



UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
DECANATO DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Coordinación de Biología

**NIVELES SÉRICOS DE FSH, LH, ESTRADIOL, INHIBINA B Y AMH
COMO INDICADORES DE RESERVA OVARICA**

Por:

Br. Oriana V. Rosales Agosti.

Realizado con la asesoría de:

Profa. María Isabel Camejo

PROYECTO DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Simón Bolívar
como requisito parcial para optar por el título de
Licenciada en Biología

Sartenejas, Diciembre 2008



UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
DECANATO DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Coordinación de Biología

Este Trabajo Especial de Grado fue presentado por:

ORIANA V. ROSALES A.
C.E.No. 03-36453

El mismo fue defendido públicamente el
día martes 09 de diciembre de 2008

y aprobado por los Miembros
designados por la Coordinación de Biología

Prof. María Isabel Camejo (Tutora, Miembro Principal, USB.)

Prof. Maritza Calabokis (Miembro Principal, USB.)

Prof. Ysabel Casart (Miembro Principal, UCV.)

Resumen

La reserva ovárica se refiere al repertorio de folículos restantes en la mujer a una edad determinada y disponible para la procreación. Este tema ha tenido mucho auge desde que las mujeres han decidido posponer la maternidad bien sea por intereses personales, razones económicas, enfermedad, entre otras. El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar los valores séricos de las hormonas Anti-Mülleriana (AMH) e Inhibina B en mujeres con tratamiento de estimulación ovárica controlada, como potenciales marcadores de reserva ovárica y evaluar su relación con las concentraciones séricas de las hormonas folículo-estimulante (FSH), Luteinizante (LH), estradiol (E₂) y con el número de ovocitos recuperados. Se colectó una muestra de suero en el día 3 del ciclo menstrual de 33 pacientes, asistentes a consulta de fertilidad al Instituto Venezolano de Fertilidad (IVF) de Caracas y Valencia, se determinaron los niveles de FSH, LH y estradiol mediante quimioluminiscencia y de AMH e Inhibina B mediante ELISA. Se observó que los niveles de FSH y la edad presentaban una correlación negativa con el número de folículos antrales y de ovocitos obtenidos, mientras que la AMH presentó una correlación positiva con el número de folículos antrales y ovocitos obtenidos. La inhibina B y el estradiol sólo presentaron correlación positiva entre sí, lo cual indica su vinculación con el proceso de reclutamiento folicular. Estos resultados indican que la determinación de AMH conjuntamente con el número de folículos antrales y la edad de la mujer, pueden ser buenos indicadores de la reserva folicular ovárica.

Palabras Clave: Reserva ovárica, Folículos Antrales, ovocitos recuperados, AMH, Inhibina B

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen por guiarme a través de este camino

A mis padres por apoyarme, darme las herramientas para seguir adelante, cariño y seguridad

A mi hermana por confiar en mí y enseñarme muchas cosas.

Agradecimientos

A mi Familia por apoyarme y por enseñarme todo lo que sé hasta ahora, por brindarme un hogar, darme tanto cariño, protección y paz, por hacerme quien soy como persona.

A mis amigas del colegio por su complicidad, cariño, comprensión y formar gran parte de mi vida, en especial a la familia Espina Marcano.

A las “nenas” por compartir el sueño por la Biología, por siempre estar ahí a cualquier hora, por las palabras justas en el momento adecuado, por convertirse en mis hermanas en lo académico y en lo cotidiano.

A la Sra. Fátima y al Sr. Jorge Soto, por adoptarme y aguantarme muchas veces en su casa, en momentos de estudio y de diversión.

A mis amigos, por su cariño desinteresado, por todos los ratos de diversión y de buena charla, por su incondicional apoyo y alegría, por enseñarme lo bueno que es ser diferente, estando entre gente con aspiraciones y gustos distintos.

A Carlitos, la persona más noble y más dispuesta a ayudar que he conocido, por su apoyo, su hombro siempre listo, su disponibilidad y voluntad para cualquier cosa que se necesite, por las horas de sueño que sacrificó por ayudarme a terminar el libro y su alegría eterna.

A la profesora María Isabel Camejo, por ofrecer y compartir sus conocimientos y saberlos enseñar, por estar siempre pendiente de mis avances en la tesis, por los momentos extras dedicados y por compartir mi alegría al culminar mis estudios de licenciatura. Así como también a IVF por hacer posible este proyecto.

Al profesor René Utrera, figura clave en la carrera, por su apoyo, su tiempo, su paciencia, su experiencia, sus palabras, sus momentos de dispersión, por su enseñanza, por adoptarme en su laboratorio y hacerme sentir siempre bienvenida.

A la Universidad Simón Bolívar, por brindarme esta gran oportunidad de formarme aquí en mi país y enriquecerme de todas las personas que aquí he conocido y todos los conocimientos que he adquirido. A todos muchas Gracias

Índice

ÍNDICE

Resumen	II
I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico.....	2
II.1 Reproducción Femenina	2
Foliculogénesis:	2
II.1.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario	5
II.2 Reproducción Asistida: Inducción a la Ovulación.....	7
II.2.1 Definición	7
II.2.2 Uso de análogos agonistas y antagonistas.....	8
II.2.3 Protocolo utilizado en este estudio.....	12
II.3 Reserva Folicular	12
II.3.1 Definición	12
II.3.2 Respuesta ovárica	13
II.3.3 Predicción de la baja respuesta	13
II.3.4 Formas de evaluar la reserva folicular	14
III. Objetivos.....	15
III.1 Objetivo General.....	15
III.2 Objetivos Específicos.....	15
IV. Materiales y Métodos.....	16

Índice

IV.1	Población a Estudiar.....	16
IV.2	Protocolo Estándar de Estimulación Ovárica.....	16
IV.3	Determinación de Folículos Antrales:.....	17
IV.4	Ensayos Séricos:	17
V.	Resultados:	21
VI.	Discusión	31
VII.	Conclusiones y recomendaciones.....	38
VIII.	Anexos	40
VIII.1	.Criterios de Inclusión de pacientes para este estudio:	40
VIII.2	.Carta modelo sobre consentimiento informado entregada a las pacientes que serán sometidas al estudio de esta investigación.....	41
IX.	Bibliografía	42

Capítulo I: Introducción

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la mujer de clase media y alta prefiere desarrollarse profesionalmente, y llevar a cabo diversos roles en la sociedad antes del rol de madre, debido a diversos factores como por ejemplo inestabilidad económica o social (no haber conseguido pareja), no considerarlo como un rol importante, entre otras causas, retrasando así el momento de la maternidad a la tercera o hasta la cuarta década de su vida. Generalmente, hay inconvenientes en todos estos casos puesto que se disminuyen las probabilidades de quedar embarazada, teniendo que acudir a consultas de infertilidad y recurrir a las técnicas de Reproducción Asistida (ART's en inglés), teniendo en cuenta que a mayor edad de la madre aumentan los riesgos de salud para ella y el hijo.

Durante la vida pre-natal de la mujer comienza el proceso de meiosis de las células germinales sexuales y al nacer tiene una cantidad limitada de folículos (aproximadamente de 1 a 2×10^6 células germinales), que al agotarse dan origen a la menopausia (Yen *et al.*, 2001 y Purves *et al.*, 1999). Se ha observado que a mayor edad disminuye esta reserva, sin embargo hay otros factores que favorecen esa disminución entre los que se cuentan: los factores genéticos (predisposición familiar a una menopausia precoz), la raza, hábitos de tabaquismo, quimioterapia, índice de masa corporal elevado, entre los más comunes.

A raíz de este hecho entonces, se hace necesario el estudio de potenciales marcadores biológicos que puedan indicar la capacidad reproductiva en las mujeres y que además sean de fácil y rápida determinación que den idea al médico si una paciente es buena candidata a los tratamientos de fertilidad y las probabilidades de obtener resultados positivos en los ciclos de reproducción asistida, cuyo fin último es la concepción del embarazo. Por este hecho, el presente trabajo está dedicado a la evaluación de valores séricos principalmente de dos hormonas que han sido reportadas en la bibliografía como potenciales indicadores de la reserva folicular ovárica, la Inhibina B y la hormona Anti Mülleriana (AMH), así como evaluar su correlación con otras hormonas implicadas en el ciclo menstrual, folículos antrales (AFC), dimensiones del ovario y con la cantidad de ovocitos obtenidos en cada ciclo de estimulación ovárica.

Capítulo II: Marco Teórico

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Reproducción Femenina

II.1.1 Foliculogénesis:

Durante el desarrollo intrauterino se inicia el proceso de meiosis para obtención de los gametos femeninos. Hacia la tercera semana de gestación los gonocitos se transforman en ovogonias, células germinales permeióticas (una vez que los primeros colonizan las crestas sexuales-gonadales) y comienza el proceso de mitosis a partir de la quinta semana; ya para la sexta o séptima semana de gestación existen cerca de 10.000 ovogonios. En la octava semana las ovogonias comienzan a entrar en el proceso de meiosis conjuntamente con la formación de los folículos. Progresivamente todas las ovogonias entran en meiosis alcanzándose, a la semana 20, un número de 6-7 millones de células germinales, sin embargo muchas de ellas degeneran (proceso de atresia), lo cual se atribuye a la alta tasa de división mitótica de los ovogonios (Yen *et al.*, 2001).

Al momento de nacer, en el ovario existe una población aproximada de un millón de folículos, los cuales atraviesan por diferentes etapas a lo largo de la vida de la mujer y durante cada ciclo menstrual después de la pubertad (Fig. 1 y 2.: etapas del desarrollo folicular en el ovario). El ovario contiene en su interior un ovocito en profase I de la meiosis (dictioteno). Esta población de folículos-ovocitos sigue disminuyendo por procesos de atresia luego del nacimiento, teniendo al comienzo de la pubertad de la mujer, un pool de folículos-ovocitos de aproximadamente 200.000. (Yen *et al.*, 2001 y Purves *et al.*, 2003).

Durante la pubertad, un grupo de folículos entrarán en cada ciclo menstrual en el proceso de reclutamiento y selección, sin embargo, uno solo de estos folículos llegará a ser ovulatorio (Fig. 3).

Capítulo II: Marco Teórico

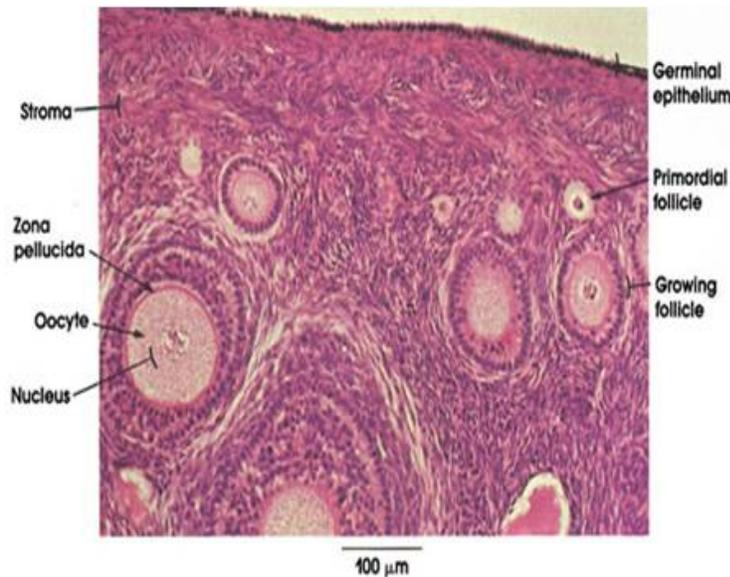


Figura 1: Corte transversal del ovario en el cual se muestra el espesor de la corteza del tejido, el cual está constituido por pequeñas células ahusadas, con escaso citoplasma que forman el estroma ovárico, en el que se hallan inmersos los folículos ováricos en distintos estadios de maduración: folículos primordiales que consisten en pequeñas estructuras redondeadas con una célula central correspondiendo al ovocito rodeada por una capa simple de células foliculares aplanadas. . Igualmente se muestran folículos en crecimiento, así como también un folículo ovulatorio, cubierto por la zona pelúcida. (Aimale et al., sin año en <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modrepro>)

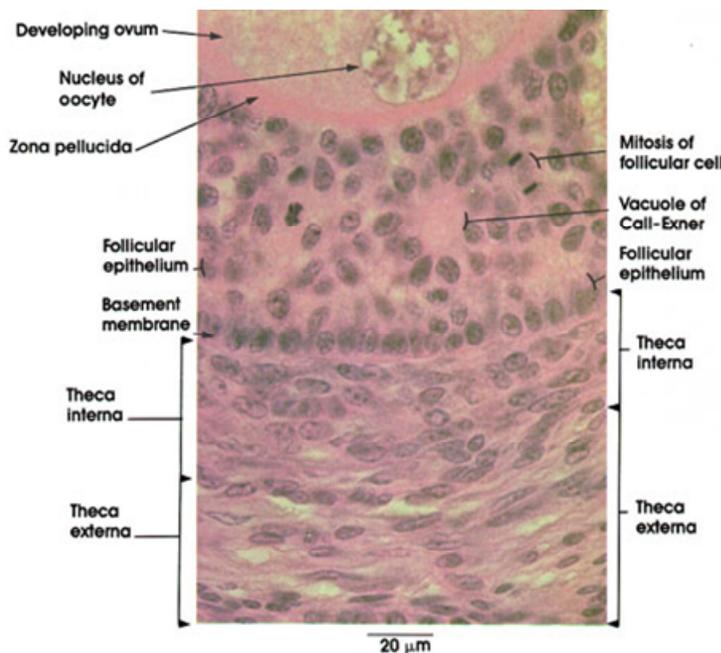


Figura 2 Corte transversal de un folículo preantral en el cual se observan los diferentes componentes celulares del folículo preovulatorio. En la parte inferior se encuentran las células de la Teca, las cuales envuelven al folículo y producen andrógenos, los cuales son convertidos a estrógenos por las células de la granulosa. Hacia arriba, dentro del folículo se encuentran las células que forman el epitelio folicular interno y recubren el ovocito en formación, rodeado por proteínas de la zona pelúcida y el núcleo (Aimale et al., sin año en <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modrepro>).

En el momento de la ovulación, que es debida a la liberación abundante de LH (pico de LH) por la glándula hipófisis, el ovocito será liberado del folículo reanudando la meiosis, con la liberación del primer cuerpo polar, deteniéndose esta vez en metafase II. El proceso de meiosis sólo culminará al ocurrir la fecundación, cuando por diferentes factores, incluyendo la generación de ondas de calcio intraovocitarias, se reiniciará la meiosis para

Capítulo II: Marco Teórico

formar el pronúcleo femenino el cual al unirse al pronúcleo masculino completará el proceso de fecundación (Hill *et al*, 2006).

Como se comentó anteriormente, el ovario de la recién nacida contiene un número determinado de folículos. Una vez llegada la pubertad, mensualmente un número de folículos será seleccionado para empezar un proceso de crecimiento. Según el estadio de crecimiento folicular los folículos han sido clasificados de varias formas. En la Tabla I se enumeran las características principales de cada uno de ellos. El folículo es la unidad funcional del ovario y el modelo de las “dos células dos gonadotropinas” ayuda a entender su fisiología; de acuerdo a este modelo, el cual ha sido bastante aceptado por las personas dedicadas a campos de la endocrinología, fisiología humana, embriología, biología de fertilidad, etc., las dos células involucradas son las células de la teca y las células de la granulosa; las dos gonadotropinas son la LH, la cual se une inicialmente sólo a las células de la teca y la FSH que tiene sus receptores en las células de la granulosa. Las células de la teca por acción de la LH producen andrógenos, los cuales al pasar a las células de la granulosa son aromatizados (por la enzima aromatasa allí presente) a estrógenos, gracias a el estímulo por FSH. (Fig. 4 y 5) (Yen *et al*, 2001).

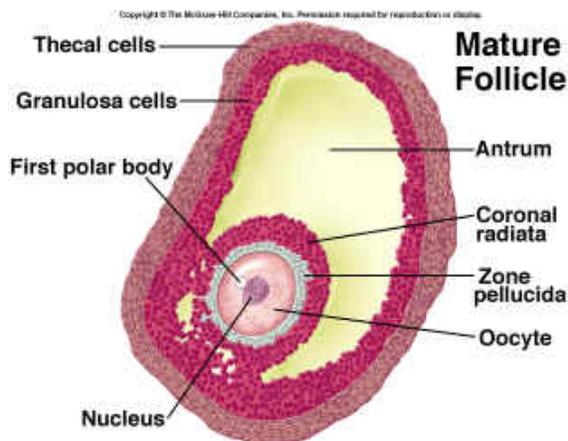


Figura 3 Componentes de un folículo maduro. En el esquema, se observan diferencialmente las células de la teca y las células de la granulosa y su cercanía unas con otras, gracias a lo cual se señala que existe el mecanismo de la aromatización de andrógenos provenientes de las células de la Teca en las células de la granulosa, el atrio del folículo; dentro del folículo se observa un ovocito antes de eclosionar junto con su núcleo, envuelto por la zona pelúcida (Southwest Tennessee Community College en http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P2_reproductive_system_lab.htm).

Capítulo II: Marco Teórico

Tabla I. Clasificación folicular en las bases del plano óptico a través del cual se divide el nucleolo del ovocitos, de acuerdo a la clasificación (Jori *et al.*, 2001).

Tipo de Folículo	Característica
Folículos Primordiales. TIPO 1	El ovocito está rodeado por una capa de células planas de granulosa
Folículos Primarios:TIPO 2	El ovocito está rodeado por una capa simple de células de la granulosa cuboidales
Folículos Preantrales pequeños TIPO 3	El ovocito es rodeado por dos a cuatro capas de células cúbicas de la granulosa
Folículos Preantrales grandes TIPO 4	Están presentes 5 o más capas de células cúbicas de la granulosa.
Folículos Antrales pequeños TIPO 5	Comienzan a mostrar una formación astral entre las células de la granulosa.
Folículos Antrales grandes TIPO 6	Contienen una gran formación astral, un ovocito rodeado por células del cúmulo y una capa bien definida de células de la Teca.

II.1.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

El ciclo menstrual está controlado por el eje hipotálamo hipófisis gónada. A nivel del hipotálamo se produce la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual tiene su blanco en la hipófisis provocando la liberación de LH y FSH. A su vez la FSH y la LH tienen su blanco en el ovario, promoviendo la producción de estrógenos y progesterona en diferentes fases del ciclo. El ovario regula por retroalimentación negativa y positiva la liberación de hormonas hipotalámicas e hipofisarias mediante la liberación ovárica de estrógenos, progesterona, inhibina B, inhibina A y activina, las cuales presentan variaciones en las diferentes fases del ciclo menstrual denominadas fase folicular, ovulatoria y lútea. En la Figura 3 se pueden apreciar los cambios séricos de las concentraciones de LH, FSH, estrógenos y progesterona. Adicionalmente se presentan los cambios a nivel del ovario y del

Capítulo II: Marco Teórico

endometrio uterino a lo largo del ciclo menstrual, así como es posible apreciar la sincronización entre los picos de LH y FSH justo antes de la ovulación (folículo antral).

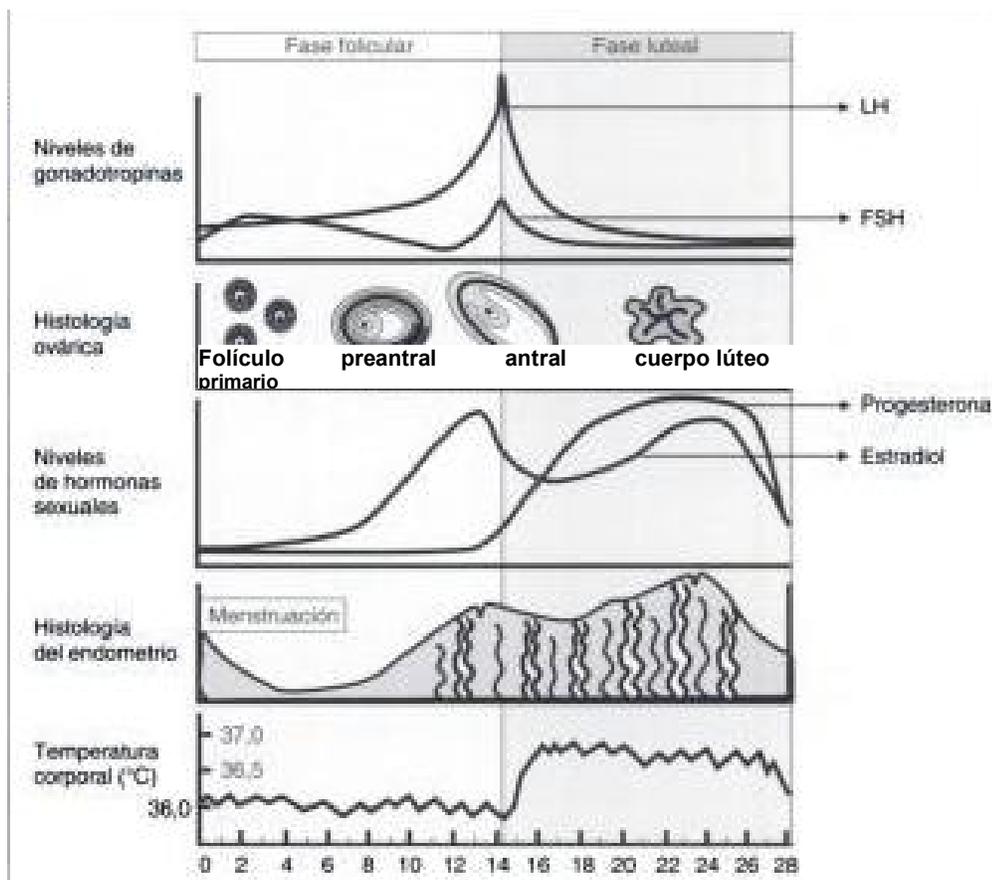


Figura 4 Fases del ciclo menstrual. Representación de las variaciones en los valores de las hormonas secretadas por la hipófisis anterior (LH y FSH) y por los ovarios (Progesterona, Estrógeno e Inhibina B que no se representa). Se ilustran las fases ováricas y uterinas en un ciclo de 28 días (Pérez, 2006).

La retroalimentación negativa en el control de la función de la hipófisis, es uno de los aspectos claves de la endocrinología. La Liberación de FSH provoca un control negativo sobre los estrógenos, los cuales son muy sensibles a la FSH. Mientras que el efecto de los estrógenos sobre la LH varía dependiendo de la concentración y tiempo de exposición. A concentración elevada de estradiol, puede haber una retroalimentación positiva que ocasiona la liberación de FSH y LH, sin embargo, la respuesta depende de la duración de la estimulación estrogénica (Edwards y Rísquez, 2003)

La secreción de FSH y otras gonadotropinas está controlada por la Inhibina (hormona protéica), la cual está presente en el líquido folicular y es secretada por

Capítulo II: Marco Teórico

células de la granulosa, también secretada al flujo sanguíneo ovárico. La inhibina puede tener efecto supresor sobre la secreción de FSH, la cual participa en el desarrollo folicular. En la familia de las inhibinas están la A, la B, activinas y folistatinas (Edwards y Rísquez, 2003)

II.2 Reproducción Asistida: Inducción a la Ovulación.

Las técnicas de reproducción asistida han venido ganando espacio en el campo de la medicina de la reproducción. Desde el logro, en 1978, del nacimiento vivo del primer ser humano por estos métodos, se ha venido investigando intensamente al respecto para incrementar mayor número de ovocitos y luego embriones, para mejorar las tasas de embarazos y éxito en el laboratorio de reproducción asistida.

II.2.1 Definición

Las técnicas de inducción a la ovulación buscan lograr aumentar el número de folículos ovulatorios en un ciclo menstrual, para así disponer de un mayor número de ovocitos. En estas técnicas se provoca un aumento de la gonadotropina FSH durante la fase folicular del ciclo menstrual, ya sea por administración exógena, o por algún tratamiento que haga que la hipófisis de la misma mujer las produzca. Una vez alcanzado un número de folículos ovulatorios determinados se induce la ovulación con hCG (hormona gonadotropina coriónica humana) la cual es una hormona muy parecida a la LH y se une a los mismos receptores pero con una vida media más larga. Una hora después de que se ha administrado la hCG se aspiran los ovocitos de los folículos, los cuales serán trasladados al laboratorio de reproducción asistida para ser fecundados por fecundación *in vitro* (IVF) o por la técnica de inyección intra-citoplasmática del ovocito (ICSI) (Edwards y Rísquez, 2003).

Las hormonas utilizadas para la inducción de la ovulación han variado a lo largo del tiempo. Una de las más utilizadas es la de citrato de clomifeno y gonadotropinas. Se utiliza generalmente en pacientes con anovulación por disfunción hipotalámica-hipofisaria, con niveles de estrógenos mayores a 50 pg/mL. Su uso también se ha propuesto para tratar la fase lútea corta, y en la evaluación y diagnóstico del eje

Capítulo II: Marco Teórico

hipotálamo-hipófisis-ovario. La dosis usualmente es de 50-200 mg/día desde el 5to día del ciclo (Edwards y Rísquez, 2003).

Otra de las técnicas para lograr la inducción de la ovulación utiliza agonistas de la GnRH en combinación con gonadotropinas. Los agonistas de la GnRH son sustancias que tienen gran afinidad por los receptores de GnRH en la hipófisis. Luego de su administración inicial dichos agonistas provocan la liberación gonadotropinas por la hipófisis, y después de una a dos semanas de administración continua producen la caída de los niveles de FSH y LH a través de un mecanismo de inhibición (*down-regulation*) (Edwards y Rísquez, 2003).

Es importante resaltar que debe cuidarse el uso de las gonadotropinas para no generar Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO), el cual se define como una respuesta suprafisiológica del ovario cuyo factor etiológico principal es la angiotensina II que afecta el crecimiento de múltiples grandes folículos con un aumento patológico de la permeabilidad capilar que puede ocasionar hidrotórax, hemoconcentración y trastornos electrolíticos; desequilibrio homeostático que puede poner en peligro la vida de la paciente. Esta enfermedad ha sido relacionada con el uso de la gonadotropina menopáusica humana (hMG) y a la FSH inclusive en protocolos con dosis bajas; la hCG también está involucrada pues provoca luteinización masiva (Edwards y Rísquez, 2003; Padilla *et al.*, 2006).

Algunos especialistas han decidido usar protocolos largos y ultralargos, los cuales en líneas generales consisten en la desensibilización de la hipófisis durante períodos de tiempo más prolongados (por 8 -21 días), a fin de inducir a un estado de hipogonadismo hipogonadotrópico (Edwards y Rísquez, 2003).

II.2.2 Uso de análogos agonistas y antagonistas

La Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es un proceso complejo que involucra retroalimentación tanto positiva como negativa en la mujer. Las hormonas que actúan sobre este eje (GnRH, FSH y LH) se encuentran en un equilibrio dinámico con las hormonas secretadas por los ovarios (esteroideas, como el estradiol y también las Inhibinas).

Capítulo II: Marco Teórico

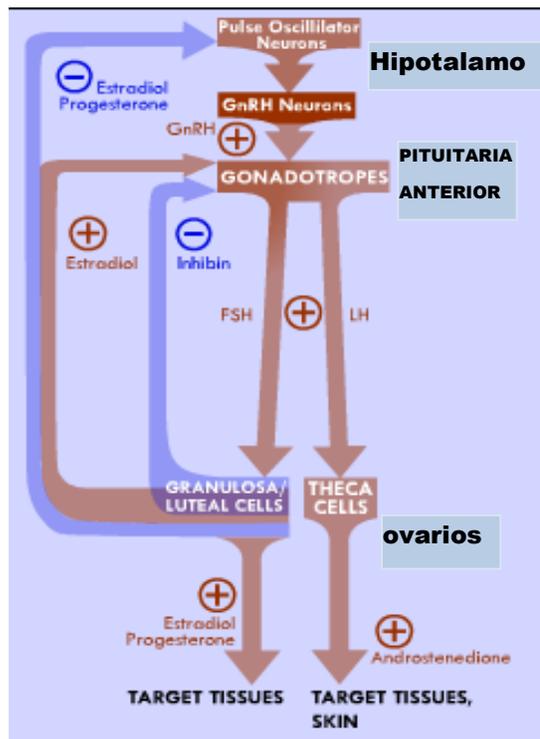


Figura 5: Procesos de Retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

El incremento en las concentraciones de estradiol, a medida que los folículos crecen, progresivamente sensibiliza la hipófisis a la GnRH (pulsátil) de manera que justo antes de la ovulación se libera un pico de LH y luego FSH en respuesta a GnRH. Esta amplificación de la acción de la GnRH debido a la acción del estradiol es denominada retroalimentación positiva y es lo que promueve la ciclicidad en las mujeres a diferencia de los hombres en los cuales no ocurre este tipo de retroalimentación por lo que son acíclicos (Fig 1) (Slincy *et al.*, 2005).

Durante la fase folicular del ciclo, el generador de pulso de GnRH opera a la misma frecuencia que en el estado no modulado (esto es sin influencia de centros superiores o esteroides ováricos), lo que genera la liberación de pulsos de GnRH.

En respuesta a este estímulo, los folículos se desarrollan y maduran, secretando niveles cada vez más altos de estradiol y progesterona que progresivamente aumentan en la circulación sanguínea. Cuando las concentraciones plasmáticas de estradiol son de aproximadamente 250 pg/mL (en 36 horas), durante el desarrollo folicular, el efecto inhibitor de los esteroides se revierte súbitamente, con el posterior incremento preovulatorio en los niveles de LH y FSH (retroalimentación positiva). Es decir, el ovario responde a la elevación de las gonadotropinas aumentando la producción de 17β -estradiol y progesterona. Esto, a su vez, ocasiona el aumento abrupto de los niveles de estrógenos en sangre, lo cual se asocia con un menor aumento en la secreción de la progesterona que precede a la ovulación, esto contribuye significativamente con la elevación de gonadotropinas (Edwards y Rísquez, 2003).

Capítulo II: Marco Teórico

Hasta la actualidad no se saben con certeza los mecanismos celulares de los gonadotropos, sin embargo, el uso de análogos de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) ha proporcionado gran información. Bajo administración médica los análogos agonistas de GnRH, incrementan la secreción de gonadotropina y usualmente toma entre 7 y 14 días hasta alcanzar un estado de supresión de la hipófisis (Fig 5). Los agonistas de GnRH son sustancias que tienen gran afinidad por los receptores de GnRH en la hipófisis y su vida media prolongada los hace más potentes que la GnRH nativa. La administración prolongada (una o dos semanas) de agonistas de GnRH conlleva a una regulación negativa de los receptores de GnRH. El receptor unido al agonista es internalizado via endocitosis mediada por receptor, luego este complejo se disocia, seguido por una degradación del ligando y un reciclaje parcial de los receptores, por lo que la cantidad de receptores disminuye. Cuando los receptores recuperan un nivel normal o supranormal, la insensibilización es mantenida como resultado de mecanismos de postrecepción, incluyendo pérdida e impedimento de los canales de calcio funcionales unidos a receptores de GnRH, así como también, pérdida de la habilidad para transferir gonadotropinas desde un *pool* no liberable a uno liberable) (Edwards y Rísquez, 2003; Shoham, *et al.*, 1999).

Los análogos antagonistas de GnRH tienen un efecto inhibitorio inmediato en la secreción de gonadotropina. Los antagonistas compiten y ocupan receptores de GnRH en la hipófisis, bloqueando entonces el acceso de GnRH endógeno y suprimiendo la estimulación el receptor. La supresión llevada a cabo por antagonistas es inmediata y como no ocurre pérdida del receptor, se requiere un aporte constante de antagonista para que los receptores sean constantemente ocupados, es necesaria una dosis mayor de antagonistas que de agonistas para la supresión pituitaria efectiva (Fig 6). La supresión hipofisaria puede revertirse administrando GnRH nativa y esta reversión resulta ser una ventaja para su uso, otra de las ventajas es que los antagonistas no inducen la liberación inicial de gonadotropinas lo cual es indeseable en la mayoría de los casos que se requiere uso de análogos de GnRH (Edwards y Rísquez, 2003; Shoham, *et al.*, 1999).

La administración prolongada tanto de agonistas como de antagonistas de GnRH, suprime el eje hipófisis-gónada, inhibiendo la secreción de LH, FSH y esteroides sexuales, por lo cual éstos análogos están indicados para aquellos padecimientos en los

Capítulo II: Marco Teórico

que se requiere dicha supresión (pubertad precoz, endometriosis, síndrome de ovarios poliquísticos, hiperplasia prostática, cáncer y también en anticoncepción).

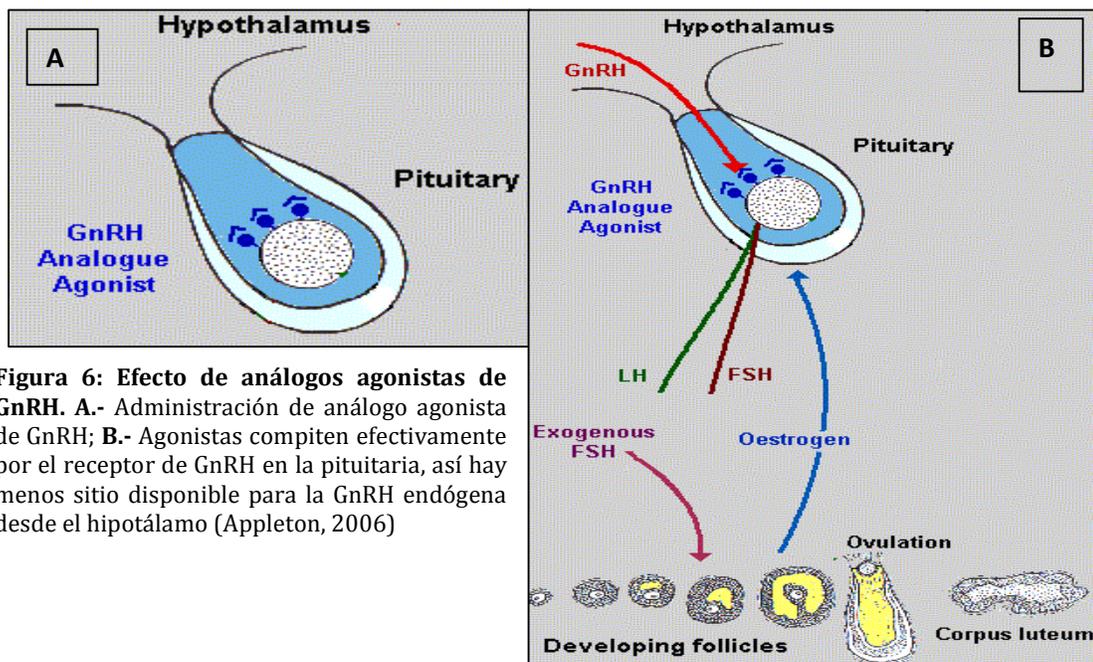


Figura 6: Efecto de análogos agonistas de GnRH. A.- Administración de análogo agonista de GnRH; B.- Agonistas compiten efectivamente por el receptor de GnRH en la pituitaria, así hay menos sitio disponible para la GnRH endógena desde el hipotálamo (Appleton, 2006)

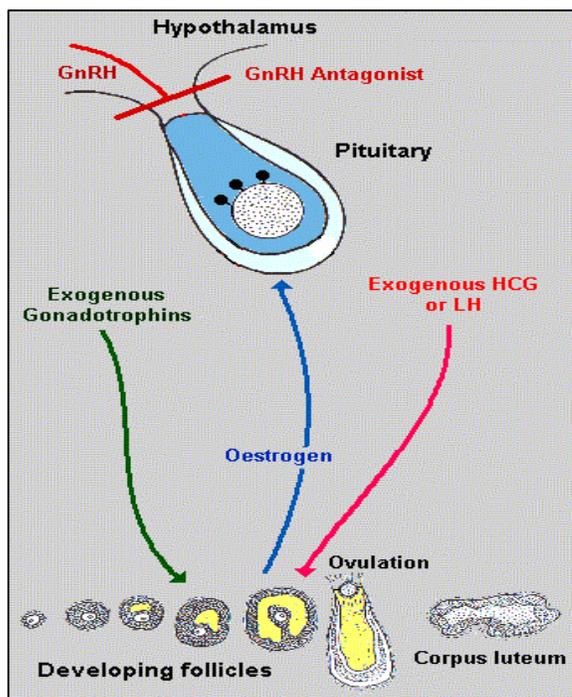


Figura 7: Efecto de análogos antagonistas de GnRH. La introducción de antagonistas (en oposición a las agonistas) bloquea por completo la producción natural de gonadotropinas desde la hipófisis (Appleton, 2006).

Capítulo II: Marco Teórico

II.2.3 Protocolo utilizado en este estudio

En este estudio el protocolo utilizado en todas las pacientes es aquel que involucra la aplicación de análogos antagonistas, para ocasionar un efecto bloqueador en los receptores de GnRH (Fig 6), utilizando la hormona estimulante del folículo en la forma recombinante (rFSH), forma exógena y conjugado con gonadotropina menopáusica humana (hMG). En la sección de materiales y métodos (Capítulo IV) se describe con detalle el protocolo de estimulación.

II.3 Reserva Folicular

II.3.1 Definición

La Reserva Ovárica es un término utilizado para describir el potencial funcional del ovario y refleja el número y la calidad de los folículos presentes en el ovario. Se pueden utilizar diferentes procedimientos que permiten estimar la reserva ovárica y así poder aconsejar a las mujeres que necesitan evaluar la pérdida de su potencial reproductivo debido a diversas condiciones. El principal factor que provoca la pérdida de la reserva ovárica es la edad, adicionalmente se ha evidenciado que las mujeres de mayor edad se presentan una reducción en la de respuesta ovárica a las gonadotropinas, entre otras.

Se destacan también otros factores que podrían afectar la reserva folicular como por ejemplo el tratamiento del cáncer, en el que el número de ovocitos recuperados es significativamente menor que el que aquellas mujeres que no han recibido quimioterapia (Macklon y Fauser, 2005). Otro de los factores limitantes son los desórdenes genéticos como translocaciones o mutaciones en el DNA mitocondrial, que pueden contribuir a que los ovarios fallen antes de lo regular (< 40 años) y disminuye la reserva ovárica (NCRS,2006). Por otro lado también se tienen otros factores como lo son un elevado índice de masa corporal (BMI) y el consumo frecuente de cigarrillos, en el caso de éste último en particular se ha observado que presenta correlación con altos niveles de FSH podría reflejar atresia folicular acelerada y daño en la calidad folicular (Kinney *et al.*, 2007).

Capítulo II: Marco Teórico

Muchas de las publicaciones relacionadas con reserva ovárica se enfocan en la habilidad del ovario para responder a la estimulación de gonadotropinas en el contexto de técnicas de reproducción asistida, puesto que se desea conocer la capacidad de respuesta del ovario durante estos procedimientos y favorecer su éxito (Maheshwari *et al.*, 2006).

II.3.2 Respuesta ovárica

La respuesta ovárica puede definirse como la reacción endocrina y folicular de los ovarios a un estímulo. Este término se usa en la práctica y en investigación clínica de forma cualitativa (ejemplo: el logro del crecimiento de un solo folículo dominante y la ovulación en mujeres anovulatorias) y de forma cuantitativa (ejemplo: en desarrollo multifolicular en mujeres que ovulan sometidas a estimulación para seguir la fertilización *in vitro* (FIV). Alcanzar diferentes respuestas, usualmente representa el resultado deseado de intervenciones farmacológicas en la inducción del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Sin embargo, esta respuesta diferencial requiere de un monitoreo y un ajuste personalizado a cada paciente (Fauser *et al.*, 2008).

II.3.3 Predicción de la baja respuesta

Sería ideal poder predecir la respuesta ovárica durante un monitoreo de rutina previo a los procedimientos de reproducción asistida para así dirigir a la paciente hacia el régimen de estimulación más adecuado. Los regímenes de estimulación ovárica se realizan de acuerdo a la necesidad de cada paciente basados diferentes indicadores como el patrón de E₂ de la fase folicular temprana, el volumen ovárico así como el conteo basal de folículos antrales antes de comenzar la Estimulación Ovárica Controlada (EOC). Otros protocolos han tomado en cuenta cambios en los niveles de E₂ luego de la estimulación con FSH exógeno como método para monitorear la respuesta ovárica, entre otros (Surrey y Schoolcraft, 2000).

Dentro de toda la escasa uniformidad que existe para clasificar a pacientes no respondedores, las mismas pueden reunirse, en la mayoría de los trabajos de investigación, en dos grupos: las pobres respondedoras jóvenes las cuales son pacientes con aproximadamente 37 años de edad y con un peso alrededor de los 70 Kg, cuyos ciclos no fueron completados por presentar menos de 3 folículos en desarrollo, luego de nueve días de dosis diaria de inyecciones de gonadotropina, también incluye aquellas

Capítulo II: Marco Teórico

pacientes que requirieron una dosis muy alta (más de 600 IU) de gonadotropina por ovocito recuperado. Debe considerarse que las pacientes con más de 38 años que presentan baja respuesta, en la mayoría de los casos, es debido a la edad, mientras que las pacientes con sobrepeso, tienen mayor posibilidad de aumentar su respuesta ovárica si pierden peso (Gorgy y Taranissi, 2001).

II.3.4 Formas de evaluar la reserva folicular

Se han descrito varias pruebas y marcadores en la literatura, entre las cuales se encuentran las llamadas pruebas estáticas y las pruebas dinámicas.

Entre las estáticas están:

- Morfométricas: Biopsia ovárica, volumen ovárico, conteo de folículos antrales (AFC).
- Bioquímicas: se caracterizan por la determinación de ciertas hormonas en situación basal, al tercer día del ciclo menstrual. Las hormonas evaluadas son: la Hormona Estimulante del Folículo (FSH), Inhibina B, estradiol (E_2) y Hormona Anti- muleriana (AMH).

Y por otro lado se encuentran las Pruebas dinámicas: se caracterizan por la determinación de FSH y E_2 antes y después de someter al eje hipotálamo-hipófisis-ovario a un estímulo específico como la Prueba de reto con Citrato de Clomifeno (CCCT), Prueba de Estimulación con agonista de GnRH (GAST), y la Prueba de Reserva Ovárica con FSH exógena (EFORT) (Álvarez y Nanning, 2004; Maheshwari *et al.*, 2006.).

De las pruebas mencionadas, las que se utilizaron en este trabajo de investigación fueron las de AFC, y estimación de valores séricos el día 3 del ciclo menstrual de FSH y estradiol, realizadas habitualmente en los centros de fertilidad. Adicionalmente se midieron los valores séricos el día 3 del ciclo de AMH e Inhibina B, las cuales no se realizan de rutina.

Capítulo III: Objetivos. General y Específicos

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Determinar valores séricos de la Hormona Anti-Mülleriana e Inhibina B en mujeres con tratamiento de estimulación ovárica controlada como potenciales marcadores de reserva ovárica.

III.2 Objetivos Específicos

- Determinar el número de folículos antrales en mujeres sometidas a protocolos de estimulación ovárica controlada
- Medir los niveles séricos de las hormonas: FSH y estradiol en el día 3 del ciclo menstrual.
- Medir niveles séricos de las hormonas AMH e Inhibina B en el día 3 del ciclo.
- Evaluar la relación entre las concentraciones séricas de FSH, LH y estradiol, Inhibina B y AMH con el número de ovocitos recuperado.

Capítulo IV: Materiales y Métodos

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Población estudiada

Se evaluaron a 33 mujeres entre 25-45 años de edad, que acudieron a la consulta de fertilidad y fueron sometidas a protocolos de estimulación ovárica controlada, en los centros de IVF (Instituto Venezolano de Fertilidad) en las ciudades de Valencia y Caracas, Venezuela. Como criterios de inclusión se tuvieron: presencia de ambos ovarios, sin anomalías morfológicas; sin enfermedades presentes o pasadas que afectasen los ovarios o la esteroidogénesis ovárica; con un índice de masa corporal entre 18-25 kg/m²; con una adecuada visualización de ambos ovarios en el eco y sin cese funcional del ovario (Ver anexo de criterios de inclusión).

IV.2 Protocolo Estándar de Estimulación Ovárica

En el día 2 ó 3 del ciclo menstrual se administraron 150 mUI de FSHr (recombinante) de Puregon® (Organon), se realizó una ecografía basal verificando que no existía ningún folículo mayor a 10 mm. Asimismo se determinaron valores séricos de LH/FSH y estradiol; Cuando los valores de estradiol posterior a la estimulación sobrepasaron los 100 pg/mL se hizo una evaluación ecográfica de los ovarios observando el desarrollo y crecimiento de los folículos. A partir del 6to o 7mo día del ciclo, dependiendo del día de estimulación, comenzó el tratamiento con antagonistas de GnRH, 0,25 mg de Ganirelix (de Orgalutran®), repitiendo la dosis de 3 a 4 veces en el ciclo a juicio del médico de fertilidad (dependiendo de la respuesta en el ovario). La aplicación de antagonistas pudo haberse adelantado si la paciente presentaba folículos mayores a 14 mm. A partir del primer día del tratamiento con antagonistas se hizo una medición del tamaño de los folículos diariamente y al observar folículos de 18 mm en adelante se administraron 10.000 UI de hCG, deteniendo la administración de antagonistas. Luego de 36 horas se procedió a la aspiración folicular. Dependiendo del número de ovocitos recuperados y su estadio de madurez se decidió si se recurría a ICSI o FIV. Pasadas 24 horas después del procedimiento realizado se escogieron los embriones que presentaban 2 pronúcleos, 48 horas después deberían tener 4 células. Al tercer día de la fecundación (72 horas después) presentaron 8 células y en este estadio

Capítulo IV: Materiales y Métodos

se transfirieron a la madre tomando en cuenta características de las blastómeras y el grado de fragmentación. En dos casos se transfirieron embriones de 6 ó 7 células, y en otros dos, se transfirieron de 9 ó 10 células.

IV.3 Determinación de Folículos Antrales:

Antes de iniciar el ciclo de estimulación se realizó una evaluación ecográfica intravaginal de los ovarios. Se verificó que estaban en buena condición basal de reposo (sin anomalías de tamaño, irrigación, textura, entre otros). Alrededor del día 4 posterior al suministro de FSH recombinante se volvió a realizar un eco intravaginal verificando el crecimiento de los folículos. Las mediciones se llevaron a cabo diariamente, por el médico a cargo, desde el comienzo del ciclo hasta que se encontraron folículos mayores a 18 mm.

IV.4 Ensayos Séricos:

Para los ensayos séricos se tomó una muestra de sangre en el día 3 del ciclo menstrual a las 33 pacientes, incluyendo a dos ovodonantes ya que ellas también fueron sometidas a EOC. El suero obtenido se almacenó a -20°C , luego de haber sido centrifugado, hasta el momento de la evaluación con las diferentes pruebas hormonales.

Para la determinación de los valores séricos de FSH, LH y estradiol, se utilizó un sistema de inmunoensayos IMMULITE 1000® (EURO/DPC Diagnostic Products Corporation, United Kingdom) siguiendo el protocolo predeterminado para cada hormona de dicha casa comercial para este equipo. El principio de análisis de IMMULITE 1000 para FSH, LH y estradiol se basa en un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida.

a. EL ENSAYO DE FSH

- Es un ensayo inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscente en fase sólida (FSH IMMULITE 1000®, EURO/DPC Diagnostic Products Corporation, United Kingdom).
- El volumen requerido para la prueba fue de 50 μL de suero de la paciente. Se realizó un ciclo de incubación por 30 minutos, teniendo como control una muestra con nivel alto y otra con nivel bajo de FSH, con una sensibilidad de 0,1

Capítulo IV: Materiales y Métodos

mUI/mL. Los valores de FSH se compararon con los estándares (mediana en mUI/mL): en fase folicular: 6,2; fase folicular día 2 a 3 del ciclo menstrual: 6,6; ciclo medio: 13,6; fase lútea: 3,4 mUI/mL.

b. LA DETERMINACIÓN DE LH

- Es un ensayo inmunométrico con dos sitios de unión, quimioluminiscente en fase sólida (LH IMMULITE 1000®, EURO/DPC Diagnostic Products Corporation, United Kingdom).
- El volumen requerido para la prueba fue de 50 μ L de suero de la paciente. Se realizó un ciclo de incubación por 30 minutos, teniendo como control una muestra con nivel alto y otra con nivel bajo de LH, con una sensibilidad de 0,1 mUI/mL. Los valores de LH se compararon con los estándares (mediana en mUI/mL): en fase folicular: 4,6 y fase lútea: 4,3 mUI/mL.

c. EL ENSAYO DE ESTRADIOL

- Es un ensayo competitivo y la fase sólida se encuentra recubierta con un anticuerpo policlonal de conejo anti-estradiol. El reactivo contiene fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con estradiol. El estradiol conjugado con la enzima compete con el estradiol presente en la muestra del paciente por un número limitado de unión a anticuerpos situados en la fase sólida. El exceso de muestra y reactivo se eliminó por lavado y centrifugación. Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminiscente a la fase sólida y se generó la señal en proporción a la cantidad de enzima unida. Se realizó un ciclo de 1 hora, con un volumen mínimo de 25 μ L de suero, teniendo como control dos muestras una con valores bajos y otra con valores altos de estradiol; la sensibilidad del ensayo es de 15 pg/mL. Los valores estándares (mediana en pg/mL): fase folicular: 42; fase folicular días 2 a 3 del ciclo: 31; preovulatorio (+/- 3 días): 133; fase lútea: 93 pg/mL.

d. LA DETERMINACIÓN DE AMH

- Tanto los niveles de AMH como los de Inhibina B se determinaron mediante ensayos ELISA, siguiendo los siguientes protocolos (se siguieron al pie de la letra las instrucciones de la casa comercial):

Capítulo IV: Materiales y Métodos

La determinación de AMH se realizó mediante el kit de diagnóstico Active MIS/AMH ELISA DSL 10-14400 de la casa comercial System Laboratories (Weber, Texas, EEUU), éste es un inmunoensayo de dos sitios, en el cual se incubaron Estándares (de concentraciones 0; 0,05; 0,10; 0,25; 1,8; 7,5 y 15 ng/mL), controles (de concentraciones alta y baja, niveles I y II de acuerdo con la casa comercial) y las muestras de suero de las pacientes. Se midieron 20 µL de Estándares, controles y de muestras de suero de las pacientes y se depositaron en los pozos marcados previamente. Se añadieron 100 µL del buffer de ensayo MIS/AMH a cada pozo. Se incubó a 25 °C, en movimiento (500-700 rpm) por una hora. Posteriormente se lavó cada pozo 5 veces por 30 segundos con la solución de lavado del kit, removiendo completamente el líquido de los pozos. Posteriormente se agregan 100 µL del anticuerpo conjugado con biotina. Se incubaron de nuevo los pozos en movimiento (500-700 rpm) a 25°C por una hora, luego se aspiraron los pozos y se lavaron 5 veces con la solución de lavado y se secó la placa invirtiéndola en papel absorbente. Luego se añadieron 100 µL de conjugado de enzima con Estreptavidina a cada pozo, se incubaron por 30 minutos y luego lavaron y secaron de la misma manera que los pasos anteriores. Posteriormente se añadieron 100 µL de solución cromógeno Tetrametilbenzidine (TMB). Se incubaron los pozos en movimiento (500-700) 10-15 minutos a 25 °C, evitando el contacto directo con luz del sol. Se añadieron 100 µL de solución de parado en cada pozo. Luego de esto, en los siguientes 30 minutos, se leyó la absorbancia en los pozos a 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de MIS/AMH presente. Se pudo calcular la concentración de las muestras graficando una curva de la absorbancia vs. la concentración de MIS/AMH, con los valores estándares, de la cual se pudieron obtener los valores de concentración desconocidos. Esta prueba tiene una sensibilidad de 0,017 ng/mL, con un rango estándar de concentración de 0,025-15 ng/mL

e. LA DETERMINACIÓN DE INHIBINA B

- Se llevó a cabo utilizando el kit de diagnóstico Active Inhibin B ELISA DSL 10-84100 de la casa comercial System Laboratories (Weber, Texas, EEUU), el cual, al igual que el kit de MIS/AMH es un inmunoensayo de dos sitios amplificado con pozos tipo “sandwich” de dos pasos, en los cuales se incubaron estándares (de

Capítulo IV: Materiales y Métodos

concentraciones aproximadas de 0,0; 10; 30; 100; 250; 500 y 1000 pg/mL) controles (de concentraciones alta y baja, niveles I y II de acuerdo con la casa comercial) y las muestras de suero de las pacientes, se midieron 50 μ L de estándares, controles y de las muestras de suero de las pacientes, se adicionan a cada pozo, posteriormente 25 μ L de tampón A, así como también 25 μ L de tampón B. Luego se incubaron los pozos a 25 °C agitando entre 300 y 400 rpm durante 14-18 horas. Una vez incubado se aspiraron y se lavaron los pozos 3 veces con agua desionizada, dejando secar sobre papel absorbente. Una vez lavadas y secadas las placas, se agregaron 50 μ L de anticuerpo anti Inhibina B conjugado a Biotina en cada pozo, luego se incubaron las placas en agitación (500-700 rpm) por una hora y media a 25°C. Después de la incubación se lavó la placa 6 veces con solución de lavado, secando posteriormente invertido sobre papel absorbente. Posteriormente se agregaron 50 μ L de conjugado enzimático de Estreptavidina en cada pozo, incubando luego en agitación (500-700 rpm) por 20 minutos a temperatura ambiente (25°C). Luego de la incubación se lavaron los pozos 6 veces con la solución de lavado, y en el último ciclo de lavado, se dejaron los pozos incubadas con solución de lavado por 15 minutos antes de aspirar. Una vez pasado el tiempo se aspiró y se lavaron 6 veces nuevamente y se dejó secar esta vez. Seguido de esto, se agregaron 100 μ L de solución cromógena TMB en cada pozo. Se incubó la placa en agitación (500-700 rpm) por 15-30 minutos a temperatura ambiente. Evitando la exposición a la luz solar. Luego se agregó solución de parada en cada pozo y se leyó la absorbancia dentro de los 30 minutos siguientes, a una longitud de onda a 450 y 620 nm. Esta prueba tiene una sensibilidad de 7 pg/mL, con un rango estándar de concentración de 10-1000 pg/mL.

f. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se calcularon promedios y desviaciones estándar de los datos cuantitativos así como los porcentajes de datos cualitativos con respecto al total de pacientes en cada parámetro. Se hicieron correlaciones de Spearman y se hizo el estudio de pruebas t-student y Chi² mediante el paquete estadístico STATISTICA '99 edition de StatSoft, Inc (Tulsa, OK, USA. 1984-1999).

Capítulo V: Resultados.

V. RESULTADOS:

La edad media (\pm desviación. estándar) de las 33 pacientes tomadas en cuenta para el estudio fue de $33,45 \pm 5,32$ años y la duración de la infertilidad fue aproximadamente de $6,98 \pm 5,32$ años, resultando ser primaria en un 87,9 % de las pacientes y secundaria en un 12,1 % de los casos. El índice de masa corporal medio fue de $24,50 \pm 1,79$ y el 87,9 % de las pacientes cursaban su primer ciclo de tratamiento de infertilidad. El 42,4 % de las pacientes presentaron defectos tubáricos como factor de infertilidad, mientras que en un 48,5 % de sus parejas presentaban problemas de infertilidad (factor masculino), en combinación con factores como trastornos uterinos y afección cervical (Tabla II).

Tabla II. Datos generales de la población de pacientes estudiadas.

	Promedio (N=33)	Desviación Estándar
Edad (años)	33,45	5,32
Tiempo de infertilidad (años)	6,98	5,08
Tipo de infertilidad (%)		
Primaria (n=27)	87,9	
Secundaria (n=4)	12,1	
Factor de infertilidad (%)^a		
Daño tubárico	42,4	
Factor masculino	15,5	
Mixto	21,2	
Pacientes en el primer ciclo de reproducción asistida (%)	87,9	
IMC (kg/m²)^b	24,5	1,79

^aAlgunas pacientes presentaron combinación de varios factores entre: daño tubárico, trastornos uterinos, afección cervical, factor masculino. ^b IMC, Índice de masa corporal.

El nivel medio basal de FSH, de las 33 pacientes, resultó ser de $9,70 \pm 5,32$ mUI/mL, el valor medio de LH fue $4,90 \pm 2,73$ mUI/mL, el de estradiol medio fue $28,64 \pm 12,30$ mUI/mL. Por otro lado, los valores de AMH e Inhibina B fueron $3,80 \pm 2,78$ (ng/mL) y $105,13 \pm 71,31$ (pg/mL) respectivamente (Tabla III).

Capítulo V: Resultados.

Tabla III. Valores promedios de las hormonas medidas en todas las pacientes, en el día 3 del ciclo menstrual (N=33)

	Promedio (n=33)	Desviación Estándar
Edad (años).	33,5	5,32
FSH (mIU/mL)	9,70	5,38
LH (mIU/mL)	4,90	2,73
Estradiol (mIU/mL)	28,64	12,30
AMH (ng/mL)	3,80	2,78
Inhibina B (pg/mL)	105,13	71,31

De los parámetros morfométricos del ovario medidos el día 3 del ciclo, se obtuvo que la media (\pm Desv. Estándar) del volumen ovárico (promedio de ambos ovarios) resultó de $4,54 \pm 2,48$ mL, mientras que la cantidad promedio de folículos antrales determinada fue de $5,61 \pm 3,26$ (Tabla IV). Por otro lado, una vez realizada la estimulación se obtuvieron los siguientes resultados: En las 33 pacientes la media de ovocitos recuperados resultó ser $12,09 \pm 5,33$, luego de esto se transfirieron en promedio $2,61 \pm 0,50$ embriones, presentando una tasa de fecundación media de $83,61 \pm 8,81$ %. Por último, el resultado de la prueba de HCG resultó positivo en el 63,6 % de los casos (Tabla V).

Tabla IV. Datos morfométricos del ovario en general de todas las pacientes evaluadas

	Promedio (n=33)	Desviación Estándar
Volumen ovárico (mL) (día 3)	4,54	2,48
Conteo de folículos antrales (día 3)	5,61	3,26

Capítulo V: Resultados.

Tabla V. Número de ovocitos obtenidos, embriones transferidos, tasa de fecundación y resultado de la prueba de HCG

	Promedio (n=33)	Desviación Estándar
Ovocitos recuperados	12,09	5,33
Embriones transferidos	2,61	0,50
Tasa de fecundación (%)		
Pacientes sometidas a ICSI(n=14)	83,57	8,86
Pacientes sometidas a FIV(n=19)	83,63	9,00
Resultado de HCG (% positivos)	63,6	

Al evaluar la correlación que existe entre la hormona Anti Mülleriana con factores como el valor de la hormona Folículo Estimulante y la edad, se observó una correlación negativa, es decir, a medida que la edad de la paciente es mayor y los valores de FSH ascienden, el valor de la AMH tiende a disminuir tal como se puede apreciar en las gráficas 8A y 8C (Fig 8). Lo contrario ocurre entre AMH y el número de folículos antrales, el volumen ovárico medio y el número de ovocitos recuperados, en cuyas gráficas (8B, 8D, 8E, respectivamente) donde se observa una agregación de puntos en sentido creciente, lo que implica que la correlación que estos factores tienen con la AMH es positiva, y a medida que aumentan sus valores, también lo hacen los valores la AMH. Se señalan los *p-valores* de cada correlación (Fig. 8).

Con respecto a la FSH, se encontró que presentó correlación con los valores de LH, el número de folículos antrales (AFC) y el volumen ovárico medio. Con el primer factor presenta una correlación positiva (Fig. 9A), mientras que con el número de AFC y el volumen ovárico presentó una correlación negativa, es decir a media que se obtuvo un número mayor de folículos y un volumen mayor en el ovario, el valor de FSH tendía a disminuir (Fig. 9 B y C). Los *p-valores* se muestran sobre las gráficas corroborando así la correlación estadísticamente significativa.

Los coeficientes de correlaciones se encuentran en la Tabla VII, el signo indica si es una correlación directa (positivo) o indirecta (negativo), conjuntamente se presentan los *p-valores*, de las correlaciones entre los parámetros evaluados que resultaron ser estadísticamente significativos.

Capítulo V: Resultados.

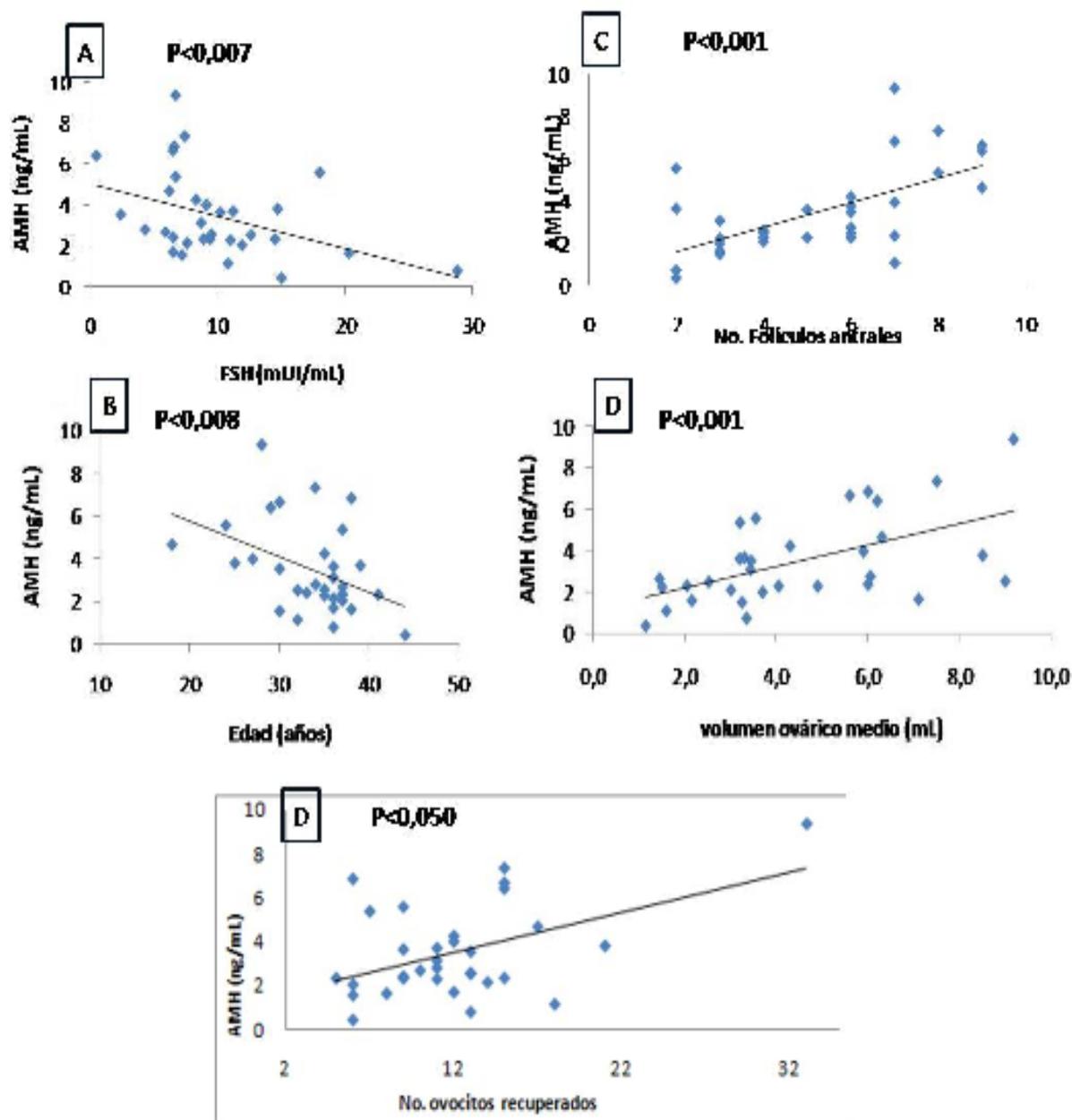


Figura 9. Representación gráfica de las correlaciones entre los niveles séricos de AMH (ng/mL) y FSH

Figura 8. Representación gráfica de las correlaciones entre los niveles séricos de AMH (ng/mL) y FSH (mUI/mL), No. de folículos antrales, edad (años), volumen ovárico medio (mL) y número de ovocitos recuperados, con sus respectivos *p*-valores.

Capítulo V: Resultados.

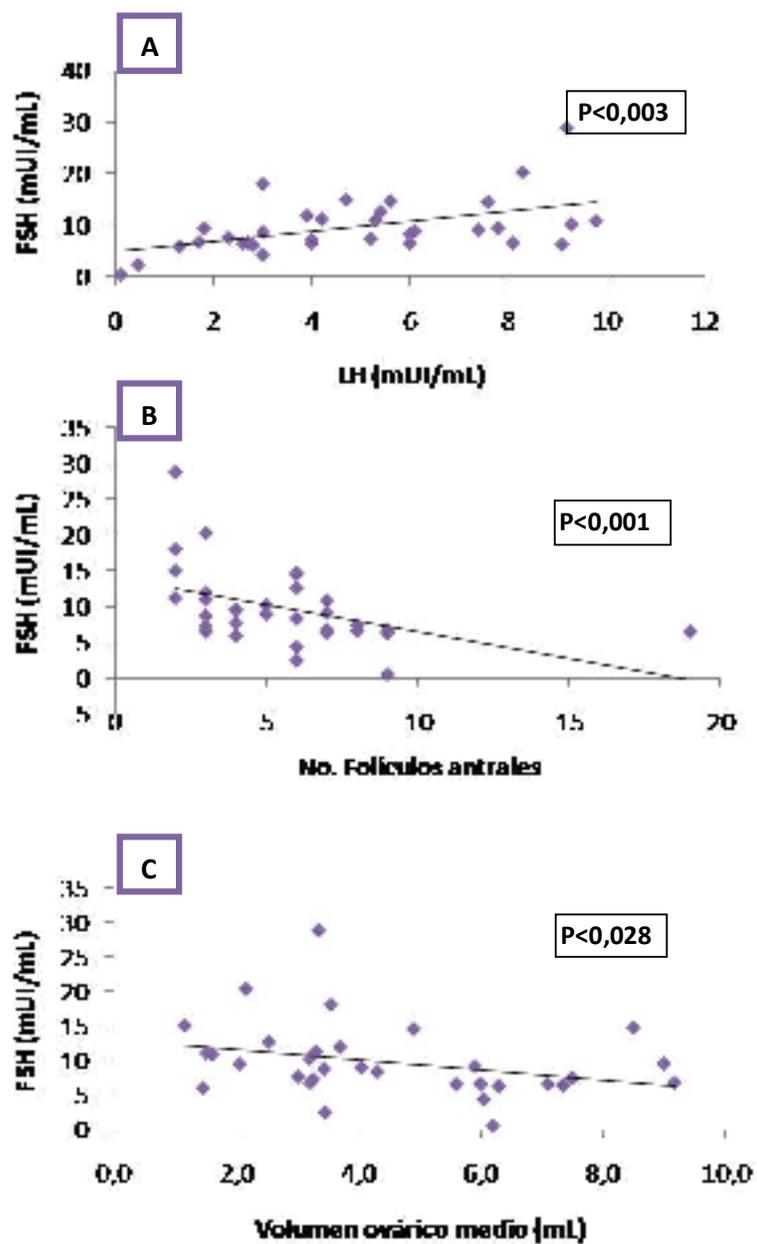


Figura 10. Representación gráfica de las correlaciones entre niveles séricos de FSH (mUI/mL) y LH (mUI/mL), No. De folículos antrales, y volumen ovárico medio (mL).

Capítulo V: Resultados.

Al hacer las correlaciones de Spearman se encontró que existe una relación positiva entre el número de folículos antrales y el número de ovocitos recuperados, hubo un dato atípico que sale de la correlación, de una paciente cuya respuesta fue exagerada, de 33 ovocitos recuperados, sin embargo, en líneas generales se observa que a medida que presentaron más folículos antrales, asimismo se colectaron más ovocitos (Fig 10).

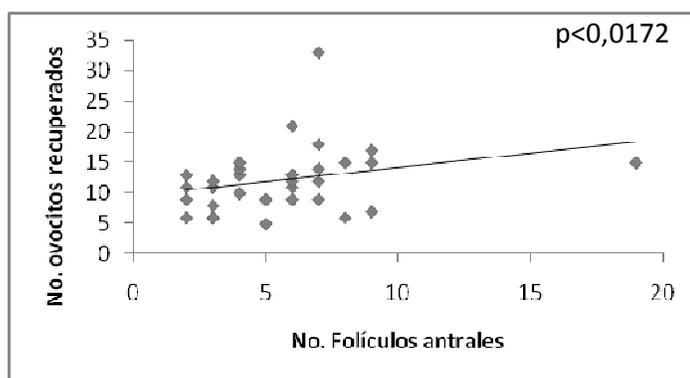


Figura 11. Representación gráfica de la correlación entre el número de folículos antrales (AFC) y el número de ovocitos recuperados.

Cuando se evaluaron los niveles de las hormonas Inhibina B y estradiol, se encontró que ninguna de estas presentaba correlación con los otros parámetros evaluados (edad, volumen ovárico, folículos antrales, las demás hormonas medidas y número de ovocitos colectados). Sin embargo, se observó que entre ellas (Inhibina B y estradiol) si ocurrió una correlación positiva, con incremento recíproco de los valores de ambas hormonas (Fig. 11).

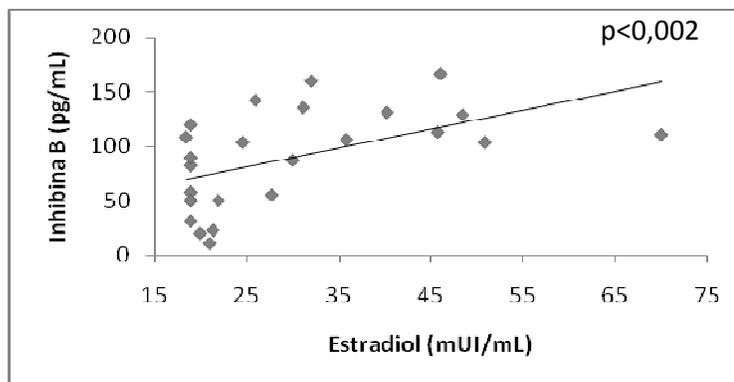


Figura 12. Representación gráfica de la correlaciones entre los valores séricos de estradiol (mUI/mL) e Inhibina B (pg/mL).

Capítulo V: Resultados.

En la Tabla VI se presentan los valores de los coeficientes de correlación de los parámetros expuestos, cuyas correlaciones resultaron estadísticamente significativas, notando que cuatro de ellas tienen correlación negativa, por ejemplo en los casos de AMH vs edad y FSH, así como también FSH vs volumen ovárico y también LH. Los parámetros que presentaron mayor correlación fueron la AMH con los AFC (folículos antrales), seguidos por FSH vs AFC y luego por AMH con volumen medio de los ovarios, mientras que el menor valor de correlación estuvo entre el valor de AMH y el número de ovocitos recuperados, asimismo el *p*-valor resultó el menos significativo estadísticamente, entre los parámetros expuestos en la tabla.

Tabla VI. Tabla resumen de los coeficientes de correlación entre los parámetro evaluados

	R^a	P
AMH vs Edad	-0,455	0,0077
AMH vs FSH	-0,458	0,0073
AMH vs AFC ^b	0,638	0,0001
AMH vs vol. Ovárico medio	0,569	0,0005
AMH vs ovocitos recuperados	0,337	0,05
FSH vs LH	0,5003	0,003
FSH vs vol. Ovárico medio	-0,3828	0,0279
FSH vs AFC	-0,5889	0,0003
No. Ovocitos vs AFC	0,4121	0,0172
Inhibina B vs E ₂	0,5134	0,0022

^aEl signo negativo o positivo indica correlación negativa o positiva respectivamente. ^bAFC=conteo de folículos antrales

Por otro lado, se compararon los valores medios de Inhibina B (\pm desviación estándar) de aquellas pacientes de las cuales se recuperaron entre 5 y 9 ovocitos (fueron llamadas grupo 1: G1, n=11) y aquellas de las cuales se extrajeron entre 10 y 33 ovocitos (fueron llamadas grupo 2: G2, n=22). Esta comparación mostró que el valor medio de Inhibina B en las mujeres del primer grupo fue de $79,00 \pm 40,19$ pg/mL, el cual es menor que el valor de Inhibina B del grupo 2, $118,20 \pm 80,46$ pg/mL. (no significativo) (Fig. 12)

Capítulo V: Resultados.

Cabe destacar la alta desviación estándar que presentó el grupo 2, en comparación con el 1, evitando que la diferencia entre ambos grupos sea estadísticamente significativa, como lo demuestra el p -valor $< 0,179$.

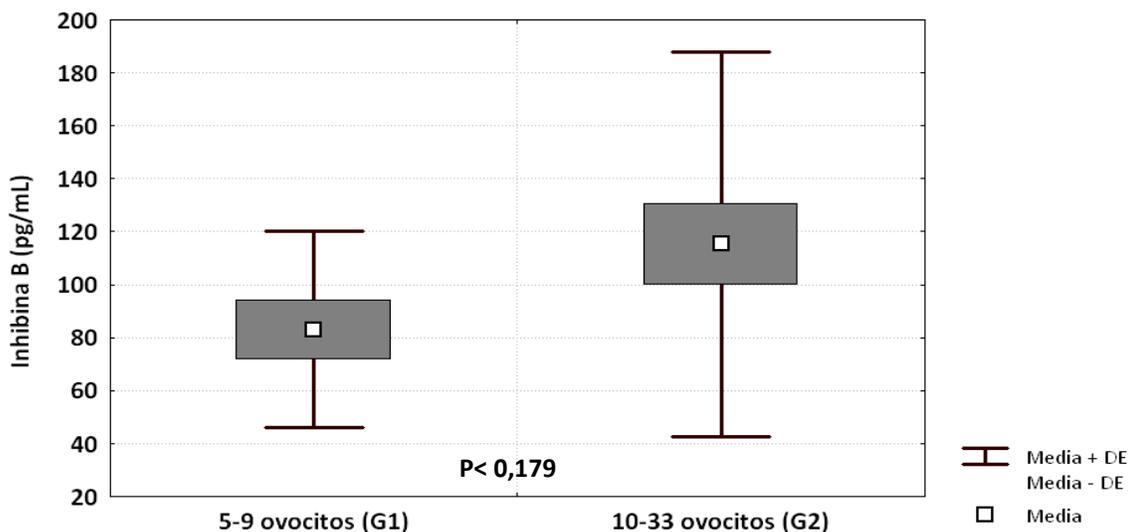


Figura 13. Valores promedio (\pm Desviación Estándar) de Inhibina B en cada grupo de pacientes, aquellas de las cuales se recuperaron < 10 ovocitos (entre 5 y 9, grupo 1:G1, $n=11$) y aquellas que se les extrajeron 10 o más ovocitos (entre 10 y 33, grupo 2: G2, $n=22$). P -valor $< 0,179$.

La separación en dos grupos de pacientes tomando como corte el número de 10 ovocitos se realizó de acuerdo a trabajos anteriores en los que se indicó que cuando se recuperan alrededor de 10 ovocitos la paciente es considerada como buena respondedora al tratamiento de estimulación (Fiçicioğlu *et al.*, 2006 y Elgindy *et al.*, 2007).

En la Fig 13 se observa la misma separación en grupo 1 y 2 pero esta vez representando los valores medios de AMH, que en el primer grupo dieron un valor medio de $3,08 \pm 2,01$ ng/mL, mientras que en el grupo 2 el valor medio fue de $4,16 \pm 3,08$ ng/mL. (no significativo).

Al igual que con los valores de Inhibina B, el grupo 2 presentó una desviación estándar alta, mayor en magnitud a la del grupo 1, lo que provocó que no se observaran diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,301$).

Capítulo V: Resultados.

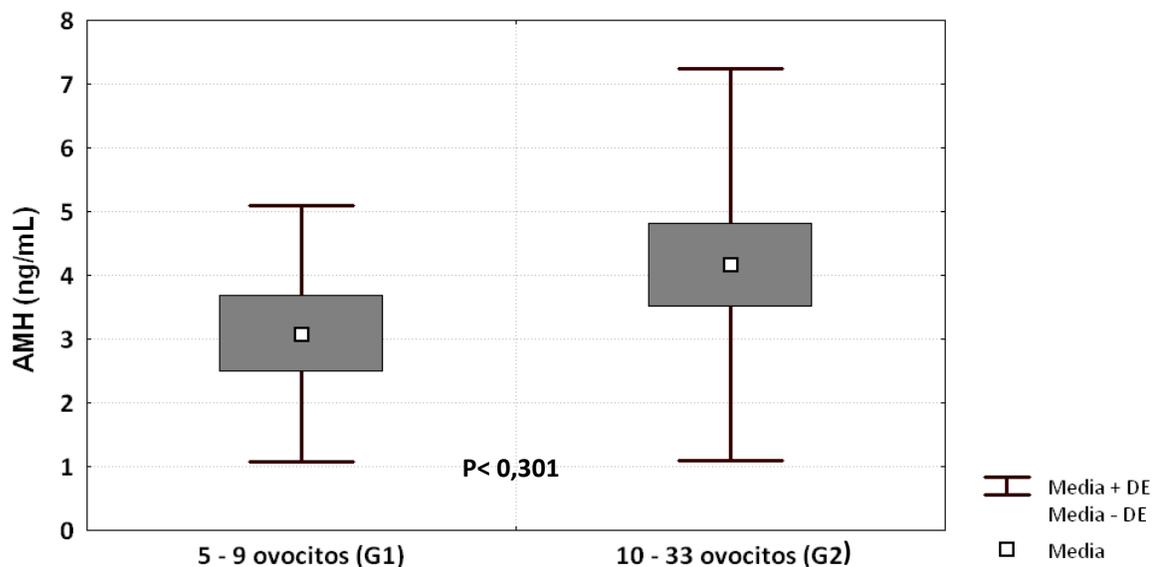


Figura 14 Valores séricos promedio (\pm Desviación estándar) de AMH en cada grupo de pacientes, aquellas en las cuales se recuperaron < 10 ovocitos (entre 5 y 9, grupo 1:G1, n=11) y aquellas que se les extrajeron 10 o más ovocitos (entre 10 y 33, grupo 2: G2, n=22)) *P*-valor < 0,301.

Se observó que las mujeres pertenecientes al grupo donde se obtuvo menor cantidad de ovocitos fueron en promedio, ligeramente de mayor edad que aquellas a las que se le recuperaron más ovocitos. En cuanto a los valores del índice de masa corporal resultaron similares entre ambos grupos. Por otro lado, el nivel de FSH resultó ligeramente más bajo en el segundo grupo, asimismo fue menor la cantidad de embriones transferidos en este grupo. En cuanto a los folículos antrales y los valores tanto de Inhibina B como de AMH fueron mayores en el segundo en relación con el primer grupo. Se observó un porcentaje más alto de pacientes con hCG positivo (embarazo bioquímico) en el primer grupo, así como mayor porcentaje de embriones de buena calidad (Tabla VII).

Capítulo V: Resultados.

Tabla VII. Valores séricos de Hormonas y aspectos morfométricos del ovario por cada grupo de pacientes de acuerdo a los ovocitos recuperados

	5 - 9 ovocitos (n=11)	10 - 33 ovocitos (n=22)	p-valor
Edad	35,91 ± 5,38	32,23 ± 4,96	NS
IMC (kg/m²)	24,18 ± 2,27	24,41 ± 1,14	NS
Tiempo de infertilidad (años)	6,32 ± 4,88	7,32 ± 5,26	NS
FSH día 3 (mUI/mL)	11,44 ± 4,90	8,84 ± 5,50	NS
LH día 3 (mUI/mL)	5,39 ± 2,61	4,66 ± 2,82	NS
Estradiol día 3 (mUI/mL)	26,76 ± 8,76	29,58 ± 13,84	NS
Volúmen ovárico (promedio de ambos) (mL)	3,74 ± 1,66	4,94 ± 2,73	0,036
Folículos antrales	4,82 ± 2,44	6,00 ± 3,59	NS
AMH día 3 (ng/mL)	3,08 ± 2,01	4,16 ± 3,08	NS
Inhibina B (pg/mL) (n=9 y n=18)	79,00 ± 40,19	118,20 ± 80,46	NS
Embriones transferidos	3,74 ± 1,66	2,59 ± 0,50	NS
Calidad embrionaria grado 1 (%)	81,2%	59,09 %	
Resultado HCG positivo	72,72 %	59,09 %	

NS: no significativo

Capítulo VI: Discusión

VI. DISCUSIÓN

El estudio de diversos factores involucrados en el funcionamiento ovárico como el tamaño del mismo, la cantidad de folículos reclutados en la fase preovulatoria, el número de ovocitos obtenidos luego de un tratamiento de estimulación hormonal, así como también los niveles de las hormonas involucradas en el ciclo menstrual y ovárico en general, resultan de gran importancia cuando se trata de evaluar el estado en el que se encuentra la reserva ovocitaria en aquellas mujeres que acuden a la consulta de fertilidad y que son sometidas a tratamientos de reproducción asistida, en los cuales se estimula al ovario (de diferentes formas) para la producción de un número mayor de folículos para la consecuente obtención de más ovocitos de los que se obtendrían en un ciclo menstrual natural, resultando así en un aumento de las probabilidades de concebir y lograr un nacimiento vivo. Debido a esto, es de gran importancia conocer ciertos indicadores de esa capacidad ovárica reproductiva en cada mujer, esos indicadores deben ser de fácil y rápida determinación. Por este hecho, el objetivo principal de este estudio fue la evaluación de los valores séricos primordialmente de dos hormonas que han sido reportadas en la bibliografía como potenciales indicadores de la reserva folicular ovárica, la Inhibina B y la hormona Anti Mülleriana (AMH), asimismo evaluar su correlación tanto con otras hormonas implicadas en el ciclo menstrual, como su correlación con factores morfométricos y físicos del ovario como el conteo de folículos antrales (AFC), dimensiones del ovario y con la cantidad de ovocitos obtenidos en cada ciclo de estimulación ovárica.

En el presente estudio se manejaron dos conceptos principales que fueron el foco director de la investigación, el primero de ellos, la Reserva Ovárica (o reserva folicular) la cual se utiliza para describir el potencial funcional del ovario y representa el *pool* total de folículos con que cuenta el ovario en un momento determinado de la vida reproductiva y el cual se puede reflejar en el número y la calidad de los folículos en crecimiento los cuales coordinarán la actividad hormonal dentro del ovario en un ciclo menstrual.

El segundo término de importancia es la respuesta ovárica, el cual se refiere a la reacción endocrina y folicular de los ovarios a un estímulo bioquímico determinado. Este

Capítulo VI: Discusión

término permite al clínico evaluar la dosis de hormonas a suministrar a la paciente para la inducción del eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante los ciclos de reproducción asistida..

Las pacientes incluidas en el estudio (n=33), eran mujeres con un promedio (\pm desviación estándar) de $33,5 \pm 5,32$ años. No presentaron desórdenes de peso o talla. Llegaban a los centros de fertilidad principalmente con problemas tubáricos y también de origen masculino o mixto, que presentaban en general más de 6 años de infertilidad, lo cual las motivó a buscar ayuda profesional y en su mayoría estaban en el primer ciclo de estimulación de reproducción asistida.

A todas estas pacientes se les extrajo una muestra de sangre en el día 3 del ciclo para posteriormente medir el nivel de las diferentes hormonas que evaluamos en este estudio. Se seleccionó esa fecha ya que es en la fase folicular temprana cuando se seleccionan los folículos para la posterior ovulación, por lo que se refleja el estado de dicha reserva folicular. Así mismo se realizó la medición del volumen ovárico y el conteo de los folículos antrales.

Una vez llevada a cabo la estimulación, se tomó nota de la cantidad de ovocitos recuperados, la tasa de fecundación, luego el número de embriones transferidos, el estadio de transferencia (no se muestra la data).

El número de pacientes en cada ensayo fue variable ya que en algunos casos los valores hormonales fueron no detectables por el kit utilizado.

Se encontró entonces que hubo correlación entre varios de los aspectos que se evaluaron, por ejemplo la AMH presentó correlación negativa con la edad y la FSH, lo cual era de esperarse puesto que a medida que aumenta la edad cronológica también lo hace la edad del organismo y la mujer que cuenta con un número finito de folículos mientras más edad tenga, menos folículos remanentes tendrá y la AMH tenderá a disminuir pues esta es producida por las células de la granulosa del total de los folículos presentes en el ovario y al haber menos cantidad de folículos consecuentemente el nivel de AMH es menor. En relación con el aumento de la FSH, indica que al haber menor número de folículos en el ovario se requiere de una señal hipofisiaria mayor de FSH para

Capítulo VI: Discusión

lograr el reclutamiento de folículos para alcanzar la ovulación, así se observa un aumento en la frecuencia pulsátil de GnRH estimulando así la liberación de FSH y el aumento de sus niveles para el reclutamiento de la siguiente cohorte de folículos, por lo cual es considerado por muchos autores como índice de reserva ovárica (Wolff y Taylor, 2004).

Por otro lado, la AMH presentó correlación positiva con el número folículos antrales del día 3 del ciclo menstrual, lo cual resulta consistente con los resultados anteriores, puesto que la AMH se expresa en gran cantidad en los folículos en diferentes estadios desde primarios hasta folículos antrales tempranos, mientras que en los estadios de folículos antrales tardíos y preovulatorios disminuye la expresión de AMH. Se ha observado que los niveles circulantes de AMH, los cuales representan la liberación colectiva del *pool* de folículos pequeños en el ovario, en efecto se correlacionan fuertemente con el número de folículos antrales, es decir aquellos que una vez reclutados siguen madurando, por lo cual se ha sugerido que los niveles de AMH reflejan tanto la calidad como la cantidad del *pool* ovárico (Yding *et al*, 2008). Aunque se desconoce el rol preciso de la AMH en la foliculogénesis, la hipótesis actual señala que la AMH disminuye la sensibilidad de las células de la granulosa a la estimulación por FSH, limitando así el número de folículos que se desarrollan en el período preovulatorio (Yding *et al*, 2008). En nuestros resultados se observó que la FSH se correlacionó de manera negativa con los folículos antrales, es decir a mayor concentración de FSH, menor número de folículos antrales en el día 3 del ciclo y viceversa.

Por otra parte, la FSH presentó correlación negativa con la AMH, lo cual podría resultar lógico si se toman en cuenta los estudios en los que se observa una desensibilización a la FSH cuando existen altos niveles de AMH (Durlinger *et al.*, 2001).

Como ya se ha indicado, la bibliografía señala que la AMH refleja la calidad y cantidad del *pool* de folículos preantrales, lo que puede explicar los resultados de nuestro estudio donde la AMH presentó una correlación positiva con el volumen ovárico y el número de ovocitos recuperados, puesto que al presentar un mayor número de folículos preantrales, la capacidad del ovario aumenta, haciendo lo mismo con sus dimensiones, y al obtener así más folículos antrales maduros se aumenta

Capítulo VI: Discusión

la probabilidad de que al momento de la ovulación, se recuperen más ovocitos. Asimismo resulta lógica la correlación positiva entre el número de ovocitos recuperados y el número de folículos antrales (Yding *et al.*, 2008).

La FSH por su parte presentó correlación positiva con los niveles de LH, lo cual es un resultado esperado, ya que al crecer los folículos estos favorecen el aumento de las concentraciones de estradiol en el ovario lo cual sensibiliza a la hipófisis a la GnRH, generando así la liberación de FSH y LH (Sloney *et al.*, 2005)

Otra correlación positiva que se obtuvo fue la de la Inhibina B con los niveles de estradiol. La Inhibina B es una molécula glicoprotéica que consta de dos subunidades, una α y una β (β B), esta última la diferencia de la Inhibina A (que es β A) la cual se expresa en mayor proporción en la fase lútea, mientras que la Inhibina B se expresa en mayor proporción en la fase folicular. La Inhibina B en el día 3 del ciclo menstrual, es indicativo de la cohorte de folículos reclutados, por lo tanto puede dar indicios del número de folículos en línea base para ese ciclo (Peñarrubia *et al.*, 2000). Varios estudios se han basado en el valor de Inhibina B como potencial marcador de reserva ovárica pues la misma es producida por las células de la granulosa en los folículos antrales, mientras que la FSH es un indicador indirecto de origen hipofisiario. En el estudio realizado por Mikkelsen *et al.*, (2001), no se halló correlación entre Inhibina B y el número de ovocitos recuperados, al igual que en nuestro estudio. Adicionalmente en dicho estudio, la Inhibina B no resultó ser mejor que la edad y el número de ovocitos recuperados en cuanto a la predicción de los resultados de los tratamientos de reproducción asistida, lo mismo se observó con nuestro estudio, en el que la Inhibina B sólo presentó correlación con los niveles de estradiol y viceversa, lo cual podría explicarse por el hecho de que la Inhibina B está implicada estrechamente en los cambios funcionales de los folículos durante el ciclo menstrual y con el envejecimiento del ovario (Gnoth *et al.*, 2008) la Inhibina B y el estradiol son producidos por los folículos en crecimiento dentro del ovario, sin embargo, en este estudio, el estradiol no tuvo correlación con la FSH.

Diversos estudios que señalan que el estradiol parece ser un factor crítico en la regulación de la fase lúteo-folicular de la FSH. Se piensa que la caída en los niveles de

Capítulo VI: Discusión

estradiol, asociada con la luteólisis inicia el aumento interciclo de la FSH. La producción aumentada de estradiol o su administración exógena durante la fase folicular temprana podría causar un decaimiento en las concentraciones de FSH por efectos de retroalimentación negativa sobre la hipófisis y un mal desarrollo folicular (Mikkelsen *et al*, 2001).

Existen opiniones encontradas en cuanto a la utilidad del estradiol como indicador de la respuesta ovárica, algunos indican que este se relaciona con la edad de los folículos y su buen funcionamiento, sin embargo otros no concuerdan con esta afirmación. Para evaluar la utilidad del estradiol como indicador de reserva folicular Phoppong *et al*,(2000) realizaron un estudio con 302 mujeres con ciclos menstruales regulares y no pudieron confirmar al estradiol como un predictor preciso de la respuesta ovárica, sin embargo sugirieron que haciendo una individualización de los casos, el estradiol podría tener un rol crucial principalmente en mujeres de edad más avanzada (Phoppong *et al*, 2000). Hasta los momentos no se ha certificado al estradiol como marcador de reserva folicular ni indicador de respuesta ovárica.

En la segunda parte de esta investigación se separaron las pacientes en dos grupos, en base a los ovocitos recuperados: menos de 9 y más de 10, basados en los resultados presentados por Fiçicioğlu *et al*,(2006) y Elgindy *et al*, (2007) quienes señalaron que las pacientes de las cuales se recuperaron alrededor de 10 ovocitos podían ser consideradas buenas respondedoras en los ciclos de reproducción asistida.

Al realizar esta separación, se obtuvieron valores diferentes de todas las hormonas evaluadas FSH, LH, estradiol, Inhibina B y AMH entre ambos grupos, así como también hubo diferencias en el tiempo de infertilidad, volumen ovárico, cantidad de embriones transferido, calidad embrionaria y resultado de la prueba de hCG. No obstante estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con excepción del volumen ovárico que fue superior en el grupo donde se recuperaron más de 10 ovocitos. Probablemente no hubo diferencia debido a las altas desviaciones estándar en cada grupo y debido al hecho de que el número de pacientes en cada grupo no fue muy grande.

Llama la atención los resultados obtenidos en cuanto a la calidad embrionaria y la prueba de hCG positiva, donde se observó que tanto la calidad embrionaria como el

Capítulo VI: Discusión

resultado positivo de la prueba de HCG resultaron mayores en las pacientes en las cuales se recuperó menor cantidad de ovocitos, lo que podría explicarse por el hecho de que el organismo naturalmente tiende a sacrificar cantidad por calidad, es decir, a pesar de que en estas mujeres se recuperaron menos ovocitos que en el otro grupo, dichos ovocitos presentaban mejor calidad, en promedio, que aquellos recuperados del otro grupo de pacientes con mayor respuesta ovárica.

Asimismo, la bibliografía señala como pobres respondedoras a aquellas pacientes de las cuales sólo se recuperaron ≤ 2 ovocitos (Nelson *et al.*, 2007), y en nuestro estudio todas las pacientes rindieron mínimo 5 ovocitos, por lo tanto todas entran dentro del rango de respondedoras normales, teniendo dos pacientes con respuestas exageradas, una igual a 21 ovocitos y la otra de 33 (no se muestra la data), las cuales se consideran hiperestimuladas de acuerdo a la misma clasificación.

Dentro de toda la escasa uniformidad de criterios que existe para clasificar a pacientes en base a la respuesta ovárica Gorgy y Taranissi, (2001) señalaron que las mismas pueden reunirse, en la mayoría de los trabajos de investigación, en dos grupos: las pobres respondedoras jóvenes las cuales son pacientes con aproximadamente 37 años de edad y con un peso alrededor de los 70 Kg, cuyos ciclos no fueron completados por presentar 5 o menos folículos en desarrollo, luego de nueve días de dosis diaria de inyecciones de gonadotropina. También se incluye en este grupo a aquellas pacientes que requirieron una dosis muy alta (más de 600 IU) de gonadotropina por ovocito recuperado. Debe considerarse que las pacientes con más de 38 años que presentan baja respuesta, en la mayoría de los casos, es debido a la edad, por otra parte las pacientes con sobrepeso, tienen mayor posibilidad de aumentar su respuesta ovárica si pierden peso (Gorgy y Taranissi, 2001).

En resumen, la mayoría de las mujeres con reserva ovárica reducida aún presentan ciclos menstruales regulares, sin embargo dicha reducción sólo será clínicamente aparente cuando la función ovárica se ve severamente comprometida, por lo cual la determinación de dicha reserva se ha convertido en uno de los objetivos principales en la evaluación de la infertilidad, frecuentemente cuando ocurre el aumento en niveles de FSH de forma natural ya la paciente se encuentra en la transición

Capítulo VI: Discusión

perimenopáusica, sin embargo también podría deberse a la presencia de polimorfismos del receptor y no a una reserva ovárica reducida. Esta incertidumbre hace necesaria la búsqueda de un marcador confiable y que pueda detectar tempranamente el decaimiento en el número de folículos antrales.

De la literatura actual se ha propuesto a la AMH como un marcador prometedor y confiable, lo que se confirmó en nuestro estudio ya que la AMH presentó correlación con muchos de los parámetros evaluados (van Disseldorp *et al.*, 2008; Gnoth *et al.*, 2008).

Por su parte, la Inhibina B, está quedando cada vez más desplazada como indicador de reserva ovárica, no obstante sigue teniendo mucha importancia en la determinación de la salud ovárica, en su ciclicidad hormonal y en la calidad folicular. Otro aspecto que dificulta el uso de la Inhibina B podría ser el inconveniente que presenta el ensayo ELISA en discriminar entre los dos tipos de inhibina (A y B), debido a la semejanza entre sus subunidades β (Seifer *et al.*, 1997), sin embargo los últimos kit de detección de la Inhibina B, han reducido las probabilidades de reacción cruzada con otras moléculas muy similares como Inhibina A, activinas y folistatina. Por otro lado, existe la posibilidad de que la molécula de Inhibina B se degrade con la congelación y descongelación de las muestras de suero, aún se desconoce bajo qué mecanismo, por lo que se recomienda almacenar bien las muestras de suero hasta el momento de realizar el ensayo.

Se hace necesaria entonces la determinación de puntos de corte en los niveles séricos de AMH así como de Inhibina B (valores normales) para tener un soporte clínico en las decisiones con respecto a los tratamientos de estimulación ovárica de cada paciente. Así como también resulta de gran importancia la realización de curvas ROC (característica operativa del receptor, por sus siglas en inglés), para observar la sensibilidad de cada prueba y así evaluar el valor predictivo tanto de las de hormonas evaluadas como también de los parámetros morfométricos estudiados, junto con el número de ovocitos recuperados, número de embriones transferidos, porcentaje de la prueba de hCG positiva y número de nacimientos vivos.

Capítulo VII: Conclusión y Recomendaciones

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos se puede señalar que:

- El conteo de folículos antrales es un método muy preciso, poco invasivo, directo, sin embargo, su interpretación es subjetiva ya que el conteo de los AFC va a depender de la observación de cada especialista. Por este motivo debería ser usado en conjunto con algún otro marcador preferiblemente bioquímico, por ejemplo la AMH, con la cual se observó una correlación positiva tanto con AFC como con el número de ovocitos y negativa con los valores de FSH.
- Con respecto a las pruebas bioquímicas, se tiene que la FSH es un reflejo indirecto de la cantidad de folículos que comienzan a ser reclutados en el ovario alrededor del día 3 del ciclo menstrual, la concentración de FSH presenta un alto nivel de confiabilidad en cuanto a la predicción de reserva ovárica, a pesar de no producirse en el ovario.
- Con respecto a la LH, ésta no resulta ser un marcador de reserva ovárica sino una guía en el monitoreo del correcto funcionamiento del ciclo menstrual.
- En cuanto al estradiol, existen discrepancias y falta de consenso con respecto a su importancia como indicador de la reserva ovárica. Se ha encontrado que en lugar de señalar la reserva folicular de la mujer, podría indicar la capacidad de respuesta del ovario a los estímulos hormonales en el tratamiento de reproducción asistida, es decir, podría señalar la capacidad de respuesta ovárica en un ciclo particular.
- La Inhibina B, en este estudio no resultó ser indicadora del potencial reproductivo en las pacientes evaluadas, al igual que el estradiol, por lo cual no se recomienda utilizarla como prueba de rutina en la determinación de la reserva ovárica en pacientes que se encuentran bajo un ciclo de estimulación ovárica controlada. La inhibina por su parte podría dar indicios de la calidad folicular.
- La AMH proporcionó indicios de ser un buen indicador de la reserva folicular al mantener correlación con una serie de variables determinadas de rutina en los

Capítulo VII: Conclusión y Recomendaciones

tratamientos de estimulación ovárica (edad, FSH, AFC, volumen ovárico y número de ovocitos recuperados).

- Por otra parte nuestro estudio plantea en un futuro cercano aumentar el número de pacientes evaluadas y entonces realizar el análisis del poder predictivo de las pruebas evaluadas en este estudio, en especial de la AMH, mediante curvas ROC.
- En el presente estudio se demuestra que la medición de los folículos antrales, la determinación de los valores séricos de la AMH, así como el factor edad, deberían ser determinados en conjunto para sumar robustez a la predicción de la reserva ovárica.

Capítulo VIII: Anexos

VIII. ANEXOS

VIII.1. Criterios de Inclusión de pacientes para este estudio:

Criterios de inclusión

- 1- Ambos ovarios presentes y sin anomalías morfológicas
- 2- Sin enfermedades presentes o pasadas que afecten los ovarios, o estereoidogénesis ovárica.
- 3- Índice de masa corporal entre 18-25 kg/m²
- 4- Que puedan visualizar adecuadamente ambos ovarios en el ecosonograma.
- 5- Que no haya cese funcional del ovario.

Las causas de infertilidad pueden ser por: anomalías espermáticas anomalías tubáricas e infertilidad inexplicada.

Historia Clínica

Mujeres normo-ovulatorias

Cuestionario: raza, educación, tabaco, alcohol

Peso y estatura (Para calcular índice de masa corporal)

Ecosonograma

Ecosonograma, planos sagital y coronal. En la máxima resolución se mide el ancho y alto del ovario. Se calcula la suma del ovario derecho más el izquierdo y luego se divide entre dos. Se calcula el diámetro: longitud promedio + ancho promedio/2

Contaje de folículos: Suma de todos los folículos de 2-12 mm (media de los dos diámetros ortogonales) de los dos ovarios. Conteo de Folículos antrales: Rangos <5 (baja respondedora); 5-10; (buena respondedora); >10 (alta respondedora).

Determinaciones realizadas en la fase folicular temprana (1-3 días)

Capítulo VIII: Anexos

- Muestras de suero en la fase folicular temprana (día 1-3)
- Niveles de FSH y estradiol (Pruebas Rutina)
- Niveles de Hormona antimuleriana (AMH) y de Inhibina B. (Pruebas no rutinarias).

VIII.2. Carta modelo sobre consentimiento informado entregada a las pacientes que fueron sometidas al estudio de esta investigación.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Caracas, Abril, 2008

Yo, _____, CI: _____, autorizo a los investigadores, Oriana Rosales, Pedro Martinez y María Isabel Camejo (investigador responsable), a utilizar mis muestras de suero para determinar los niveles hormonales de FSH, estradiol, AMH e Inhibina B, y otras hormonas que consideren necesarias, así como la información ecográfica ovárica para ser utilizada en un proyecto de investigación que contribuirá a determinar el valor de estos indicadores en la reserva ovárica. Adicionalmente se me ha informado sobre los beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna y a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos.

El Investigador Responsable me ha dado la seguridad de que la muestra no será utilizada para un fin diferente a la de la presente investigación, además no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio.

Nombre y firma

Nombre, firma del Investigador Responsable.

Números telefónicos a los cuales se puede comunicar en caso de emergencia y/o dudas y preguntas relacionadas con el estudio.

Bibliografía

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M. y Nanning, C. (2004). Cirugía endoscópica para la enfermedad tubárica en mujeres referidas a centros de fertilización *in vitro*. *Rev Chil Obstet Ginecol*; 69(4): 307-311.
- Appleton, Tim 2006, Zander IVF, Inc, a Glossary of Assisted Reproduction. IFC Resource Centre, Cambridge UK [Disponible on-line] < <http://www.ifcresourcecentre.co.uk/glossary/gloslist.htm> >
- Bowen, S., Norian, J., Santoro, N. y Pal, L. (2007). Simple tools for assessment of ovarian reserve (OR): individual ovarian dimensions are reliable predictors of OR. *Fertil Steril* 88, 390-395
- van Disseldorp, J., Faddy, M.J., themmen, A.P., de Jong, F.H., Peeters, P.H., van der Schouw, Y, T. y Broekmans, F.J. (2008). Relationship of serum anti-mullerian hormone concentration to age of menopause, *J. Clin Endocrin Metab* 93, 2129-2134.
- Durlinger, A.L., Gruijters, MJ., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Machtigal M.W., Uilenbroek, J.T., Grootegeod, J.A. y Themmen, A.P. (2002). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinol* 143: 1076-1084.
- Edwards, R. y Rísquez, F. (2003). *Reproducción Asistida Moderna*. Reproductive Healthcare Ltd: Cambridge, United Kingdom, p.493.
- Elgindy, E.A., El-Haieg D.O. y El-Sebaey, A. (2007). Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 89, 1670-1676.
- Fausser, B.C.J.M., Diedrich, K. y Devroey, P. (2008). Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum reprod update* 14, 1-14.
- Fıçıcıođlu, C., Kutlu T., Baglam, E. y Bakacak, Z. (2006). Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 85, 592-596.
- Gnoth, C., Schuring, A.N., Friol, K., Tigges, J., Mallmann, P. y Godehardt, E. (2008). Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 23, 1359-1365.
- Gorgy, A. y Taranissi, M. (2001). Defining and predicting the poor responder!. *Fertil Steril* 75, 226-227.
- Hill, R., Wyse, G. y Anderson, M. (2006). *Fisiología Animal*. Editorial Médica Panamericana: Caracas. p. 916.
- Jori, F., Lopez-Béjar, M., Mayor, P. y Lopez, C. (2001). Functional anatomy of the ovaries of wild brush tailed porcupines (*Atrerurus africanus*, Gray, 1842 from Gabon. *J Zool*. [disponible on-line] < http://www.tesisexarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0919101-122006/fjm9de10.pdf >

Bibliografía

- Kinney, A., Hline, J., Nelly, A., Reuss, M.I. y Levin, B. (2007). Smoking, alcohol and cafferine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod* 22, 1175-1185.
- Macklon, N.S. y Fauser, B.C. (2005). Ovarian reserve. *Semin Reprod Med* 23,248-256.
- Maheshwari A., Fowler P. y Bhattacharya S. (2006) Assessment of ovarian reserve-should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod* 21,2729-2735
- Mikkelsen, A.L., Andersson, A.M., Skakkebæk, N.E. y Lindenberg, S. (2001). Basal concentrations of oestradiol may predict the outcome of in-vitro maturation in regularly menstruating women. *Hum Reprod.* 16, 862-867
- Nelson, S.M., Yates, R.W., Fleming, R. (2007). Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles-implications for individualization of therapy. *Hum Reprod* 22, 2414-2421.
- Northwest Center for Reproductive Sciences (NCRS). (2006). Website Hosted by Einstein Medical [on-line] en: < <http://www.nwreprosci.com/donor/indications.php> >
- Padilla, F., Morales, M. y Tinoco, A. (2006). Síndrome de hiperestimulación ovárica grave, presentación de un caso. *Maternidad Sotomayor*.
- Peñarrubia, J., Balasch, J., Fábregues, F., Carmona, F., Casamitjana, R., Moreno, V., Calafell, J. y Vanrell, J. (2000). Day 5 inhibin B serum concentrations as predictors of assisted reproductive technology outcome in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod* 15, 1499-1504.
- Pérez A. J.L. (2006). *Manual de Patología General*. 6ta ed. Editorial Masson, Madrid. Pp XIV + 748.
- Phophong, P., Ranieri, D.M., Khadum, I., Meo, F. y Serhal, P. (2000). Basal 17 β -estradiol did not correlate with ovarian response and in vitro fertilization treatment outcome. *Fertil Steril* 74,1133-1136.
- Purves, W., Orians, G., Heller, H. y Sadava, D. (1999). *Life. The science of biology*. 5ta edición. W.H. Freeman and Company, Utah. Pp.1243.
- Seifer, D., Lambert-Messerlian, G., Hogan, J., Gárdiner, A., Blazar, A. y Berk, C. (1997). Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 67, 110-114.
- Shoham, Z., Howles, C. y Jacobs, H. (1999). *Female Infertility Therapy Current Practice*. Martin Dunitz, Ltd., Londres. Pp XV + 429.
- Sliney, K.; Marsh, K. y La Barbera, A. (2005). *Normal and Disordered Feedback Mechanisms – Female (Animations)*. University of Cincinnati College of Medicine, Ohio. Disponible, en:

Bibliografía

<<http://dmc.ohiolink.edu/cgi/i/image/getimage-idx?viewid=3-2-1CREDITFEEDBACKLOOP.SWF;cc=uccom;entryid=x-3-2-1creditfeedbackloop;view=image>>

StatSoft, Inc. (1999). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, Ok.

Surrey, E. y Schoolcraft, W. (2000) Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 73, 667-676

Wolff, E. y Taylor, H. (2004). Value of the day 3 follicle-stimulating hormone measurement. *Fert Steril* 81, 1486-1487.

Yding Andersen, C. Rosendahl, M. y Byskov, A.G. (2008). Concentration of Anti-Müllerian hormone and inhibin-B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles. *J. Clin Endocrin Metab* 93, 2344-2349.

Yen, S., Jaffe, R. y Barbieri, R. (2001). *Endocrinología de la Reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ta ed. Editorial Médica Panamericana: Caracas.