida (98), de hecho, el tamaño de la cohorte de folículos reclutables puede ser el reflejo del conjunto de folículos en reposo (96).

Paralelamente al descenso fisiológico de los folículos ováricos con la edad, la respuesta ovárica a la **FSH** disminuye con el avance de la edad (99). En esta figura (Figura 7) se muestra la relación entre la edad y la baja respuesta ovárica según los ciclos cancelados por ausencia o baja respuesta ovárica o recuperación de ≤ 3 ovocitos), en 3825 mujeres comenzando el primer ciclo en la unidad de la Sociedad Italiana de la Medicina de la Reproducción (S.I.S.Me.R) en Italia y en la Unidad de Fecundación in vitro del Hospital Universitario de Modena, Italia, entre Enero del 2004 y Diciembre de 2009.

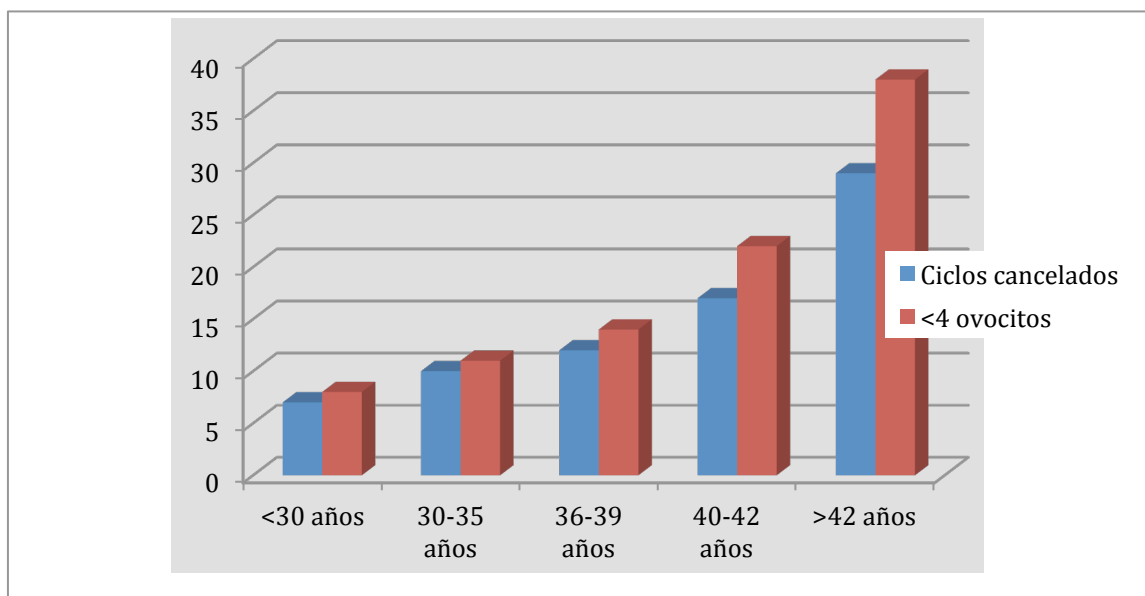


Figura 5: Relación entre la edad y la Baja respuesta Ovárica. Información proveniente del estudio de 3825 mujeres comenzando el primer ciclo en la unidad de la Sociedad Italiana de la Medicina de la Reproducción (S.I.S.Me.R) en Italia y en la Unidad de Fecundación in vitro del Hospital Universitario de Módena, Italia, entre Enero del 2004 y Diciembre de 2009 (96).

Tomado de: Ferraretti, et al. 2011. Hum Reprod. 1616-1624.

Todas las pacientes recibieron tratamientos de estimulación ovárica con diferentes dosis, dependiendo de la edad. Como era de esperar, la prevalencia de la baja respuesta ovárica se incrementó con la edad, y en mujeres mayores de 40 años de edad la prevalencia es >50%. Sin embargo, a pesar del factor edad, son todavía capaces de producir mas folículos y ovocitos mientras que las más jóvenes, no están completamente protegidas frente a la baja respuesta (100).

La edad avanzada (>40 años) puede ser considerada el factor de riesgo más relevante para la baja respuesta, pero siempre debe ser confirmada la misma con otras pruebas, permitiendo a los investigadores clasificar a la mujer con una edad mayor de 40 años con un ciclo previo de FIV y que presenta baja respuesta, como una baja respondedora. De la misma manera, si la mujer joven se presenta con pobre respuesta durante el primer ciclo, la reserva ovárica disminuida puede ser

confirmada usando pruebas como, una prueba de reserva ovárica anormal o una baja respuesta ovárica luego de la estimulación. (96)

Un abordaje similar se puede emplear para otros factores de riesgo asociados con la baja respuesta ovárica, por ejemplo, las condiciones genéticas o adquiridas. Las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas tales como las mutaciones o variabilidad en los genes específicos del envejecimiento reproductivo pueden estar implicadas en la disminución de la reserva ovárica. Esto podría conllevar a una menopausia temprana y a reducir la respuesta ovárica a las gonadotropinas cuando la mujer es sometida a un protocolo de estimulación (101). Los ejemplos típicos pueden ser el Síndrome de Turner y las mutaciones **FMRI** (102), ambas condiciones están clínicamente asociadas tanto la menopausia temprana como la insuficiencia ovárica primaria y la respuesta ovárica disminuida a las gonadotropinas. En conclusión, estas condiciones demuestran la relación cercana que existe entre la reserva de folículos en reposo, la respuesta a la estimulación ovárica y la duración del ciclo de vida reproductivo.

Las infecciones pélvicas, evidenciadas por el daño tubárico y la positividad a la *Chlamydia*, está asociada a la baja respuesta (103). Igualmente, mujeres con endometriomas ováricos y pacientes sometidas previamente a cirugía por quistes de ovario son potenciales pacientes con baja respuesta (104). Por otro lado, la quimioterapia, especialmente cuando ésta incluye un agente alquilante, se ha demostrado que reduce seriamente el número de folículos en reposo y se asocia con un grado variable de riesgo de insuficiencia ovárica primaria (105). El acortamiento en la duración de los ciclos menstruales puede representar otra condición asociada con el riesgo incrementado de baja respuesta ovárica (106).

3.-PRUEBAS DE RESERVA OVÁRICA

Además de la edad, una serie de parámetros clínicos pueden predecir la baja respuesta a la estimulación con gonadotrofinas, las cuales son introducidas a la práctica clínica. Estos parámetros incluyen la **FSH** basal, **Inhibina B**, Recuento folicular antral, volumen ovárico, pruebas dinámicas y más recientemente la hormona anti-Mülleriana (**AMH**) (107). Estas pruebas podrían dar información sobre la verdadera reserva ovárica y la verdadera funcionalidad de los ovocitos. Actualmente, las pruebas de reserva ovárica aportan una medida indirecta de la cohorte de los folículos antrales reclutables presentes en la ventana de la **FSH** al comienzo de cada ciclo menstrual (108). La relación entre los resultados de las pruebas de reserva ovárica y la verdadera reserva es desconocida pero es probablemente moderada o buena para el aspecto cuantitativo y baja para el aspecto cualitativo (96).

La utilidad de las pruebas de reserva ovárica en predecir la respuesta individual a la estimulación ovárica dependerá de la exactitud de la prueba por sí misma, por ejemplo, de la probabilidad de predecir el resultado de interés correctamente. Varias investigaciones han analizado el valor predictivo de una sola prueba y con la combinación de pruebas llevadas a cabo en condiciones basales. De todas las pruebas, el **RFA** y la **AMH** tuvieron la mejor sensibilidad y especificidad para predecir la respuesta ovárica (107, 109). Sin embargo, incluso el mejor marcador de reserva ovárica en el mejor valor de corte está asociado con una tasa de falsos positivos de 10-20% (110). El trabajo de *Broekmans y colaboradores* (2006) concluyó que las pruebas para reserva ovárica tienen utilidad clínica modesta debido a sus limitadas propiedades predictivas y con la hipótesis de que la respuesta durante el primer ciclo de FIV pudiera ser usada como sustituta de las pruebas de

reserva ovárica. Una larga investigación se ha hecho para evaluar el uso de si varias pruebas combinadas pueden incrementar la exactitud predictiva. Un meta-análisis demostró que el uso de pruebas combinadas no superan el uso de una sola prueba en predecir la baja respuesta ovárica (111).

En conclusión, tanto la **AMH** como el RFA deben ser considerados como los marcadores mas seguros y exactos de la reserva ovárica (107, 109). Su rendimiento global en la predicción de la baja respuesta es aceptable, aunque no óptimo, con lo cual, estas pruebas deben ser usadas con un análisis post hoc. Las mujeres con una baja respuesta previa a la máxima estimulación con **FSH** y un resultado anormal en la reserva ovárica deben ser catalogadas con una mujer con una alta probabilidad de reserva ovárica disminuida.

En relación con los valores de referencia a ser usados en la práctica clínica, para la **AMH**, el mejor valor reportado se encuentra en un rango entre 0,5 a 1.1 ng/dl mientras que para el RFA el valor puede estar entre menos de 5 o menos de 7. Los médicos deben ser muy cuidadosos con estos valores ya que los resultados de las pruebas de valoración de la reserva ovárica pueden tener consecuencias importantes para las parejas, valores de referencia extremos son mejores cuando asociados con alta especificidad (baja tasa de falsos positivos), incluso si esto implica una sensibilidad reducida. Desde un punto de vista práctico, los clínicos confirman con alta probabilidad que la RFA es el marcador más ampliamente empleado como marcador de reserva ovárica, en consecuencia de la presencia universal del equipo de ecografía en la consulta.

4.-BAJA RESPUESTA PREVIA

Los problemas relacionados con este criterio pueden presentarse a dos niveles, los parámetros usados para identificar la baja respuesta durante el tratamiento y la precisión de la baja respuesta previa a identificar pacientes con reserva ovárica disminuida.

Por definición, el término de baja respuesta ovárica está relacionada al de folículos en crecimiento detectables por ecografía en la valoración llevada a cabo durante la estimulación con gonadotrofinas. Sin embargo, la falta de uniformidad en la monitorización ovárica el día en el cual la medición debería ser hecha y el diámetro de los folículos ha conllevado que el número de ovocitos recuperados sean usados como criterio diagnóstico de las pacientes con baja respuesta ovárica. Pero para su definición, el rango de ovocitos recuperados estará entre <3 a <6. Por lo tanto, algunos autores consideran que el pico de **Estradiol** y la cantidad total de gonadotropinas usadas debe incluirse como criterio.

Para la definición, la mayoría de los trabajos identifican la baja respuesta después de un ciclo. Un solo episodio de baja respuesta puede ser un hallazgo ocasional y pudiera estar ausente en un siguiente ciclo si se incrementa la dosis de **FSH/HMG** o se emplea la misma dosis en el siguiente protocolo. Clínicamente, la aparición de la una baja respuesta en pacientes baja respondedoras en un segundo ciclo ocurre en el 62,4% (112), con la consecuencia de que, una tercera parte de las baja respondedoras tendrán una respuesta normal.

La razón para la variabilidad en el número de los folículos reclutados, y consecuentemente en el número de los ovocitos recuperados, es que la cohorte de folículos reclutables varía de un ciclo a otro. Una clara demostración es la reciente

evidencia de una variabilidad clínicamente relevante inter ciclo de folículos antrales detectable por ecografía (del conjunto de folículos reclutables) (14).

Según los criterios de Bologna (Reunión de Consenso ESHRE) la baja respuesta ovárica será diagnosticada con al menos dos de los tres criterios siguientes:

-Edad materna avanzada (≥ 40 años) o algún otro factor de riesgo para presentar baja respuesta ovárica.

-Un episodio previo de baja respuesta ovárica (≤ 3 ovocitos recuperados luego de un protocolo convencional de estimulación)

-Test de reserva ovárica con resultados anormales (ej. AFC: < 5 -folículos o **AMH** $< 0.5-1.1$ ng/ml). (96)

Dos episodios de baja respuesta ovárica después de la estimulación máxima son suficientes para definir a una paciente como baja respondedora en la ausencia de edad materna avanzada o pruebas de reserva ovárica anormales.

Por definición, el termino baja respuesta ovárica se refiere a la respuesta ovárica y, un ciclo de estimulación es considerado esencial para el diagnóstico de baja respuesta. Sin embargo, pacientes por encima de 40 años con pruebas de reserva ovárica anormales pueden ser clasificadas como baja respondedoras ya que la edad avanzada y las pruebas anormales pueden indicar reserva ovárica disminuida y actuar como sustituto de un ciclo de estimulación ovárica. En este caso, los pacientes deberían ser propiamente definidos como baja respuesta ovárica.

Los autores del consenso de ESHRE han querido, manifestar en su trabajo, que el objetivo de la misma es para poder identificar a las pacientes con baja respuesta ovárica solo para fines de investigación, para incluir poblaciones homogéneas probando nuevas estrategias y no excluir a las pacientes con peor

pronóstico que recibirán tratamientos de estimulación ovárica (FIV). Este último es un tema controversial que involucra aspectos económicos, éticos y psicológicos que deben ser tomados en cuenta. Además, está ampliamente demostrado que las bajas respondedoras pueden obtener embarazos y tener hijos vivos, en particular, las mujeres jóvenes con baja respuesta tienen un pronóstico diferente con respecto a las mujeres mayores con el mismo diagnóstico (113, 114).

USO DE LOS ANDRÓGENOS COMO TRATAMIENTO DE LA BAJA RESPUESTA OVÁRICA.

Laufer y colaboradores recopilaron, hasta el 2007, experiencias publicadas en humanos empleando andrógenos en mujeres con ROD. Concluyeron que las diferencias en los criterios de selección de las pacientes, tipos de andrógenos empleados, esquemas variados de tratamiento, poca cantidad de artículos, así como el diseño de los mismos, ha impedido hasta el momento, obtener conclusiones definitivas (115).

Basado la información publicada sobre el uso de inhibidores de la aromatasa (IA), se sugiere que promoviendo un ambiente folicular rico en andrógenos podrían mejorarse los resultados de la FIV en mujeres, quienes, previamente, han fallado en los tratamientos de FIV.

Considerando las diferencias notadas previamente en la afinidad de los andrógenos al receptor de andrógenos (69), y la evidencia que el mismo andrógeno a diferentes concentraciones puede tener diferentes efectos, las conclusiones contradictorias no deberían, por lo tanto, ser sorprendentes (73).

Por otro lado, las investigaciones que emplean tanto **T** como **DHT** podrían ofrecer resultados clínicamente más relevantes. Por ejemplo: *Frattarelli y colaboradores*, también describieron resultados contradictorios: en un primer trabajo ellos sugirieron que bajos niveles de **T** al día 3 (<20 ng/dl) están asociados con bajas oportunidades de embarazo posterior a ciclos de FIV (116). Pero dos años después este mismo grupo de investigadores evaluaron, en un estudio de cohorte prospectivo, a 117 pacientes que se sometieron a procedimientos de FIV, midiendo los niveles de andrógenos antes y durante los protocolos de estimulación. El estudio mostró correlación entre los niveles de **T** basal (día 3) y el número de ovocitos

recuperados en los tratamientos de estimulación de FIV, sin embargo, estos resultados no permiten apoyar el hecho de que los niveles de andrógenos puedan influenciar directamente sobre la tasa de embarazos obtenidos tras FIV (117).

Massin y colaboradores, en su trabajo, tras la aplicación de **T** en gel evaluaron si las pacientes con baja respuesta se beneficiaban de la aplicación de **T** en gel 15 días previos al protocolo de estimulación en segundos ciclos de FIV. La aplicación del gel de **T**, produjo un incremento significativo de los niveles de **Testosterona** en sangre pero no mejoró, de forma significativa, el recuento de folículos antrales. Por lo tanto, luego de la aplicación del gel (24 pacientes recibieron gel de **T**: 25 pacientes placebo), los principales parámetros de respuesta de respuesta ovárica (número de folículos pre ovulatorios, ovocitos y embriones) no presentaron diferencias significativas cuando se compararon con el placebo, y por lo tanto, no se describieron beneficios a los efectos de la **T** en este grupo de pacientes (118).

Balash y colaboradores publicaron en un ensayo clínico prospectivo, auto-controlado de 25 pacientes con antecedentes de uno o dos ciclos cancelados debido a baja respuesta, a quienes, recibieron **Testosterona** transdérmica durante cinco días previos al tratamiento con gonadotropinas, en su tercer ciclo de FIV. 20 pacientes mostraron un incremento cinco veces mayor del número de folículos reclutados, con una media $5,8 \pm 0,4$ ovocitos recuperados y una tasa de embarazo de 30% por ovocito recuperado. El estudio concluyó que el uso de la **T** transdérmica podría ser útil en aquellas mujeres con baja respuesta y niveles basales normales de **FSH**.

Más adelante, el mismo grupo de *Balash* publica un ECA (ensayo clínico aleatorizado) de 62 pacientes con diagnóstico de infertilidad y antecedente de un

ciclo cancelado cuyo objetivo fue el de investigar la utilidad de la testosterona transdérmica. 31 pacientes recibieron T transdérmica (parche de testosterona, 2,5 mg/día), durante cinco días, previa al tratamiento estándar de estimulación. El segundo grupo (31 pacientes) sólo recibió tratamiento de estimulación. Los resultados mostraron un número de ovocitos recuperados más alto en el grupo que recibió el parche vs el grupo que no, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en pacientes con niveles basales de **FSH** normales. Este trabajo permite concluir que el tratamiento previo con **T** transdérmica puede mejorar la sensibilidad de la **FSH** y la respuesta folicular a los tratamientos de estimulación en pacientes con baja respuesta ovárica (119, 120).

Sipe y Van Voorhis publicaron una mejoría en la respuesta folicular a la estimulación con gonadotropinas después de la administración de un parche de **T** en un único caso de Síndrome de Kalmann (121). El mismo grupo, sin embargo, publicó en un pequeño estudio cruzado, aleatorizado, controlado con placebo sin efectos a corto plazo (día 12) de la suplementación con **T** transdérmica (122).

Hossein Rasdhihi y colaboradores resaltaron que la medición de los niveles de **T** en el día 14 después de la transferencia embrionaria puede predecir la oportunidades de embarazos tras una FIV, y *Qin y colaboradores*, demostraron que los niveles de **T** basal fueron predictores del número de folículos de gran tamaño en el día de la inducción de la ovulación, y de embarazo en mujeres con ROD pero no en mujeres con reserva ovárica normal. (68) Los niveles basales de **T** en éste estudio se asociaron con el tiempo de estimulación con gonadotrofinas y el total de la dosis administradas, sugiriendo que los bajos niveles de **Testosterona** pueden estar asociados con ROD (123).

También, *Kim y colaboradores* describieron la experiencia del uso de la **T** transdérmica en gel, en un ensayo prospectivo aleatorizado randomizado. Un total de 110 pacientes con baja respuesta ovárica fueron asignadas de forma aleatoria a recibir **T** en gel (12.5 mg) durante 21 días previos al protocolo de estimulación de FIV. El grupo que recibió la **T** previa, presentó un número significativamente mayor de ovocitos recuperados, ovocitos fertilizados y embriones de buena calidad, con respecto al grupo que no recibió la **T** previa. Este trabajo permitió concluir que el tratamiento previo con **Testosterona** puede representar un beneficio en mejorar tanto la respuesta a los tratamientos de estimulación como los resultados de la FIV en pacientes que presentan baja respuesta ovárica (124).

Otros datos recientemente publicados, parecen apoyar los efectos beneficiosos de la **T** sobre la respuesta ovárica en la mujer con ROD. *Quin y colaboradores* (123), con su estudio ofrecieron otra explicación para los resultados contradictorios en la literatura demostrando una posible asociación entre bajos niveles de **T** y ROD, sugiriendo que principalmente los pacientes con bajos niveles de andrógenos se pueden beneficiar de la suplementación con andrógenos. Por lo tanto, la ausencia de efectividad en el tratamiento con reserva ovárica normal sugiere que la suplementación con andrógenos puede ser más efectiva en mujeres hipoandrogénicas con ROD disminuida.

Un meta-análisis presentado por Sunkara y colaboradores, describe las siguientes conclusiones en cuanto a la administración previa de andrógenos en estimulación ovárica de las pacientes con baja respuesta: a pesar de la existencia de varios trabajos publicados que evalúan el uso de andrógenos o moduladores de los andrógenos para mejorar los resultados de las pacientes que se someten a tratamientos de FIV, la evidencia es insuficiente, para recomendar el uso de estos en

mejorar el número de embarazos, ya que, dicha evidencia, proviene de pocos ensayos clínicos aleatorizados, controlados (125).

Otro reciente meta-análisis, cuyo objetivo fue el de evaluar el papel de los andrógenos o los agentes moduladores de andrógenos sobre la probabilidad de obtener embarazos en pacientes con baja respuesta que son sometidas a tratamientos de FIV. De un total de 106 estudios considerados potencialmente elegibles para el análisis, dos de ellos incluyeron tratamiento previo con testosterona transdérmica con un incremento en el número de embarazos clínicos en baja respuesta ovárica. Sin embargo, a pesar de estos resultados, basados en la evidencia disponible limitada, el uso de la testosterona transdérmica parece incrementar las tasas de embarazos clínicos y nacimientos sanos en pacientes con baja respuesta en los ciclos de FIV (97).

SITUACIÓN ACTUAL EN EL MANEJO DE LA BAJA RESPUESTA OVÁRICA

La baja respuesta es uno de los retos diarios del clínico en la consulta de infertilidad. Se estima que la incidencia de bajas respondedoras en la población que realizan FIV es del 9-24% (126). Estas pacientes tienen peores tasas de embarazo cuando se comparan con pacientes con respuesta normal. Se han propuesto numerosas estrategias en el tratamiento de las bajas respondedoras pero hasta el momento no se han alcanzado ventajas de unos tratamiento de estimulación sobre otros.

La creación de un estado endocrinológico pseudo poliquístico reversible mediante el tratamiento con andrógenos sería el principio fundamental de ésta opción terapéutica.

Las mujeres con ovario poliquístico a menudo presentan respuestas elevadas a la estimulación ovárica desarrollando numerosos folículos. Estos folículos a menudo han estado expuestos a niveles elevados de andrógenos durante un largo período de tiempo, lo que hace que estos desarrollen una hipersensibilidad a la **FSH**.

Los andrógenos promueven el crecimiento folicular de forma indirecta mediante la amplificación de la respuesta a la **FSH** en el ovario que se puede traducir en una hiperrespuesta. Por lo que evaluar un nuevo tratamiento terapéutico que permita controlar la capacidad de respuesta de los ovarios a los tratamientos de estimulación permitirá, no sólo resolver el problema de infertilidad de estas pacientes sino además generará información novedosa, a la ya disponible, relativa a los motivos por los cuales se produce esta escasez de respuesta en el ovario en determinadas pacientes.

Se estima que la incidencia de bajas respondedoras en la población a las que le realizan FIV es del 9 al 24% (126). Estas mujeres comprenden un grupo heterogéneo, en el que los marcadores de rutina, como la **FSH** sérica en el día 3,

concentración de **Inhibina**, **Estradiol** folicular temprano y **AMH**, no son precisos en la predicción de la baja respuesta ovárica. (115) Debido a la probabilidad disminuida de embarazos luego de una FIV en estos pacientes, se han propuesto varias alternativas, sin la identificación de un tratamiento indiscutiblemente efectivo (97).

La baja respuesta ovárica a menudo resulta en la obtención de pocos embriones para transferencia, tasa de implantación reducida, tasas de embarazo y alta probabilidad de ciclos cancelados (125).

El tratamiento de pacientes con baja respuesta es una tarea difícil. Los estudios centrados en esta población han demostrado que el cambio de la concentración o el tipo de gonadotropinas, empleando diferente hormonas liberadoras de gonadotropinas (**GnRH**), hasta empleos de tratamientos o antagonistas de GnRH (**aGnRH**), han dado resultados no muy alentadores (115). Varios tratamientos de estimulación y terapias adyuvantes se han propuesto para incrementar los resultados en embarazos en las bajas respuesta (125).

Por otro lado, los estudios realizados con ovarios de primates han demostrado que el uso de los andrógenos estimulan el crecimiento de los folículos en estadios tempranos, influenciar en la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas y amplificar los efectos de la **FSH** en el ovario (124).

El uso de dihidrotestosterona o testosterona aumenta la expresión del receptor de **FSH** en las células de la granulosa, promueve la iniciación de crecimiento del folículo primordial e incrementa el número de folículos pre-antrales y antrales (120).

Por otro lado, la administración exógena de andrógenos por 10 días han demostrado un incremento en los receptores del ARNm y el del **FSH** del 50-100% (122).

Los andrógenos, al contrario de lo que clásicamente se creía, no siempre son perjudiciales para el desarrollo folicular, y que, dentro de los rangos terapéuticos, pueden ser clínicamente beneficiosos.

Algunos datos publicados al respecto, son inconsistentes. La acción de los andrógenos sobre los folículos en estadios tempranos de la maduración, incluyendo el reclutamiento, al alcanzar el pico de concentración en los estadios preantrales y antrales, los andrógenos actuarían sobre las células de la granulosa, induciendo al RA ligando-activado, lo cual convierte la modulación de la acción de la **FSH** en células en desarrollo de la granulosa, modulando la diferenciación, y consecuentemente el desarrollo folicular (69).

La experiencia sobre la suplementación de **DHEA** en las mujeres con una severa ROD (**AMH** indetectable de 0.3 ng/ml) basados en embarazos obtenidos y de nacimientos vivos (127), bajas tasas de abortos y tasas de aneuploidia reducidas en los embriones, ha permitido concluir que existe el concepto de que la edad del ovario deben ser reconsiderada.

El ovocito no reclutado en el estadio de folículo primordial no envejece. Por otro lado, el ambiente ovárico envejecido afecta negativamente el proceso de maduración, inicialmente sano (70).

Los niveles de **DHEA** disminuyen significativamente con la edad, probablemente en su mayoría el resultado de los cambios en la función adrenal. En contraste, los niveles de **T** y el índice de andrógenos libres se incrementan a expensas de la disminución de la proteína transportadora de hormonas sexuales (128), mientras que la **FSH** se incrementa (129). Sin embargo parece ser común que el ambiente androgénico folicular de los ovocitos maduros, cambia en la mujer con la

edad. Y como consecuencia también se afecta la relación andrógenos/**FSH** que actúan sinérgicamente en las células de la granulosa.

Estas, son probablemente dos de las más importantes consecuencias observadas a nivel ovárico debido a la edad. Pero estos efectos, pueden, al menos parcialmente ser revertidos con el uso de la suplementación de andrógenos, ya sea en forma de **DHEA**, **T** u otros andrógenos. La importancia de los niveles normales de andrógenos, como de la **FSH** especialmente en los estadios antrales y preantrales, ha quedado demostrado (74).

El tratamiento de la ROD con andrógenos puede, por lo tanto, ser el primer paso en mejorar el ambiente ovárico en el cual los folículos maduren (74).

La elevación, a niveles superiores a los fisiológicos, de **Testosterona** exógena, muestra un aumento, a nivel de las células de la granulosa, en la expresión de los receptores de la **FSH**, lo que sugiere que los andrógenos promueven el crecimiento folicular al sensibilizar las células de la granulosa a la acción de la **FSH** (54).

Actualmente existen tres diferentes vías para incrementar las concentraciones intra ováricas de andrógenos: a) La **Testosterona** transdérmica, b) Administración de **LH/hCG** (Hormona Luteinizante/ Hormona Gonatropina Coriónica), la cual estimula la producción de andrógenos en las células de la teca, o con la administración de inhibidores de la aromatasa, que bloquean la conversión de andrógenos en estrógenos incrementando temporalmente la concentración intrafolicular de andrógenos. c) La tercera vía corresponde al uso de inhibidores de la aromatasa (**IAs**), los cuales bloquean la conversión de andrógenos en estrógenos, incrementando temporalmente la concentración de andrógenos a nivel intra folicular (130).

Los **IAs** de tercera generación, Letrozol (Femara®) y Anastrozol (Arimidex®) han demostrado aumentar la sensibilidad ovárica a la **FSH** y, por ser potentes inhibidores reversibles, han sido usados como tratamiento adyuvante en la creación de un estado hiperandrogénico intra ovárico en aquellas mujeres con baja respuesta ovárica ante una estimulación ovárica controlada (131).

En relación al momento adecuado para iniciar la androgenización ya que se ha descrito, desde varias semanas antes de la estimulación a los primeros días de la misma en la fase folicular temprana. Sí el objetivo de la androgenización folicular es aumentar la sensibilidad a la **FSH**, el momento óptimo podría ser mejor antes que durante la estimulación con **FSH** (132).

Los andrógenos mejoran la diferenciación de las células de la granulosa por la **FSH** y el desarrollo especialmente en los estadios antrales, ya que corresponde al momento de concentración más alta de RA (69, 133). Debido a la alta expresión de RA en este estadio de crecimiento folicular, resulta razonable asumir que, si los andrógenos pueden ejercer su acción de forma beneficiosa sobre la maduración folicular, sobre el folículo antral, este puede ser el estadio de máximo efecto beneficioso de los andrógenos.

No hay que olvidar que se tardan unos tres meses en que un folículo primordial alcance el estadio preovulatorio aunque la expresión del receptor de andrógenos esta restringida a los folículos preantrales, tardíos y antrales.

Sin embargo, queda, una importante interrogante por responder: ¿Cuál es la dosis diaria del andrógeno, en que momento debe iniciarse el tratamiento previo a la estimulación y la duración de este, son de crucial importancia para la estimulación ovárica. Esta androgenización pudiera tener un efecto antagonista sobre la función

ovárica estimulada con gonadotropinas si se sobrepasa un umbral determinado de andrógenos como se pone de manifiesto en un trabajo en primates (134).

También puede decirse que en este estadio, el uso de andrógenos puede beneficiar concomitantemente la administración externa de **FSH**. Asumiendo un rango terapéutico de los andrógenos, y también de un adecuado nivel de **FSH** se podrían inferir la obtención de los beneficios máximos para la diferenciación de las células de la granulosa y desarrollo folicular. Por lo tanto, se puede especular que la falla en obtener tal balance de andrógenos/**FSH** puede ser perjudicial para el desarrollo folicular normal. Un balance natural entre los andrógenos y las gonadotropinas puede por lo tanto, existir, basado en el trabajo de *Casson y colaboradores*, quienes publicaron que la hiperestimulación ovárica mejora la secreción adrenal de **Sulfato de Dehidroepiandrosterona** (135).

Todas estas consideraciones, sugieren el potencial del nuevo abordaje terapéutico de la estimulación ovárica en ROD, utilizando este sinergismo entre los andrógenos y la **FSH**, con una suplementación de largo tiempo paralela de células de la granulosa con andrógenos y **FSH**. Los pacientes que se someten a un largo número de ciclos consecutivos son raros. En mujeres con ROD de forma severa, se ha podido observar mejor calidad de los ovocitos recuperados y la calidad con ciclos consecutivos de estimulación ovárica, lo cual permite un efecto sinérgico andrógenos/**FSH** (81).

Si se confirma este sinergismo podría esperarse mayor tasa acumulada de embarazos. Esto luego podría ser potencialmente reforzado por un nuevo tratamiento de estimulación ovárica en la mujer con ROD, utilizando en combinación, un largo periodo de andrógenos y bajas dosis de gonadotropinas, después de unas pocas semanas a meses intermitentemente continuadas por altas dosis de

estimulación de episodios de gonadotropinas, y que finalmente conlleve a la obtención de un embarazo clínico (136).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

El propósito de este estudio fue el de determinar la influencia de la **Testosterona** transdérmica en la respuesta ovárica de bajas respondedoras a través de la medición del número de folículos ≥ 14 mm y ovocitos en metafase II en pacientes que recibieron tratamientos de reproducción asistida.

La hipótesis de trabajo esta basada en una de las estrategias de androgenización folicular, mediante el uso de parches de **Testosterona** en la fase lútea del ciclo previo al tratamiento de estimulación ovárica, así como en los primeros 5 días de estimulación en tratamientos de reproducción asistida, y así evaluar si se presentan diferencias en el número de ovocitos en MII en pacientes de baja respuesta a la estimulación ovárica, tras ser sometidas a un tratamiento de androgenización folicular con **Testosterona** transdérmica.

OBJETIVOS

- Evaluar el número de folículos ≥ 14 mm y de ovocitos en metafase II aspirados el día de la punción.
- Evaluar la tasa de fecundación de estos ovocitos.
- Evaluar la calidad embrionaria en el Día 3.
- Evaluar el número de gestaciones clínicas y recién nacidos vivos.

IMPORTANCIA DE ESTA INVESTIGACIÓN

Hasta la fecha se han publicado una serie de trabajos dirigidos a resolver este problema de respuesta a la estimulación, no obteniendo ventajas significativas en la aplicación de otros tratamientos. Demostrar que este nuevo tratamiento basado en el uso de parches de **Testosterona** transdérmica es capaz de controlar la respuesta

ovárica en bajas respondedoras abriría nuevos campos de estudio permitiendo trasladar esta investigación a diferentes tratamientos de estimulación y a diferentes respuestas por parte de las pacientes.

Además cabe destacar, que el uso del parche transdérmico posibilita un mayor control de la maduración ovocitaria de la paciente con carácter totalmente no invasivo, puesto que las dosis de **Testosterona** son administradas por vía transdérmica, lo cual facilitaría la incorporación de esta hormona en la paciente de forma no invasiva, contrario a lo que sucede con la vía intramuscular.

La presente línea de investigación presenta dos novedades principales:

1.- La generación de nueva información que facilita una mayor comprensión sobre los mecanismos que influyen en la respuesta ovárica de las pacientes sometidas a tratamiento de estimulación en ciclos de FIV y que limitan los resultados obtenidos en los ciclos.

De acuerdo con el artículo 35 del RD 04/2004, del 5 de marzo, este estudio se considera investigación puesto que pretende, mediante una indagación original y planificada indagar en la generación de información que posibilite el desarrollo de un nuevo tratamiento asociado al ciclo de estimulación ovárica más efectivo que permita solucionar un problema de respuesta ovárica en pacientes que se someten a ciclos de tratamiento de reproducción asistida, debido a problemas de infertilidad, aumentando las tasas de éxito reproductivo y las posibilidades de embarazo en este tipo de pacientes que hasta la fecha eran escasas.

2.-Por otro lado, las investigaciones realizadas durante el transcurso de esta línea permitirán determinar que mecanismos están influyendo en la respuesta a los tratamientos de estimulación de las pacientes con baja respuesta ovárica, a través

de la revisión de la evidencia disponible desde el punto de vista clínico así como la proveniente de ensayos preclínicos.

Así mismo, a través del análisis de las variables de estudio, folículos > 14mm, número de ovocitos recuperados, embriones de buena calidad en el día 3 y embarazos clínicos tras los tratamientos de estimulación, es posible la elaboración de recomendaciones, en cuanto sí se justificaría el uso sistemático del parche de **Testosterona** o sólo debe restringirse a pacientes con criterios específicos y con antecedente de baja respuesta ovárica.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente estudio analítico, observacional de cohorte prospectivo, fue desarrollado en el **Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)** Madrid, en pacientes que fueron sometidas a ciclos de FIV/ICSI desde Enero del año 2011 hasta Marzo de 2013. Esta investigación ha sido aprobada por la comisión investigación del IVI.

Todas las pacientes debieron acceder a firmar un consentimiento informado de inclusión en el estudio.

Criterios de inclusión: pacientes de >18 y <39 años con IMC: 18-30 Kg/m² (Índice de masa corporal: Peso/Talla², Valor normal: 18.50-24.99/ Sobrepeso: \geq 25) al momento de la FIV y con 1-2 ciclos previos con baja respuesta. La baja respuesta ovárica fue definida como una respuesta a la estimulación de < 5 ovocitos y/o cancelación de la estimulación por presentar < 5 folículos de > 14 mm, en 1-2 ciclos de FIV.

Criterios de exclusión: Se excluyeron del estudio, las pacientes mayores de 39 años, IMC: \geq 30 Kg/m² (Índice de masa corporal: Peso/Talla², Obesidad: \geq 30), antecedentes de cirugía ovárica previa, endometriosis ovárica y aquellas pacientes con diagnóstico de enfermedades crónicas clínicamente significativas, como la diabetes insulino dependiente, o enfermedades endocrinas y/o metabólicas como alteraciones de la hipófisis, suprarrenal, o el tiroides, en páncreas, hígado o riñón, con la excepción de la enfermedad de la función tiroidea controlada.

Las pruebas hormonales basales consistieron en medición en suero de **FSH** y **Estradiol** en el día 2 a 4 del ciclo y **AMH**. Para la medición se utilizaron los kits comerciales disponibles. Las concentraciones séricas del **Estradiol** y **FSH** se midieron, utilizando la técnica de quimioluminiscencia con analizador automático Architect (Abbott). El coeficiente de variación para el **Estradiol** fue < 7%, y una sensibilidad analítica de 10pg/ml. En el caso de la **FSH**, el coeficiente de variación

total fue < 8% y una sensibilidad de analítica 0.05 U/L. Para la medición de la concentración sérica de **AMH** se empleó la técnica de ELISA, con kit **AMH** (Beckman-coulter). El CV total fue < 10% y una sensibilidad analítica de 0,08 ng/ml. Se midieron otros parámetros como el IMC y el recuento de folículos antrales (RFA).

El RFA se realizó mediante Ecografía transvaginal entre los días 2-5 del ciclo menstrual. (GE Ultrasound System. Voluson 730 Expert). Esta ecografía fue llevada a cabo por el médico a cargo de la paciente.

Todas las pacientes recibieron un ciclo de anticonceptivos orales (ACOs) con Levonorgestrel y Etinilestradiol (Microgynon ® 0,15mg/0,03 mg. Bayer) por un período de 12 a 16 días, desde el primer día del ciclo menstrual. Posteriormente, en función de la planificación del ciclo de estimulación, las pacientes fueron divididas en dos grupos, el primer grupo recibió parches de **Testosterona** (72 pacientes) y el segundo grupo no (78 pacientes).

TRATAMIENTOS DE ESTIMULACION

Comienzo de la estimulación: 5 días después de la última pastilla de ACO.

Las pacientes del grupo 1 recibieron parches de **Testosterona** (Testopatch® Parche transdérmico 2,4 mg./24 h. Pierre Fabre Ibérica, S.A.), 12 horas al día durante 5 días (119), desde la última pastilla del anticonceptivo hasta el primer día de la estimulación. La aplicación de 1 parche fue durante la noche, en la piel limpia y seca del brazo, desde las 21 horas, y fue retirado siempre a las 09:00 horas por la mañana. Las pacientes en el grupo 2 no recibieron tratamiento alguno en esos 5 días. La aplicación del parche de **Testosterona** provee una vía de liberación de testosterona fiable (137), además la vía transdérmica mantiene niveles de **Testosterona** estables dentro de rangos estrechos, provee una vía controlable de liberación que puede modificarse de acuerdo a la duración de la aplicación del

parche (120). La dosis del parche seleccionada, así como el tiempo de empleo por 5 días tiene su antecedente en los estudios previos experimentales en primates (77).

Posterior a este período de tiempo se inicio la estimulación ovárica a los dos grupos de pacientes (138). Siendo los tratamientos empleados, los siguientes:

1.- FSH recombinante 225 UI/día. (Puregon®. MSD) y 75 UI de hMGhp altamente purificada vía subcutánea. (Menopur® FERRING) o **LH** recombinante 75 UI (Luveris® Merck Serono).

2.- Administración de 50-100 mg/día de Citrato de Clomifeno durante cinco días y a partir del tercer día del ciclo, administración de 150-225 UI/día de hMGhp (Menopur, FERRING).

Los controles ecográficos se realizaron de acuerdo al crecimiento folicular, cada 2 días. El antagonista 0,25 UI/día sc. (Ganirelix. Orgalutran®. MSD) fue introducido cuando un folículo dominante alcanzó 13-14 mm de diámetro medio.

Se tomó como criterio para administrar hCG la presencia de al menos dos folículos de 17 mm, de diámetro medio. El día de la administración de la hCG se midió el **Estradiol** y **Progesterona** en sangre.

El grupo sin parche fue sometido a los mismos protocolos de estimulación ovárica que los anteriormente descritos.

Recuperación de los ovocitos y evaluación de la madurez ovocitaria

A las 36 horas se realizó la punción ovárica transvaginal bajo sedación. La recuperación de ovocitos a partir del líquido folicular se realizó siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1.-Obtencion de los ovocitos: Una vez localizado el ovocito, se aspiró con pipeta de Pasteur, se recogió el ovocito y se depositó en una placa de lavado, intentando trasladar el mínimo de sangre posible. Los ovocitos contenidos en

coágulos fueron separados del mismo mediante la ayuda de una aguja o una jeringa de insulina. El mismo procedimiento se realizó con el segundo ovario.

2.-Decumulación ovocitaria: Este proceso se llevó a cabo 2-4 horas. Los ovocitos fueron denudados, desprendiéndolos del complejo corona-cumulus.

3.-Clasificación de la maduración nuclear ovocitaria: Una vez culminada la decumulación, la identificación de la zona pelucida, el espacio perivitelino, la membrana citoplasmática y el citoplasma del ovocito se procedió a la clasificación de los ovocitos dependiendo de su estado de maduración nuclear de la siguiente manera:

-Ovocitos con vesícula germinal: ovocitos en los que se observa la presencia de la vesícula germinal. Son inmaduros, no aptos para microinyección.

-Ovocitos en metafase I: Son inmaduros y no aptos para microinyección.

-Ovocitos en metafase II: Un ovocito en metafase II de buena morfología debe observarse claramente la presencia del primer corpúsculo polar, intacto, pequeño espacio perivitelino, una zona pelucida incolora y un citoplasma moderadamente granulado (139). Son ovocitos maduros, aptos para ser microinyectados.

-Ovocitos atrésicos o degenerados: No aptos para microinyección.

Posteriormente los ovocitos fueron fecundados mediante fecundación in Vitro/ Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV/ICSI) en función del perfil de la paciente y sometidos a cultivo en un incubadora a 37°C y 6 de presión, A las 16-20 horas se evaluaron los ovocitos con evidencia de fecundación. Los embriones fueron evaluados mediante criterios morfológicos, previamente a la realización de la transferencia con el fin de introducir en el endometrio aquellos embriones con mayor probabilidad de éxito en la implantación. Los embriones del día 3 de buena calidad: se definieron según los criterios de ASEBIR (**Categoría A:** Embrión de óptima

calidad con máxima capacidad de implantación. **Categoría B:** Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación. **Categoría C:** Embrión regular con bajas posibilidades de implantación. **Categoría D:** Embrión de mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación).

Finalmente, la transferencia de 1 ó 2 embriones, según cada caso, se realizó mediante el uso de un catéter de transferencia guiada por ecografía transvaginal.

El embarazo fue confirmado por la medición de la concentración sérica de β hCG, a los 12-14 días, evidencia de saco gestacional, una semana más tarde y embrión con actividad cardíaca (en la semana 6) por ecografía transvaginal.

Vigilancia de reacciones adversas del Parche de Testosterona:

Aunque el riesgo es mínimo, existe la posibilidad de una reacción adversa y están identificados ya que los parches transdérmicos de **Testosterona** se usan para tratar los síntomas de insuficiencia de esta hormona en hombres cuyo organismo no produce suficiente **Testosterona** natural. No obstante, se les realizó un seguimiento a las pacientes para la notificación de alguna reacción adversa.

VARIABLES DE ESTUDIO:

La variable primaria de eficacia fue el número de ovocitos maduros obtenidos. Las variables secundarias incluyeron, días de estimulación, el número de folículos >14 mm, embriones transferidos y número de embarazos por ciclo.

Para describir las variables cualitativas se han utilizado frecuencias absolutas y porcentajes; y en las variables cualitativas con carácter ordinal se han utilizado, además, frecuencias y porcentajes acumulados. La descripción de las variables cuantitativas se ha realizado mediante media, desviación estándar (D.E.), mediana y cuartiles. La comparación de las variables cualitativas entre dos o más grupos se ha llevado a cabo a través del test de la Chi-cuadrado. La comparación de las variables

cuantitativas entre dos grupos se ha llevado a cabo a través del test de la t de Student previa comprobación de la normalidad utilizando el test de Kolmogorov-Smirnoff. La significación estadística se definió como un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 21. (SPSS, Chicago, IL).

RESULTADOS.

Se incluyeron en el estudio 150 pacientes con baja respuesta ovárica que fueron sometidas a tratamientos de estimulación ovárica. Se dividieron en dos grupos según se indicaba parches de **Testosterona** o no: 72 pacientes con parches y 78 pacientes sin parches.

Ambos grupos de estudio fueron comparables al comenzar el estudio, con valores iniciales similares. La edad, fue similar con una media de 36.4 vs 36.7 en el grupo con parches. En cuanto a los años de infertilidad en la pacientes estudiadas la media (en años) fue 2,7 \pm 1,5 vs 2,6 \pm 1,6 en el grupo sin parches.

El IMC (kg/m²) fue 22,2 \pm 2,2 vs 21,8 \pm 3,0 en el control. Los niveles hormonales basales fueron: **AMH** (ng/ml) 1,5 \pm 1,2 vs 2,2 \pm 1,3 en el control, **FSH** (UI/L) 8,8 \pm 4,2 en el control vs 12,1 \pm 5,5, **E2** (pg./ml) 51,6 \pm 30,9 vs 64,1 \pm 49,3 y el número de Folículos antrales de 6,4 vs 5,2 en el grupo con parches (Tabla 2).

Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a:

-En el nivel de **FSH** basal de encontró en valores de 8,8 \pm 4,2 en el grupo sin parches y 12,1 \pm 5,5 en el grupo con parches; con una p=0,013.

-En cuanto al número de folículos antrales se observaron 6,4 \pm 3,9 en el grupo sin parches y 5,2 \pm 2 en el grupo con parches con una p= 0,029.

Tabla 2: Valores iniciales, basales de los grupos de estudio.

Parámetro *	Grupo sin parches (n=78)	Grupo con parches (n=72)	p
Edad (años)	36,4(1,9)	36,7(2,1)	NS
Años de Infertilidad	2,6(1,6)	2,7(1,5)	NS
IMC	21,8(3)	22,2(2,2)	NS
AMH	2,2(1,3)	1,5(1,2)	NS
FSH Basal	8,8(4,2)	12,1(5,5)	0,013
E2 Basal	64,1(49,3)	51,6(30,9)	NS
RFA	6,4(3,9)	5,2(2)	0,029

Valores expresados en Media con DS (95%) y Frecuencia en %.

*

Edad	Expresada en años
Años Infertilidad	Años de infertilidad previos al estudio
IMC	Índice de masa corporal
AMH	Hormona Antimulleriana basal al inicio del estudio día 3-5
FSH	Hormona Folículoestimulante al inicio del estudio día 3-5
E2	Estradiol al inicio del estudio día 3-5
RFA	Recuento de folículos antrales

En cuanto al número de folículos de >14mm se observó $4,7 \pm 3$, en el grupo sin parches y $3,7 \pm 2,2$ en el grupo con parches: con una $p=0,02$.

El número de embriones del 3 día fue de $2,2 \pm 1,9$ en el grupo sin parches y $1,5 \pm 0,8$ en el grupo con parches; con una $p=0,041$.

El número de ovocitos en metafase II recuperados en el grupo con parches tuvo una media de $4,4 \pm 2,7$ vs $5,2 \pm 3,8$ en el grupo sin parches, siendo la diferencia no significativa.

La dosis empleada de **FSH** administrada fue $2031 \pm 542,2$ vs $1824 \pm 638,9$ en el grupo sin parches, y la de **hMGhp** administrada fue $1177,5 \pm 720,3$ vs $1192,1 \pm 680$ sin diferencias estadísticas.

Los embriones del día 3 obtuvieron una media de $1,5 \pm 0,8$ en el grupo con parches y $2,2 \pm 1,9$ cuando no se empleó el parches; con diferencias encontradas con valor de $p=0,004$.

Se transfirieron $1,4 \pm 0,6$ de los embriones en el grupo que empleó parches y $1,6 \pm 0,5$ cuando no se empleó el parche; sin diferencias. Así mismo se congelaron el $0,2 \pm 0,4$ de los embriones y un $0,5 \pm 1$ en el caso que no se usó parche; con diferencias entre grupos de valor $p=0,041$.

En la línea endometrial, en ambos grupos no se encontraron diferencias significativas, con una media de $9,7 \pm 2,8$ en el grupo con parches y $10,7 \pm 2,5$ en el grupo sin el parche.

El diagnóstico de gestación bioquímica (**β -hCG** sérica +) fue de un 79% (57/72) en el grupo con parches y de 39,74% (31/78) en el caso que no se utilizó el parche, medición sin diferencia significativa.

En lo referente al número de gestaciones clínicas obtenidas tras el ciclo de estimulación resultó un 3% mayor en el grupo con parches 24/57(42%) en comparación con el grupo sin parches 27/69(39%), no estadísticamente significativa (Tabla 3).

Por lo tanto, en el grupo en el que se emplearon los parches de **Testosterona**, de los valores basales, la **FSH** basal tuvo un valor inicial más alto cuando se comparó con el grupo que no empleó parches. (12,1 vs 8,8), siendo la diferencia significativa, no siendo así en el caso de la **AMH**, que a pesar de ser menor en el grupo con parches, la diferencia no resultó significativa (1,5 vs 2,2). Sí se encontraron diferencias entre el número de folículos >14 mm (3,7 grupo con parches vs 4,7 grupo sin parches) y entre los embriones del día 3 (1,5 grupo con parche vs 2,2 grupo sin parche), sin embargo no se encontraron diferencias entre el porcentaje de embarazos bioquímicos (79% grupo con parches vs 39.7% grupo sin parches) o el porcentaje de embarazos clínicos (42,1% grupo con parches vs 39,1% grupo sin parches

Tabla 3: Comparación de resultados entre todas las pacientes que recibieron tratamiento de estimulación ovárica. Utilización vs no utilización de parches de Testosterona transdérmica.

Parámetro*	Grupo sin parches (n=78)	Grupo con parches (n=72)	p ^c
Días estimulación	10,4(2,1)	10,7(2,2)	NS
Dosis FSH	1824(638,9)	2031(542,2)	NS
Dosis LH	621,4(299,1)	814,7(210,8)	NS
Dosis Clomifeno	532,7(94,7)	504(20)	NS
Dosis hMGhp	1192,1(680)	1177,5(720,3)	NS
F10-14 mm día hCG	2,3(1,8)	2,1(1,6)	NS
F >14 mm día hCG	4,7(3)	3,7(2,2)	0,02
Grosor endometrial (mm)	10,7(2,5)	9,7(2,8)	NS
E2 día hCG	989,4(744,6)	938(705,5)	NS
Ovocitos recuperados	5,2(3,8)	4,4(2,7)	NS
Ovocitos MII	4,3(3,3)	3,4(2,2)	NS
Células con 2PN	3,2(2,6)	2,7(2,0)	NS
Embriones día 3 de buena calidad	2,2(1,9)	1,5(0,8)	0,004
Embriones listos para transferir	0,9(0,3)	0,8(0,3)	NS
Embriones transferidos	1,6(0,5)	1,4(0,6)	NS
Embriones congelados	0,5(1)	0,2(0,4)	0,041
Embarazo bioquímico	31/78 (39,7%)	57/72 (79%)	NS
Embarazo clínico	27/69 (39,1%)	24/57 (42,1%)	NS

Valores expresados en Media con DS (95%) y Frecuencia en %

*

Días de estimulación	Días de estimulación total desde el comienzo del ciclo por paciente
Dosis FSH administrada	Dosis de FSH administrada durante la estimulación
Dosis hMG administrada	Dosis de hMG administrada durante la estimulación
F 10-14mm día hCG	Número de folículos de 10-14mm el día de administración de hCG
F >14mm día hCG	Número de folículos de 14 mm el día de administración de hCG
Endometrio en mm.	Línea endometrial medida por ecografía en mm el día de administración. HCG
E2 día HCG	Estradiol en sangre el día de administración de hCG
Punción realizada	Número de pacientes a quien se les realizó punción
Ovocitos MII Obtenidos	Número de ovocitos maduros en metafase II obtenidos
Células con 2PN	Número de células con 2 pronúcleos
Ed3 buena calidad	Embriones del 3er día de buena calidad
βhCG sérica	Confirmación bioquímica de gestación
Sacos gestacionales	Confirmación ecográfica de gestación
Gestación Clínica	Número de gestaciones obtenidas. Embrión con latido cardíaco.

Según el tratamiento de estimulación utilizado, la combinación **FSH** recombinante + **hMGhp** o **Clomifeno** + **hMGhp** vs el uso o no de parches se definieron 4 grupos: y se establecen diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a las diferencias encontradas entre estos grupos.

FSH recombinante + **hMGhp** que no usaron parche de **Testosterona** transdérmica (grupo1) y el grupo de **FSH** recombinante + **hMGhp** al que si se administró el parche de **Testosterona** (grupo 2), y entre el mismo grupo (grupo 1) y el grupo al que se le administró Clomifeno + hMGhp y también se le administro el parche de **Testosterona** transdérmica (grupo 4).

No se encontraron diferencias en entre el grupo de tratamiento con **Clomifeno** + **hMGhp** y sin la administración del parche de **Testosterona** transdérmica (grupo 3).

Se observaron diferencias significativas entre los niveles de **FSH** basal entre los grupos 1 y 2, 1 y 4, 2 y 4, con un valor de $p < 0,05$ (tablas 4-5). Así mismo se encontraron diferencias entre el número de folículos antrales entre grupos 1 y 2, 1 y 3, 1 y 4, con una valor de $p < 0,05$.

Se encontraron diferencias entre la dosis de **FSH** administrada entre grupos 1 y 3, 2 y 3, 1 y 4 (tablas 6-7). En cuanto a la dosis de hMG administrada también se encontraron diferencias entre los grupos 1 y 2, 1 y 4.

En relación al número de folículos de hasta 14 mm y número de células con dos pronúcleos, se encontraron diferencias entre grupos 1 y 2, 1 y 4.

Tabla 4: Datos basales descriptivos del grupo con FSH recombinante + hMGhp.

Parámetro*	Grupo 1 sin parches (n=49)	n	Grupo 2 con parches (n=47)	n	p ^c
Edad	36,4 (1,9)	49	36,4 (2,3)	47	NS
Años Infertilidad	2,7(1,8)	46	32,8(1,5)	45	NS
IMC	21,9(3)	37	21(2)	39	NS
AMH	2,2(1,3)	18	1,5(1,2)	33	NS
FSH	8,4(4,2)	31	11,3(4,7)	41	<0,05 ¹
E2	69,9(55,1)	29	54,2(29,1)	30	NS
RFA	7(4.2)	44	5,0(1,6)	47	<0,05 ²

c Valores expresados en Media con DS (95%) y Frecuencia en %

Tabla 5: Datos basales descriptivos de los grupos con Clomifeno + hMGhp al comienzo del estudio.

Parámetro*	Grupo 3 sin parches (n=29)	n	Grupo 4 con parches (n=25)	n	p ^c
Edad	36,3 (2)	29	37,3(1,5)	25	NS
Años Infertilidad	2,5(1)	29	2,5(1,5)	25	NS
IMC	19,9(1,3)	25	21,9(2)	24	NS
AMH	N/A	6	N/A	9	
FSH	11,6 (4)	11	18,5(8,1)	13	<0,05 ¹
E2	49,9(28,1)	12	46(34,9)	14	NS
RFA	5,4(3,2)	25	5,4(2,6)	25	<0,05 ²

c Valores expresados en Media con DS (95%) y Frecuencia en %

*

Edad	Expresada en años
Años Infertilidad	Años de infertilidad previos al estudio
IMC	Índice de masa corporal
AMH	Hormona Antimulleriana basal al inicio del estudio día 3-5
FSH	Hormona Folículoestimulante al inicio del estudio día 3-5
E2	Estradiol al inicio del estudio día 3-5
RFA	Recuento de folículos antrales

	Significancia encontrada entre los grupos según tratamiento de estimulación y uso de parche de Testosterona .
1	Grupo 1 vs 2/ Grupo 1 vs 4/ Grupo 2 vs 4
2	Grupo 1 vs 2/ Grupo 1 vs 3/ Grupo 1 vs 4
3	Grupo 1 vs 3/ Grupo 2 vs 3/ Grupo 3 vs 4
4	Grupo 1 vs 3/ Grupo 1 vs 4/ Grupo 2 vs 3/ Grupo 2 vs 4
5	Grupo 1 vs 2/ Grupo 1 vs 4

Tabla 6: Comparación de resultados entre los grupos que recibieron FSH recombinante + hMGhp y el uso o no del parche de Testosterona transdérmica.

Parámetro *	Grupo 1 sin parches (n=49)	n	Grupo 2 con Parches (n=47)	n	p ^c
Días de estimulación	10,3(2)	49	10,4(2,2)	47	NS
Dosis FSH administrada	1938,5(570,8)	48	2065,1(531,6)	43	<0,05 ³
Dosis hMG administrada	925,6(495,6)	40	955,3(622,4)	41	<0,05 ²
F10-14mm_día hCG	2,4(1,7)	49	2,1(1,6)	47	NS
F>14mm día hCG	5,2(3,1)	49	3,7(2,2)	47	<0,05 ⁵
Endometrio en mm.	10,8(2,3)	47	9,9(3)	32	NS
E2 día hCG	925,5(481,6)	44	890,6(611)	43	NS
Punción realizada	45/4 (91,8%)	49	47/47(100%)	47	NS
Ovocitos MII Obtenidos	4,7(3,9)	49	3,6(1,6)	45	NS
Células con 2PN	3,5(2,9)	45	2,7(1,3)	42	NS
Ed3	2,4(2,2)	44	1,6(0,8)	42	<0,05 ⁵
Embriones Transferidos	1,6(0,5)	41	1,5(0,6)	41	NS
Embriones congelados	10/40(25%)	40	27/43(62,7%)	43	NS
bhCG + sérica	20/40(50%)	40	19/44(43,1%)	44	NS
Sacos gestacionales	22/40(55%)	40	24/43(5,8%)	43	NS
Gestación Clínica	18/40(45%)	40	16/43(37,2%)	43	NS

^cValores expresados en Media con DS (95%) y Frecuencia en %

	Significancia encontrada entre los grupos según tratamiento de estimulación y uso de parche de Testosterona .
1	Grupo 1 vs 2/ Grupo 1 vs 4/ Grupo 2 vs 4
2	Grupo 1 vs 2/ Grupo 1 vs 3/ Grupo 1 vs 4
3	Grupo 1 vs 3/ Grupo 2 vs 3/ Grupo 3 vs 4
4	Grupo 1 vs 3/ Grupo 1 vs 4/ Grupo 2 vs 3/ Grupo 2 vs 4
5	Grupo 1 vs 2/ Grupo 1 vs 4

Tabla 7: Comparación de resultados entre los grupos que recibieron Clomifeno + hMGhp y el uso o no del parche de Testosterona transdérmica.

Parámetro *	Grupo 3 sin parches (n=29)	n	Grupo 4 con parches (n=25)	n	p
Días de estimulación	10,6(2,1)	29	11,5(2,1)	25	NS
Dosis FSH administrada	908,3(363,8)	6	1821,4(602,6)	8	<0,05 ³
Dosis hMG administrada	839,8(281,4)	24	1695,8(678,2)	19	<0,05 ²
Dosis Clomifeno	538,3(94,3)	29	504,1(20,4)	25	NS
F10-14mm_día hCG	2,2(1,9)	29	2,1(1,7)	25	<0,05 ⁵
F>14mm día hCG	3,9(2,6)	29	3,7(2,4)	25	NS
Endometrio en mm	9,8(3,2)	29	9,1(2,3)	25	NS
E2 día HCG	1102,4(1065,9)	28	1037,5(880,2)	22	NS
Punción realizada	29/29 (100%)	29	25/25(100%)	25	NS
Ovocitos MII Obtenidos	3,6(1,8)	29	3,2(3)	25	NS
Células con 2PN	2,7(1,4)	26	2,6(3,2)	19	<0,05 ⁵
Ed3	2(0,9)	26	1,2(0,8)	18	NS
Embriones transferidos	1,7(0,6)	26	1,1(0,6)	17	NS
Embriones congelados	7/26(26,9%)	26	2/17(11,7%)	17	NS
βhCG + sérica	12/26(46,1%)	26	7/17(41,1%)	17	NS
Sacos gestacionales	12/26 (46,1%)	26	8/17(47%)	17	NS
Gestación Clínica	11/26(42,3%)	26	6/17(35,2%)	17	NS

Valores expresados en Media con DS (95%) y Frecuencia en %

*

Días de estimulación	Días de estimulación total desde el comienzo del ciclo por paciente
Dosis FSH administrada	Dosis de FSH administrada durante la estimulación
Dosis hMG administrada	Dosis de hMG administrada durante la estimulación
F 10-14mm día hCG	Número de folículos de 10-14mm el día de administración de hCG
F >14mm día hCG	Número de folículos de 14 mm el día de administración de hCG
Endometrio en mm.	Línea endometrial medida por ecografía en mm el día de administración. HCG
E2 día HCG	Estradiol en sangre el día de administración de hCG
Punción realizada	Número de pacientes a quien se les realizó punción
Ovocitos MII Obtenidos	Número de ovocitos maduros en metafase II obtenidos
Células con 2PN	Número de células con 2 pronúcleos
Ed3 buena calidad	Embriones del 3er día de buena calidad
βhCG sérica	Confirmación bioquímica de gestación
Sacos gestacionales	Confirmación ecográfica de gestación
Gestación Clínica	Número de gestaciones obtenidas. Embrión con latido cardíaco.

DISCUSIÓN.

El propósito de este estudio fue el de determinar la influencia de la **Testosterona** transdérmica, tras su aplicación durante cinco días, en la respuesta ovárica de bajas respondedoras a través de la medición del número de folículos maduros y ovocitos en metafase II en pacientes que recibieron tratamientos de reproducción asistida.

En el grupo estudiado, de 150 pacientes, la edad media fue de 36 años. No se encontró una relación significativa, en este estudio, con la aplicación del parche de **Testosterona** en la respuesta ovárica, y a pesar de que se observó una gestación clínica un 3% mayor en el grupo en el que se empleó el parche de **Testosterona** (27/69 embarazos clínicos en pacientes, grupo sin parche (39,1%) vs 24/57, embarazos clínicos en pacientes (42,1%) grupo con parche), esta diferencia no fue significativa.

Se observó una diferencia significativa en el número de folículos >14 mm obtenidos tras de la aplicación del parche (4,7 grupo sin parche vs 3,7 grupo con parches. $p=0,02$), sin embargo la diferencia no fue significativa en el número de ovocitos en metafase II: 4,3 grupo sin parches vs 3,7 grupo con parches y aunque la diferencia entre los embriones en el día 3 de buena calidad fue significativa, la obtención de embarazos clínicos no lo fue.

Aparentemente, el grupo tratado con parches de **Testosterona** parece tener un peor pronóstico inicial, ya que eran pacientes con **FSH** basal más alta, menor número de folículos antrales y una **AMH** mas baja.

Los niveles de **FSH** basales fueron más altos en el grupo con parches, con una media de 12,1 vs un 8,8 de las pacientes sin parches ($p=0,013$) y también una media de folículos antrales menor que en el grupo sin parches (5,2 vs 6,4 $p=0,029$), siendo los niveles basales de **AMH** más bajos en las pacientes del grupo con

parches, la diferencia no fue significativa en este caso (2,2 grupo sin parches vs 1,5 grupo sin parches), por lo que las diferencias no eran tan marcadas.

La secreción hipofisaria de **FSH** se incrementa conforme disminuye la reserva ovárica. Sin embargo, pacientes con una concentración basal normal de **FSH** no siempre responden bien a la Hiperestimulación ovárica controlada (HOV), y sus niveles fluctúan con los días del ciclo y de mes a mes. Esto ha sido demostrado en varios trabajos en los que se evidencia un incremento de los valores de la **FSH** en los estadios foliculares tempranos en las baja respondedoras (140). Por eso cada vez empleamos la **AMH** como predictor de respuesta ovárica, y nuestras pacientes presentaron concentraciones de **AMH** comparables entre grupos, aunque levemente disminuida en el grupo de pacientes que recibieron parches de **Testosterona**.

Un aspecto clave en la medicina reproductiva es la disminución en calidad y cantidad de los ovocitos con la edad (141). El impacto de esto se demuestra más estrechamente con la demanda creciente de tratamientos con ovodonación en procedimientos de FIV. La tasa de abortos se incrementa a medida que se incrementa la edad (142), sin dejar de mencionar la asociación con aneuploidias cromosómicas en el embrión, por ejemplo, la incidencia de Trisomía 21 a la edad de 25 años es 1 en 1500 y 1 en 16 a la edad de 40 años (142), siendo lo más probable que otros procesos bioquímicos en el ovocito sean relevantes, como los cambios en la función mitocondrial que varían con la edad.

La fertilidad humana comienza a declinar a partir de los 30 años, pero el cambio en la función endocrina ovárica, por ejemplo en la biosíntesis de los estrógenos, es poco comprendida (143), de hecho, la edad es el factor predictor más importante en el éxito de los tratamiento de reproducción asistida (144).

El envejecimiento está asociado con un incremento en la agregación mitocondrial y una reducción en las concentraciones citoplasmáticas del ATP en los ovocitos en metafase II (145).

Ante la evidencia contundente de que la fertilidad femenina disminuye con la edad, ¿qué pasos podrían darse para mejorar estos casos? En esencia se han usado dos diferentes aproximaciones para manejar esta situación. La primera se enfoca en la mejoría de la calidad de los embriones en los ciclos de FIV en mujeres mayores que son sometidas a despistaje de aneuploidias y la segunda, tratar de preservar ovocitos desde la edad joven (141).

Otro de los problemas en medicina reproductiva, es sin duda, saber si la reserva ovárica funcional puede ser mejorada farmacológicamente (70). Esta puede ser una de las razones por las cuales se emplea la DHEA en los centros de FIV, ya que dicha suplementación aumenta la calidad/cantidad embrionaria así como la probabilidad de embarazos. La administración de DHEA ha demostrado mejorar los resultados en la obtención de embarazos en mujeres con la reserva ovárica funcional disminuida de forma severa y con ROFD y niveles indetectables a bajos de AMH (<0,4 ng/dl) (70).

Datos histológicos han confirmado que tanto en humanos como en animales el número de folículos pequeños en crecimiento se relaciona con el número de folículos que no lo están, conllevando a la interpretación de que las concentraciones de **AMH** pueden reflejar la reserva folicular primordial (146). Otros trabajos han permitido concluir que la **AMH** tiene la misma precisión comparada con el RFA en predecir la baja respuesta a la estimulación ovárica, aunque la predicción del embarazo continua, aún, siendo difícil de precisar (111).

De acuerdo con los resultados publicados, el punto de corte de la **AMH** se encuentra en el rango comprendido entre 0,7-1.3 ng/ml, considerándose valores aceptables para la predicción de la baja respuesta en FIV (147). En el grupo de este estudio la media de **AMH** fue de 1,5 en el grupo con parches vs 2,2 en el grupo sin parches, y aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, que las mujeres tratadas con **Testosterona** tenían una concentración de **AMH** algo menor.

La individualización de cualquier tratamiento, según las características del paciente, no es algo nuevo en el campo de la medicina, pero si es un concepto reciente en medicina de la reproducción (147).

El objetivo principal de esta individualización es ofrecerle a cada mujer el mejor tratamiento adaptado a sus necesidades y características particulares, optimizando los resultados y eliminando reacciones adversas como el Síndrome de Hiperestimulación ovárica, y minimizando el riesgo de cancelación del ciclos (147).

La disponibilidad de los nuevos marcadores de reserva ovárica, la mejoría en la metodología para su medición y la amplia información disponible apoyan la observación de que el tratamiento de FIV para el paciente debe ser individualizado. Estas son las bases para la correcta selección de la mujer para el uso de los diferentes análogos de GnRH, y para el fino ajuste de la dosis de gonadotropinas. El objetivo final será la selección de un tratamiento efectivo para la estimulación ovárica el cual ha de ser bien balanceado entre el riesgo de máxima y sub óptima respuesta ovárica (147).

Sin embargo, según la revisión presentada por La Marca y Sunkara (147), aún es necesaria una definición clara para la modalidad de la correcta aplicación del tratamiento individualizado, que todavía requiere ser optimizado en eficacia y manejo clínico (147).

En línea con las recomendaciones de la revisión de La Marca (2014) (147), en este trabajo las dosis empleadas para los tratamientos de estimulación fueron individualizadas según las características de la paciente, aplicando, según el caso, tratamiento sólo con **FSH/hMG** o la estimulación con citrato de **Clomifeno**.

En el grupo de pacientes que sólo recibieron **FSH/hMG** se encontraron diferencias significativas en obtener >5 folículos de >14 mm, (5,2 grupo sin parche vs 3,7 grupo con parche $p < 0.05$) así como los embriones del día 3 de buena calidad, (2,4 vs 1,6 respectivamente. $p < 0.05$) sin embargo, esto no se reflejó de forma significativa en la media de embarazos clínicos (Tabla 3).

Y en el grupo que también recibió estimulación ovárica con **Clomifeno/hMG**, se encontraron diferencias significativas sólo en la obtención de 0-4 folículos >14 mm (2,2 grupo sin parche vs 2,1 grupo con parche, $p < 0.05$), y en la media de células con 2PN (2,7 vs 2,6 respectivamente, $p < 0.05$). Esto puede explicarse por las características de las pacientes que se seleccionaron para este trabajo.

Llama la atención el hecho de que la **FSH** basal del grupo de pacientes a las que se le indicó el parche de **Testosterona**, que recibieron Citrato de **Clomifeno** fue más alta que en los demás grupos (18,5 vs 11,6 en el grupo sin parche. $p < 0.05$) con diferencias significativas. Y aunque la obtención de embarazos clínicos no fue significativa y menor con respecto al grupo sin parches un 7%, la relevancia clínica de estos embarazos quizá pueda explicarse debido a la aplicación del parche de **Testosterona**. Pero como comentamos anteriormente, parece una concentración de **FSH** basal diferente, pero la **AMH** fue comparable entre grupos, luego, tal vez no refleje una diferencia real desde el punto de vista biológico.

Algunos investigadores, empleando diferentes tratamientos, han buscado demostrar la influencia del uso de testosterona exógena en pacientes con baja respuesta.

Un estudio prospectivo aleatorizado, de 110 pacientes con baja respuesta ovárica, divididas en dos grupos, al que se le administró **Testosterona** transdérmica en gel 12.5 mg, diariamente durante 21 días previo al inicio del ciclo de estimulación ovárica controlada para FIV y un grupo control, encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de folículos maduros, ovocitos fecundados y embriones de buena calidad. La tasa de embarazos fue significativamente más alta en el grupo al que se le administró **Testosterona** en comparación con el grupo control, sin embargo, a pesar de que la tasa de embarazos vivos fue también más alta, el resultado se mostró cercano a la significancia (124).

Otro estudio aleatorizado de 62 pacientes, utilizando testosterona transdérmica mostró un porcentaje de ciclos con baja respuesta, significativamente menor en el grupo al que se le aplicó la **Testosterona** transdérmica vs el grupo control (120).

Recordemos que, los niveles séricos de **Testosterona** disminuyen significativamente alrededor de la cuarta década de la vida, con una correlación positiva entre el número de ovocitos obtenidos en los ciclos de FIV (148).

En un estudio prospectivo aleatorizado, doble ciego, de 12 pacientes entre 38 y 45 años que recibieron 12 días de tratamiento previo a FIV parches de testosterona (2,5mg por parche) se concluyó que un ciclo corto de andrógenos no tiene efecto significativo en el número de folículos (mayores de 10 mm) durante la estimulación con **FSH** en mujeres con edades reproductivas mayores (122).

El manejo adecuado de las pacientes que presentan baja respuesta es todavía el mayor reto en el área de la reproducción asistida (125). Se han propuesto numerosas estrategias en el tratamiento de las baja respuesta para mejorar el resultado de este grupo de pacientes pero hasta el momento no se han alcanzado ventajas de unos protocolos en otros. Recientemente se ha revisado cuál sería el medio hormonal final adecuado para el desarrollo folicular pre ovulatorio en las pacientes que presentan baja respuesta y que serán sometidas a ciclos sin estimulación.

El estudio nos sugiere que el problema con las pacientes que presentan baja respuesta no es la concentración folicular pre ovulatoria final, muy similar al de las respondedoras normales, el problema reside en la habilidad para responder a los tratamientos de estimulación ovárica (149).

Según los resultados de este trabajo, podríamos resaltar que, la estrategia de androgenización folicular, es una alternativa para el tratamiento de las pacientes con baja respuesta ovárica, sin embargo, no todas las pacientes son candidatas para recibir el tratamiento previo con Testosterona, por lo que, como a mencionamos previamente, es importante individualizar cada tratamiento de reproducción asistida a las características y necesidades de nuestras pacientes.

Nuestro estudio, ha presentado limitaciones, sin embargo ha permitido conocer los elementos a tomar en cuenta para futuras investigaciones.

Una de las limitaciones principales fue el de no contar con todos los valores hormonales basales de **AMH** y **FSH** en los dos grupos de pacientes, lo cual hubiera permitido hacer un análisis más en profundidad sobre la baja respuesta ovárica de las pacientes incluidas.

Otra de las limitaciones, fue el de no considerar, como variable, la medición de las concentraciones de la **Testosterona** en las pacientes, tanto basales como posterior a la administración del parche, lo que podría haber permitido crear el perfil de la paciente candidata para recibir un tratamiento para la baja respuesta ovárica que incluyera la androgenización folicular.

Esto nos lleva a proponer la realización de nuevos estudios prospectivos, aleatorizados que busquen demostrar la respuesta ovárica posterior a la administración del parche de **Testosterona**, tomándose en cuenta, la edad de la paciente, RFA y valores basales de **AMH** en pacientes con baja respuesta ovárica y la administración de parches de **Testosterona** en los casos en los que las concentraciones de **AMH** están disminuidas.

Así mismo, sería de interés la medición de la concentración, basal y posterior al tratamiento, de la **Testosterona** sérica, en las pacientes que recibirán tratamientos de reproducción asistida, y medir el grado de respuesta ovárica, número final de ovocitos en metafase II, tasas de embarazos clínicos así como la tasa de nacimientos vivos.

CONCLUSIONES.

A continuación se enumeran las conclusiones de este estudio:

1.-Basadas en las conclusiones en ensayos preclínicos en modelos de animales con SOPQ, hasta el momento, se puede decir que los andrógenos:

- Pueden favorecer el reclutamiento folicular
- Potencialmente pueden tener tanto efectos positivos como negativos sobre la maduración folicular, por lo que no sólo presentan efectos negativos como se creía hasta ahora.

2.- La baja respuesta es uno de los retos diarios del clínico en la consulta de infertilidad. Se estima que la incidencia de bajas respondedoras en la población que realizan FIV es del 9-24%.

3.-Las mujeres >40 años pueden, potencialmente beneficiarse de la administración directa de **Testosterona**, por lo que la evaluación de los niveles de andrógenos en las mujeres con baja respuesta ovárica puede ser de gran utilidad.

4.- Por definición, el término baja respuesta ovárica se refiere a la respuesta ovárica y, un ciclo de estimulación es considerado esencial para el diagnóstico de baja respuesta.

5.- En nuestro trabajo, no se encontró una relación significativa, con la aplicación del parche de **Testosterona** en la respuesta ovárica, y a pesar de que se observó una gestación clínica un 3% mayor en el grupo en el que se empleó el parche de **Testosterona** esta diferencia no fue significativa.

6.- El uso del parche de **Testosterona** en este grupo de pacientes no produjo diferencias significativas en la respuesta de pacientes con baja respuesta ovárica.

7.- La estrategia de androgenización folicular, es una alternativa para el tratamiento de las pacientes con baja respuesta ovárica, sin embargo, no todas las pacientes son candidatas para recibir el tratamiento previo con **Testosterona**, por lo que, es importante individualizar cada tratamiento de reproducción asistida a las características y necesidades de nuestras pacientes.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update* 2012;18:73-91.
2. Yang DZ, Yang W, Li Y, He Z. Progress in understanding human ovarian folliculogenesis and its implications in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:213-9.
3. O'Herlihy C, De Crespigny LJ, Robinson HP. Monitoring ovarian follicular development with real-time ultrasound. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:613-8.
4. Pache TD, Wladimiroff JW, de Jong FH, Hop WC, Fauser BC. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril.* 1990;54:638-42.
5. Jokubkiene L, Sladkevicius P, Rovas L, Valentin L. Assessment of changes in volume and vascularity of the ovaries during the normal menstrual cycle using three-dimensional power Doppler ultrasound. *Hum Reprod.* 2006;21:2661-8.
6. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986;1:81-7.
7. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod.* 2008;23:699-708.
8. Messinis IE. From menarche to regular menstruation: endocrinological background. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:49-56.
9. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2003;80:116-22.
10. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev.* 1997;18:71-106.

11. Koering MJ. Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Macaca mulatta*. *Am J Anat*. 1969;126:73-101.
12. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996;17:121-55.
13. Devoto L, Fuentes A, Kohen P, Cespedes P, Palomino A, Pommer R, et al. The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertil Steril*. 2009;92:1067-79.
14. Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, et al. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod*. 2010;25:221-7.
15. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod*. 2003;69:1023-31.
16. McNatty KP. Hormonal correlates of follicular development in the human ovary. *Aust J Biol Sci*. 1981;34:249-68.
17. McNatty KP, Hillier SG, van den Boogaard AM, Trimpos-Kemper TC, Reichert LE, Jr., van Hall EV. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;56:1022-31.
18. Hackeloer BJ, Fleming R, Robinson HP, Adam AH, Coutts JR. Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;135:122-8.
19. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Baerwald AR, Pierson RA. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biol Reprod*. 2004;71:1195-201.
20. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008;69:72-80.

21. Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology*. 2012;78:1733-48.
22. McCorkell R, Woodbury M, Adams GP. Ovarian follicular and luteal dynamics in wapiti during the estrous cycle. *Theriogenology*. 2006;65:540-56.
23. Bishop CV, Sparman ML, Stanley JE, Bahar A, Zelinski MB, Stouffer RL. Evaluation of antral follicle growth in the macaque ovary during the menstrual cycle and controlled ovarian stimulation by high-resolution ultrasonography. *Am J Primatol*. 2009;71:384-92.
24. Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 2009;72:81-90.
25. Araki S, Chikazawa K, Akabori A, Ijima K, Tamada T. Hormonal profile after removal of the dominant follicle and corpus luteum in women. *Endocrinol Jpn*. 1983;30:55-70.
26. Schipper I, Hop WC, Fauser BC. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1292-8.
27. Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*. 2004;71:1244-51.
28. Bodensteiner KJ, Wiltbank MC, Bergfelt DR, Ginther OJ. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*. 1996;45:499-512.

29. Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev.* 2003;49:259-69.
30. Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod.* 2000;62(4):920-7.
31. Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;225:29-36.
32. Findlay JK. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 1993;48:15-23.
33. Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG, Ernst E. Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. *Hum Reprod.* 2010;25:1282-7.
34. Mihm M, Evans AC. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 2:48-56.
35. Grondahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, et al. Anti-Mullerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2011;22:389-98.
36. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006;132:191-206.
37. Jesionowska H, Hemmings R, Guyda HJ, Posner BI. Determination of insulin and insulin-like growth factors in the ovarian circulation. *Fertil Steril.* 1990;53:88-91.

38. Eden JA, Jones J, Carter GD, Alaghband-Zadeh J. A comparison of follicular fluid levels of insulin-like growth factor-1 in normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1988;29:327-36. 3251671.
39. el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT, Jr., Yen SS. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77:1411-8.
40. Hourvitz A, Widger AE, Filho FL, Chang RJ, Adashi EY, Erickson GF. Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4916-20.
41. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev*. 1999;20:535-82.
42. Mason HD, Cwyfan-Hughes S, Holly JM, Franks S. Potent inhibition of human ovarian steroidogenesis by insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:284-7.
43. Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 2006;131:1-9.
44. Themmen AP. Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005:18-21.
45. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999;140:5789-96.
46. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2002;143:1076-84.

47. Chikazawa K, Araki S, Tamada T. Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;62:305-13.
48. Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY, Byskov AG. Contralateral selection of dominant follicle favours pre-embryo development. *Hum Reprod.* 1996;11:1958-62.
49. Baird DT, Backstrom T, McNeilly AS, Smith SK, Wathen CG. Effect of enucleation of the corpus luteum at different stages of the luteal phase of the human menstrual cycle on subsequent follicular development. *J Reprod Fertil.* 1984;70:615-24.
50. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Form and function of the corpus luteum during the human menstrual cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005;25:498-507.
51. Ginther OJ, Beg MA, Gastal EL, Gastal MO, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction.* 2005;130:379-88.
52. Baerwald AR, Walker RA, Pierson RA. Growth rates of ovarian follicles during natural menstrual cycles, oral contraception cycles, and ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril.* 2009;91:440-9.
53. Filicori M, Cognigni GE, Tabarelli C, Pocognoli P, Taraborrelli S, Spettoli D, et al. Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1156-61.
54. Nielsen ME, Rasmussen IA, Kristensen SG, Christensen ST, Mollgard K, Wreford Andersen E, et al. In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Mol Hum Reprod.* 2011;17:63-70.

55. Hernandez ER, Hurwitz A, Vera A, Pellicer A, Adashi EY, LeRoith D, et al. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:419-25.
56. Gueripel X, Brun V, Gougeon A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol Reprod.* 2006;75:836-43.
57. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010;140:489-504.
58. Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2007;15:326-37.
59. Campbell BK, Baird DT, Webb R. Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. *J Reprod Fertil.* 1998;112:69-77.
60. Yang MY, Fortune JE. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Biol Reprod.* 2006;75:924-32.
61. Hillier SG, Tetsuka M, Fraser HM. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum Reprod.* 1997;12:107-11.
62. Belgorosky D, Sander VA, Yorio MP, Faletti AG, Motta AB. Hyperandrogenism alters intraovarian parameters during early folliculogenesis in mice. *Reprod Biomed Online.* 2010;20:797-807.
63. Li M, Schatten H, Sun QY. Androgen receptor's destiny in mammalian oocytes: a new hypothesis. *Mol Hum Reprod.* 2009;15:149-54.
64. Gleicher N, Kim A, Weghofer A, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, Lee HJ, et al. Starting and resulting testosterone levels after androgen supplementation determine

at all ages in vitro fertilization (IVF) pregnancy rates in women with diminished ovarian reserve (DOR). *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:49-62.

65. Shi X, Li N, Liao C, Shu Q, Zhu F. Glucocorticoid or androgen for autoimmune premature ovary failure in mice. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009;34:576-81.

66. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2007;28:1-6.

67. Gleicher N, Weghofer A, Lee IH, Barad DH. FMR1 genotype with autoimmunity-associated polycystic ovary-like phenotype and decreased pregnancy chance. *PLoS One.* 2010;5:e15303.

68. Hossein Rashidi B, Hormoz B, Shahrokh Tehraninejad E, Shariat M, Mahdavi A. Testosterone and dehydroepiandrosterone sulphate levels and IVF/ICSI results. *Gynecol Endocrinol.* 2009;25:194-8.

69. Lenie S, Smitz J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 2009;80:685-95.

70. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:23.

71. Homburg R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2009;24:1548-55.

72. Lutz LB, Jamnongjit M, Yang WH, Jahani D, Gill A, Hammes SR. Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands. *Mol Endocrinol.* 2003;17:1106-16.

73. Romero S, Smitz J. Exposing cultured mouse ovarian follicles under increased gonadotropin tonus to aromatizable androgens influences the steroid balance and reduces oocyte meiotic capacity. *Endocrine*. 2010 38:243-53.
74. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment? *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:116.
75. Yang JL, Zhang CP, Li L, Huang L, Ji SY, Lu CL, et al. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis. *Endocrinology*. 2010 151:774-82.
76. Qureshi AI, Nussey SS, Bano G, Musonda P, Whitehead SA, Mason HD. Testosterone selectively increases primary follicles in ovarian cortex grafted onto embryonic chick membranes: relevance to polycystic ovaries. *Reproduction*. 2008;136:187-94.
77. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest*. 1998 15;101:2622-9.
78. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2951-6.
79. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update*. 2011;17:17-33.
80. Barad DH, Gleicher N. Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone. *Fertil Steril*. 2005;84:756.

81. Gleicher N, Barad DH. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve (DOR). *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:67.
82. Buster JE, Casson PR, Straughn AB, Dale D, Umstot ES, Chiamori N, et al. Postmenopausal steroid replacement with micronized dehydroepiandrosterone: preliminary oral bioavailability and dose proportionality studies. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1163-8.
83. Barad D, Brill H, Gleicher N. Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:629-34.
84. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 2002;20:3001-15.
85. Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Hum Reprod.* 2000;15:2471-7.
86. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, et al. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5925-33.
87. Nejad ES, Saedi T, Saedi S, Rashidi BH, Nekoo ZA, Jahangiri N. Comparison of in vitro fertilisation success in patients with polycystic ovary syndrome and tubal factor. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27:117-20.
88. Weghofer A, Munne S, Chen S, Barad D, Gleicher N. Lack of association between polycystic ovary syndrome and embryonic aneuploidy. *Fertil Steril.* 2007;88(4):900-5.

89. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia E, Di Girolamo G, Gonzalez C, et al. Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*. 2006;131:591-602.
90. Casson PR, Santoro N, Elkind-Hirsch K, Carson SA, Hornsby PJ, Abraham G, et al. Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: a six-month trial. *Fertil Steril*. 1998;70:107-10.
91. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 8:127-41.
92. Zhu JQ, Zhu L, Liang XW, Xing FQ, Schatten H, Sun QY. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:260-6.
93. Ferk P, Perme MP, Teran N, Gersak K. Androgen receptor gene (CAG)_n polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008;90:860-3.
94. Gleicher N, Weghofer A, Lee IH, Barad DH. Association of FMR1 genotypes with in vitro fertilization (IVF) outcomes based on ethnicity/race. *PLoS One*. 2011;6:e18781.
95. Dasgupta S, Sirisha PV, Neelaveni K, Anuradha K, Reddy AG, Thangaraj K, et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and epigenetic influence among the south Indian women with Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One*. 2010;5:e12401.
96. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011;26:1616-24.
97. Bosdou JK, Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Zepiridis L, et al. The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders

undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012;18:127-45.

98. Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Fauser BC. 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*. 2002 78:291-7.

99. Goverde AJ, McDonnell J, Schats R, Vermeiden JP, Homburg R, Lambalk CB. Ovarian response to standard gonadotrophin stimulation for IVF is decreased not only in older but also in younger women in couples with idiopathic and male subfertility. *Hum Reprod*. 2005;20:1573-7.

100. El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P. Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve--an eight year study. *Hum Reprod*. 2002 Jun;17:1519-24.

101. De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet*. 2010;376:911-21.

102. Gleicher N, Weghofer A, Oktay K, Barad D. Relevance of triple CGG repeats in the FMR1 gene to ovarian reserve. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:385-90.

103. Keay SD, Barlow R, Eley A, Masson GM, Anthony FW, Jenkins JM. The relation between immunoglobulin G antibodies to *Chlamydia trachomatis* and poor ovarian response to gonadotropin stimulation before in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998;70:214-8.

104. Garcia-Velasco JA, Somigliana E. Management of endometriomas in women requiring IVF: to touch or not to touch. *Hum Reprod*. 2009;24:496-501.

105. Oktem O, Oktay K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer*. 2007;110:2222-9.

106. Brodin T, Bergh T, Berglund L, Hadziosmanovic N, Holte J. Menstrual cycle length is an age-independent marker of female fertility: results from 6271 treatment cycles of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008;90:1656-61.
107. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010;16:113-30.
108. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000;21:200-14.
109. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril*. 2009;91:705-14.
110. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12:685-718.
111. Verhagen TE, Hendriks DJ, Bancsi LF, Mol BW, Broekmans FJ. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2008;14:95-100.
112. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Te Velde ER. A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril*. 2004 81:1247-53.
113. Hanoch J, Lavy Y, Holzer H, Hurwitz A, Simon A, Revel A, et al. Young low responders protected from untoward effects of reduced ovarian response. *Fertil Steril*. 1998;69:1001-4.
114. Ulug U, Ben-Shlomo I, Turan E, Erden HF, Akman MA, Bahceci M. Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a

retrospective study in 300 consecutive cycles. *Reprod Biomed Online*. 2003;6:439-43.

115. Feigenberg T, Simon A, Ben-Meir A, Gielchinsky Y, Laufer N. Role of androgens in the treatment of patients with low ovarian response. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:888-98.

116. Frattarelli JL, Peterson EH. Effect of androgen levels on in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2004;81:1713-4.

117. Frattarelli JL, Gerber MD. Basal and cycle androgen levels correlate with in vitro fertilization stimulation parameters but do not predict pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2006;86:51-7.

118. Massin N, Cedrin-Durnerin I, Coussieu C, Galey-Fontaine J, Wolf JP, Hugues JN. Effects of transdermal testosterone application on the ovarian response to FSH in poor responders undergoing assisted reproduction technique--a prospective, randomized, double-blind study. *Hum Reprod*. 2006;21:1204-11.

119. Balasch J, Fabregues F, Penarrubia J, Carmona F, Casamitjana R, Creus M, et al. Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Hum Reprod*. 2006 Jul;21:1884-93.

120. Fabregues F, Penarrubia J, Creus M, Manau D, Casals G, Carmona F, et al. Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. *Hum Reprod*. 2009;24:349-59.

121. Sipe CS, Van Voorhis BJ. Testosterone patch improves ovarian follicular response to gonadotrophins in a patient with Kallmann's syndrome: a case report. *Hum Reprod*. 2007;22:1380-3.

122. Sipe CS, Thomas MR, Stegmann BJ, Van Voorhis BJ. Effects of exogenous testosterone supplementation in gonadotrophin stimulated cycles. *Hum Reprod.* 2010;25:690-6.
123. Qin Y, Zhao Z, Sun M, Geng L, Che L, Chen ZJ. Association of basal serum testosterone levels with ovarian response and in vitro fertilization outcome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:9.
124. Kim CH, Howles CM, Lee HA. The effect of transdermal testosterone gel pretreatment on controlled ovarian stimulation and IVF outcome in low responders. *Fertil Steril.* 2011;95:679-83.
125. Sunkara SK, Pundir J, Khalaf Y. Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2011;22:545-55.
126. Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:521-7.
127. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Mullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2010;94:2824-7.
128. Sowers MF, Zheng H, McConnell D, Nan B, Karvonen-Gutierrez CA, Randolph JF, Jr. Testosterone, sex hormone-binding globulin and free androgen index among adult women: chronological and ovarian aging. *Hum Reprod.* 2009;24:2276-85.
129. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Age-specific levels for basal follicle-stimulating hormone assessment of ovarian function. *Obstet Gynecol.* 2007;109:1404-10.

130. Garcia-Velasco JA, Rodriguez S, Agudo D, Pacheco A, Schneider J, Pellicer A. FSH receptor in vitro modulation by testosterone and hCG in human luteinized granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;165:259-64.
131. Garcia-Velasco JA. The use of aromatase inhibitors in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2012;98:1356-8.
132. De Ziegler D. The dawning of the non-cancer uses of aromatase inhibitors in gynaecology. *Hum Reprod.* 2003 18:1598-602.
133. Sanchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smitz J. Different follicle-stimulating hormone exposure regimens during antral follicle growth alter gene expression in the cumulus-oocyte complex in mice. *Biol Reprod.* 2010;83:514-24.
134. Zeleznik AJ, Little-Ihrig L, Ramasawamy S. Administration of dihydrotestosterone to rhesus monkeys inhibits gonadotropin-stimulated ovarian steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:860-6.
135. Casson PR, Kristiansen SB, Umstot E, Carson SA, Buster JE. Ovarian hyperstimulation augments adrenal dehydroepiandrosterone sulfate secretion. *Fertil Steril.* 1996;65:950-3.
136. Wang H, Andoh K, Hagiwara H, Xiaowei L, Kikuchi N, Abe Y, et al. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology.* 2001;142:4930-6.
137. Mazer NA. New clinical applications of transdermal testosterone delivery in men and women. *J Control Release.* 2000;65:303-15.
138. Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Carmona F, Casamitjana R, et al. Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod.* 2005;20:622-8.

139. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update*. 2003;9:251-62.
140. Vladimirov IK, Tacheva DM, Kalinov KB, Ivanova AV, Blagoeva VD. Prognostic value of some ovarian reserve tests in poor responders. *Arch Gynecol Obstet*. 2005;272:74-9.
141. Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update*. 2013;19:67-83.
142. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. 2000;320:1708-12.
143. Piltonen T, Koivunen R, Ruukonen A, Tapanainen JS. Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3327-32.
144. Stone BA, Vargyas JM, Ringler GE, Stein AL, Marrs RP. Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:1522-34.
145. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod*. 2001;65:141-50.
146. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril*. 2011;95:170-5.
147. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update*. 2014;20:124-40.

148. Barbieri RL, Sluss PM, Powers RD, McShane PM, Vitonis A, Ginsburg E, et al. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005;83:302-8.

149. de los Santos MJ, Garcia-Laez V, Beltran D, Labarta E, Zuzuarregui JL, Alama P, et al. The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: Is it hypoandrogenic? *Hum Reprod.* 2013;28:224-9.

