

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

## **Máster en Investigación en Medicina**

# **“Desencadenamiento de la ovulación con aGnRH en ciclos FIV/ICSI *vs* hCG”**

Trabajo Fin de Máster

Autora: Vanesa Castañón Bernardo. Cotutor: Prof. Dr. D. Agustín Hidalgo Balsera.

Tutora: Dra. Dña. Lourdes Sánchez Castro.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Variables recogidas en el estudio	15
3.2. Criterios de inclusión	18
3.3. Protocolos de estimulación ovárica	18
3.4. Punción folicular y protocolos de laboratorio	23
3.5. Transferencia embrionaria	29
3.6. Protocolo de soporte de la fase lútea para transferencia en fresco	31
3.7. Sistemas de congelación de embriones	32
3.8. Protocolo de soporte de la fase lútea para criotransfer	33
4. RESULTADOS	35
4.1. Análisis de la muestra en cuanto a edad y FSH al 3º día	35
4.2. Comparación de parámetros previos a la transferencia de embriones	37
4.3. Comparación de las transferencias en los dos grupos y tasas de embarazo en fresco en ambos grupos	38
4.4. Ciclos con congelación de embriones en ambos grupos	39
4.5. Tasas de embarazo en ciclos con congelados en ambos grupos	41
4.6. Tasas de embarazo globales	42
4.7. Análisis del riesgo de SHEO en los grupos estudiados	43
4.8. Análisis de las tasas de cancelación en ambos grupos	44
5. DISCUSIÓN	45

6. CONCLUSIONES	53
7. BIBLIOGRAFÍA	54

## **1. INTRODUCCIÓN**

En los últimos años se ha introducido el uso de los análogos de la GnRH (aGnRH) como fármaco alternativo para desencadenar la ovulación en algunos de los ciclos de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

El motivo fundamental de esta práctica es la prevención del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHEO).

El SHEO es una complicación iatrogénica de las TRA que suele seguir a la estimulación ovárica y a la maduración final de los ovocitos, conseguida con la gonadotropina coriónica humana (hCG). Tradicionalmente se utiliza esta molécula para desencadenar la ovulación por su similitud biológica y estructural con la LH.

El mecanismo fisiopatológico que explicaría el SHEO aún no se conoce por completo y la mayoría de los acercamientos terapéuticos al Síndrome han sido empíricos. Sí sabemos que el SHEO se acentúa con el embarazo.

Se manifiesta en el 0,1-4% de los tratamientos que requieren una estimulación ovárica controlada y requieren ingreso el 1,9% de los casos (1). En otras fuentes se habla de un 0,6-10% (2) Se ha demostrado que, tras la administración de hCG, el ovario libera una serie de sustancias vasoactivas que incrementan la permeabilidad vascular y hacen fluir líquido hacia el tercer espacio, con ascitis e incluso llegando a generar consecuencias fatales en los casos más severos, en los que cursa con hemoconcentración e hipovolemia.

La gravedad del cuadro incluye un espectro de síntomas que va de menos a más gravedad.

Es por esto que el Síndrome se puede clasificar en función de la forma clínica en:

- 1- **Leve:** Puede haber ascitis que se demuestra ecográficamente, hemoconcentración ligera y cifras de leucocitos algo elevadas. Pueden presentar molestias abdominales, náuseas y vómitos y diarrea.
- 2- **Moderado:** La paciente se encuentra algo más molesta que en el caso anterior pero no llega a tener gran cantidad de líquido libre.
- 3- **Grave:** Los fluidos se escapan en mayor cantidad a la cavidad peritoneal e incluso pleural y pericárdica, provocando hipovolemia y hemoconcentración severa.

Los síntomas incluyen una ganancia rápida de peso de más de 1 kg/día, distensión abdominal, náuseas y vómitos. Puede llegar incluso a la dificultad respiratoria, oliguria progresiva, taquicardia e inestabilidad hemodinámica.

El SHEO se clasifica también en función del momento de aparición en dos formas clínicas de presentación:

- 1- **SHEO temprano:** Se relaciona con la respuesta del ovario a la estimulación y aparece como efecto de la administración exógena de hCG. Normalmente aparece 9 días después de la punción folicular.
- 2- **SHEO tardío:** Ocurre después de los primeros 10 días y se correlaciona más con los niveles endógenos de hCG producidos al implantarse un embrión (1)

Las causas que pueden hacer de esta una patología fatal son el fallo hepatorenal, la insuficiencia respiratoria aguda, hemorragia por ruptura ovárica y tromboembolismo (1).

El seguimiento se realiza valorando las constantes vitales, la circunferencia abdominal a diario, ecografía diaria, radiografía de

tórax y ecocardiografía si se sospecha derrame.

Se han descrito varias moléculas que pueden jugar un papel en este proceso.

Una ellas es el “vascular endothelial growth factor” (VEGF) que, junto con

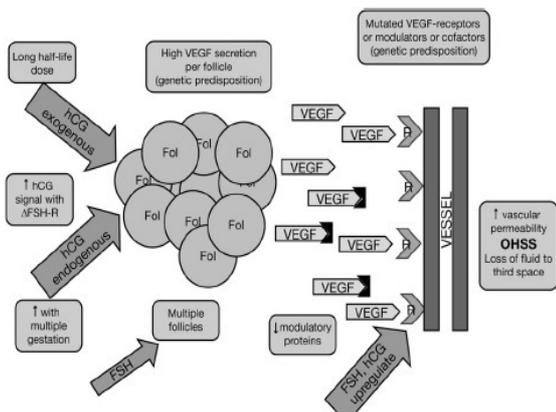


Figura 1. Patogénesis del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

otras citocinas proinflamatorias juega un papel fundamental (3).

El VEGF originalmente se describió inicialmente como angiogénico, pero también como un factor de permeabilidad vascular por los efectos observados tras su secreción por células tumorales.

Sus receptores están presentes en el endotelio y pertenecen a la familia de las tirosin-kinasas. Hasta el momento se han identificado dos receptores endoteliales: VEGFR-1 (Flt-1) u VEGFR-2 (Flk1/KDR). El segundo parece estar más implicado en la permeabilidad vascular, angiogénesis y vasculogénesis; mientras que el Flt-1 parece contrarrestar las acciones del Flk1/KDR (4). El VEGF aumenta la permeabilidad vascular provocando un paso de líquido intravascular al tercer espacio. Es producido por las células endoteliales y su producción está favorecida por la hCG.

Entre los factores de riesgo están edad joven, historia de elevada respuesta a gonadotropinas, SHEO previo y síndrome de ovario poliquístico (SOP).

Dado que las medidas farmacológicas y preventivas son difíciles de aplicar en muchas ocasiones porque algunas pacientes responden inadecuadamente a la medicación, lo mejor es tratar de reconocer a las pacientes con más riesgo antes de iniciar los tratamientos. Se han usado diversos biomarcadores para ajustar las dosis de gonadotropinas en el estímulo y evitar, en la medida de lo posible, la hiperestimulación. Entre ellos están (2):

- **FSH 3° día del ciclo:** Su determinación nos sirve como reflejo del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. FSH <1 mUI/ml indican hipogonadismo hipogonadotropo, FSH >10 mUI/ml indican una reserva folicular comprometida y FSH>20 mUI/ml indican una reserva folicular agotada. Su gran problema es la variabilidad de un ciclo a otro. Con la edad se altera el eje hormonal de la mujer y se pierde progresivamente dotación folicular. Los niveles de las distintas hormonas están interrelacionados entre sí. Se reducen los niveles de inhibina y la hipófisis reacciona aumentando la secreción de FSH.
- **Inhibina B 3° día del ciclo:** Las inhibinas son glicoproteínas heterodiméricas miembros de la superfamilia de los *Transformin-growth factors*  $-\beta$  (TGF- $\beta$ ). Se componen de una subunidad unida por un puente disulfuro a una de las dos subunidades  $\beta$  ( $\beta$ A y  $\beta$ B), formando la inhibina A ( $\beta$ A) y la inhibina B ( $\beta$ B). El patrón de secreción para estas dos hormonas es distinto a lo largo del ciclo menstrual. En el periodo de transición menopáusica se produce una sustancial disminución de los niveles de inhibina B , más precozmente que los cambios en la

inhibina A y el estradiol, sugiriendo que esta reducción de la inhibina B es responsable del incremento monotrópico de FSH observado durante el envejecimiento ovárico. Se consideran niveles de inhibina B >45 pg/ml junto a una FSH basal < 10 mUI/ml como un buen pronóstico para las TRA.

- **Edad** de la mujer: Para muchos autores una edad inferior a 30 años es peligrosa, pues supone que los ovarios están a pleno rendimiento y con mayor cantidad de receptores para todas las sustancias que están implicadas en la ovulación y en el SHEO.
- **IMC**: Algunos autores han señalado una incidencia mayor en pacientes con IMC bajo. En la bibliografía revisada el IMC era de 25,7, esto es por debajo de la media de las pacientes sometidas a TRA.

Además de estos, en el momento actual se está dando mucha importancia a los valores de **Homona Antimulleriana (HAM)**.

La HAM se expresa en las células de la granulosa de los folículos preantrales y de los antrales pequeños y es un indicador de la reserva folicular que podría llegar a utilizarse como un predictor de respuesta. Mientras que la FSH, LH, inhibinas y esteroides reflejan sobretodo la actividad de los folículos grandes en crecimiento e informan sobre la actividad periovulatoria, la HAM al producirse a partir de células granulosas de folículos pequeños se correlaciona con el número de estos folículos. Se ha visto que disminuye con la edad y que es estable a lo largo de todo el ciclo de la mujer.

La prevención primaria del síndrome pasa por varias estrategias (2):

- Bajar las dosis de gonadotropinas.

- Utilización de protocolos con antagonistas de la GnRH: Si usamos los antagonistas podemos sustituir la hCG por un bolo de agonistas, lo cual no podemos hacer con agonistas desde el principio.
- Eliminación de la hCG exógena: Aquí se incluye el uso de los aGnRH para provocar la ovulación.
- Maduración *in vitro*/ criopreservación de ovocitos en pacientes con SOP.

Las estrategias de prevención secundaria incluyen (2):

- “*coasting*”: Disminuir la cantidad de gonadotropinas y retrasar la administración de hCG hasta que baje el E2. Es una alternativa a la cancelación del ciclo. En situaciones con E2 superior a 3000 pg/ml y más de 20 folículos. Se suspenden las gonadotropinas y se continúa con el análogo hasta que las cifras de E2 estén entre 2500-3000 pg/ml. En general hay bastantes dudas en cuanto a su utilidad.
- Reducir la dosis de hCG: La dosis recomendada de hCG urinaria es de 10000 UI pero sabemos que dosis menores de 3000-5000 UI pueden tener el mismo efecto. Dado que existe relación directa entre los niveles de hCG circulantes y el SHEO, en pacientes con riesgo se recomienda disminuir la dosis, que puede contribuir a disminuir la gravedad.
- Criopreservar todos los embriones: Evitar la transferencia de embriones contribuye a que no se agrave el cuadro ya iniciado, evitando la aparición de hCG endógena ante un posible embarazo.
- Cancelación del ciclo.
- Alternativas para desencadenar la ovulación sin hCG. Aquí entran en juego los aGnRH.

Se busca conseguir el pico endógeno de hormona luteinizante (LH) que precede a la maduración ovocitaria con una sustancia con menor vida media que la hCG, que tiene alrededor de 7 días: los aGnRH. Estos análogos estimulan la liberación de niveles fisiológicos de LH y FSH.

Normalmente, en las pautas utilizadas en TRA existe una concentración suprafisiológica de E2, que conlleva una regulación negativa del eje hipotálamo-hipófisis y un impacto en los niveles endógenos de LH. Con la hCG este impacto negativo se desequilibra aún más debido a su larga vida media.

En un principio se utilizó la pauta con antagonistas de la GnRH combinado con aGnRH para la maduración final ovocitaria exitosamente en las donantes, pero con el tiempo se fue extendiendo al resto de pacientes.

Es muy importante además de un buen soporte de fase lútea, la conjunción con un buen programa de criopreservación embrionaria (5).

Incluso se llegaron a plantear otras opciones hipotéticas, como la de administrar directamente LH exógena, pero se vio que era impracticable entre otras cosas por el alto coste, aunque tiene menor vida media (aproximadamente 1 hora) que la hCG (4) (6).

En los ciclos naturales, la ovulación se induce más o menos a mitad del ciclo por un pico de LH y en cierta medida, también de FSH, lo que conlleva un incremento también del E2. Hace ya más de 50 años, se introdujo de manera exitosa la hCG exógena para inducir la maduración final de los ovocitos. Comparte con la LH la subunidad alfa y un 81% de los aminoácidos de la beta. Su vida media es mayor que la LH con lo que el soporte del cuerpo

lúteo se prolonga durante 7-10 días. Esta mayor vida media hace que aumenten mucho las concentraciones de E2 y P, aumentando también el riesgo de SHEO.

Todo esto, junto a algunos estudios que apuntan a una influencia negativa de la hCG sobre el endometrio y su receptividad, hacen que se estén buscando alternativas para desencadenar la ovulación.

Los análogos se unen al receptor de la GnRH induciendo una activación inicial (*flare-up*), previa a una regulación a la baja del receptor.

Existen diferencias entre el pico de LH natural y el inducido por aGnRH:

La LH del ciclo natural dura un total de 48 horas divididas en tres fases, mientras que el conseguido tras la administración del análogo tiene una duración aproximada de 24 a 36 horas. Esto conduce a una reducción de la cantidad de gonadotropinas liberadas por la hipófisis (7).

El pico de LH producido por el aGnRH no suele ser suficiente para que se establezca un embarazo evolutivo. Mientras que el pico que produce la hCG dura varios días, el pico producido posteriormente al análogo regresa a la línea de base en 24-48 horas. Esto también se contrapone a la situación fisiológica, donde hay una elevación de 14 horas, una meseta de 14 horas y un descenso durante unas 20 horas (8).

Se observaron también niveles más bajos de E2, P, inhibina A e inhibina pro- $\alpha$ C en la fase lútea subsiguiente a aGnRH en comparación con la producida por hCG.

De ahí que todo esto se relacione con un déficit endometrial y una necesidad de soporte adicional.

Una ventaja del pico producido por aGnRH frente al de hCG es que se produce una elevación simultánea de la FSH, más parecida a la situación natural. Aún cuando su función no está del todo clara, se ha pensado que podría promover la formación del receptor para LH en las células de la granulosa, reanudar la meiosis haciendo posible la maduración nuclear del ovocito y favorecer la maduración de las células del cúmulo (6).

La literatura evidencia una baja tasa de embarazo en pacientes cuyos ovocitos han sido madurados finalmente con aGnRH debido a que por definición induce una fase lútea deficitaria (este es el motivo de que se busquen combinaciones o mejoras a estos protocolos para aprovechar sus ventajas y suplantar sus inconvenientes), además de una alta tasa de aborto, a pesar de la suplementación con progesterona (P) vaginal y estradiol (E2) oral (7). También hay estudios en el otro sentido.

Estas controversias y su utilidad para prevenir el SHEO, justifican el estudio del uso de los análogos.

Los peores resultados de esta pauta se han atribuido a una luteolisis irreversible promovida por el agonista. Esto produce un descenso en los niveles plasmáticos de P, E2 e inhibina (9). Los niveles plasmáticos de estas sustancias son menores que en los ciclos con hCG (6). Estos hallazgos y la evidencia de que el cuerpo lúteo no solo sintetiza progesterona (P), sino muchos más mediadores con actividad biológica, lo que hace vital un correcto soporte de la fase lútea en las pacientes (10). El hecho de que se altere la fase lútea hace que en general se opte por congelar los embriones y transferirlos *a posteriori*.

En la actualidad se ha demostrado la efectividad de la suplementación de la fase lútea con progesterona exógena en las TRA (11).

## **2. OBJETIVOS**

Se parte de la hipótesis de que la incidencia de SHEO se relaciona con el agente inductor utilizado siendo más frecuente con hCG.

Los objetivos son los siguientes:

1. Estimar la incidencia de SHEO en nuestra Unidad en los últimos años.
2. Comparar los resultados de los ciclos en que se usó agonista para desencadenar la ovulación con los de los ciclos en que se usó hCG.
3. Describir la tasa de cancelaciones de los ciclos de FIV/ICSI en riesgo de SHEO y comprobar si la introducción del agonista como desencadenante de la ovulación ha supuesto una disminución de los mismos.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se trata de un estudio descriptivo retrospectivo llevado a cabo en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

Se revisaron un total de 84 historias clínicas del período comprendido entre 2007 y 2011 de pacientes que se sometieron a ciclos de Fecundación in Vitro (FIV)/ Microinyección Intracitoplasmática (ICSI). Finalmente se incluyeron en el estudio 78 casos. Las otras 6 historias se descartaron por no tener recogido alguno de los datos requeridos para el estudio.

Se establecieron 2 grupos para el estudio:

Grupo 1: a 35 de las pacientes se les desencadenó la ovulación con un aGnRH (*procrin*®, *leuprorelina, 1mg/0,2 ml, Abbot*).

Grupo 2: a las otras 43 se les desencadenó la maduración final ovocitaria con hCG (*ovitrelle*®, *coriogonadotropina alfa 250 µg/0,5 ml, Serono*).

En el grupo 1 incluyen todas las pacientes en las que la ovulación se desencadenó con leuprorelina o aGnRH. En el grupo 2, la selección de las pacientes se hizo al azar entre todas las que presentaban niveles de E2 y un recuento folicular por ecografía similar a los del grupo 1.

La obtención de los datos fue mediante observación y registro directo de las historias clínicas, y fue llevada a cabo por el mismo investigador. Los datos se iban pasando a una hoja de cálculo para posteriormente ser analizados.

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS.

### 3.1. VARIABLES RECOGIDAS EN EL ESTUDIO:

---

- Edad en años de la mujer: Medida en años cumplidos. La edad máxima en la muestra es de 40 años. Dado el escaso éxito de las técnicas en mujeres mayores de 40 años, las Unidades Públicas no admiten pacientes mayores.
- FSH el 3º día del ciclo menstrual: Se da en U/L y se considera una FSH>10 como indicativo de una reserva folicular baja.
  - Hombre: 1,5-12,4
  - Mujer en fase folicular: 3,5-12,5
  - Mujer en el pico ovulatorio: 4,7-21,5
  - Mujer en la fase lútea: 1,7-7,7
- E2 el 10º día del estímulo: Es un indicador de riesgo de SHEO. Si el E2>3500 pg/ml se recomienda iniciar alguna medida correctora (12).
- Nº de folículos el 10º día del estímulo: La estimulación ovárica controlada se vigila mediante control ecográfico y mediante el E2. El ecógrafo utilizado es el modelo “*Toshiba Istyle*” y se midieron los folículos en milímetros en diferentes etapas del ciclo: los últimos controles antes de la punción son el día 7º y 10º de estímulo. Se suele considerar que existe riesgo de SHEO cuando el recuento folicular es mayor o

igual a 14 folículos mayores o iguales a 12 mm (10). Esta variable resulta bastante subjetiva por realizarla distintos ginecólogos.

- Nº de ovocitos recuperados en la punción folicular: El día de la punción se extraen los contenidos foliculares y se cuentan los ovocitos obtenidos junto a su granulosa.
- Nº ovocitos maduros (MII): Se consideran ovocitos maduros los que se extraen de la punción folicular en el estadio meiótico de metafase II. Se visualiza claramente un corpúsculo polar tras la decumulación de los mismos. Se descartan los ovocitos en profase I (VG) y metafase I.
- Nº ovocitos fertilizados tras la FIV/ICSI: La fertilización se evalúa entre 17 y 20 horas después de la FIV/ICSI y se manifiesta por la presencia en los cigotos de 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares.
- Nº de embriones de buena calidad : A y B. Los embriones se clasifican según los criterios de la Asociación Española para el estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR) como embriones de categoría A, B, C y D en función de una serie de criterios morfológicos y funcionales como son la fragmentación, simetría, presencia de multinucleación y ritmo de división.
- Nº de embriones transferidos o criopreservados: La transferencia se puede realizar en fresco y se transfieren un número máximo de 3 embriones al útero materno, también guiados ecográficamente. Los embriones de buena calidad (tanto como primera elección o si son sobrantes) también se pueden criopreservar para transferir en un ciclo posterior.
- Supervivencia tras la descongelación de los embriones criopreservados: Se considera que un embrión sobrevive al proceso de descongelación cuando mantiene intactas el 50% o más de sus blastómeras.

- Tasa de embarazo: Se distingue entre embarazo bioquímico (presencia de hCG) y latido fetal positivo a las 8 semanas de gestación visto por ecografía. La tasa de embarazo es el número de pruebas positivas (hCG o latido) entre el total de ciclos.
- Tasa de implantación: Se calcula dividiendo el número de sacos gestacionales visibles en la ecografía de la semana 8 entre el número de embriones transferidos.
- Tasa de aborto: Se utiliza para su cálculo el número de ciclos en los que se evidenció saco gestacional pero no llegaron a presentar latido cardíaco a las 8 semanas. Este dato no se tuvo en cuenta en el estudio por pérdida de información.
- Nº de ciclos cancelados: Ciclos que no llegan a punción folicular o a transferencia. En el último caso un ciclo se puede cancelar en el momento de la transferencia porque ninguno de los embriones generados cumplan criterios de calidad para ser transferidos o porque exista un fallo en la fertilización, esto puede ocurrir en todas las pacientes. Además de esto, hay un grupo de pacientes, como nuestra muestra, con un riesgo elevado de sufrir SHEO. En este grupo de pacientes existe además un riesgo de cancelar la punción folicular.
- Incidencia de SHEO: Registro en la historia clínica de presencia de síntomas claros de SHEO (ascitis, dolor...) e ingreso hospitalario.

### 3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

---

Los criterios que se usaron para incluir a las pacientes en nuestro estudio fueron el nivel de E2 y el recuento folicular por ecografía el día 10 de estímulo.

- **Niveles de E2:** Pacientes que presentaban niveles de E2 > 2600 pg/ml en el día 10 del estímulo. Se excluye un valor extremo no cuantificable (> 200 pg/ml) que no se tiene en cuenta en este sentido, por considerarlo una medida poco fiable o un sesgo de información.
- **Recuento folicular:** Pacientes que en el día 10 de estímulo tienen un número folículos preovulatorios (15-17 mm) mayor o igual a 19. Son medidos en ambos ovarios el día citado cuando las pacientes acuden a control en la consulta.

Las pacientes incluidas en el estudio cumplían al menos uno de los dos criterios anteriores.

### *3.3. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA:*

El éxito de la técnica depende de la optimización de los protocolos de estimulación. Estos van encaminados a conseguir un número de ovocitos que asegure la obtención de embriones y transferencia de los mismos.

Al mismo tiempo se intentan minimizar las complicaciones médicas relacionadas con el procedimiento. Lo que se pretende es evitar la ovulación prematura y aumentar el número de ovocitos en un solo ciclo.

Las fases que siguen los protocolos empleados pasan por:

- **Supresión hipofisaria:** Se realiza con un análogo o un antagonista de la GnRH (*procrin*®, *leuprorelina*, 1mg/0,2 ml o *cetrotide*®, *cetorelix*® 0,25 mg, respectivamente)
- **Reclutamiento folicular:** Se lleva a cabo con las gonadotropinas: FSH recombinante (*Gonal-f*®, *folitropina alfa*) y en algunos casos LH recombinante o incluso mezcla de las dos gonadotropinas (*pergoveris*®, *folitropina alfa* y *lutropina alfa*).
- **Desencamamiento de la ovulación:** hCG, aGnRH o r-hLH.

### Análogos de la GnRH:

Se han empleado para prevenir picos prematuros de LH por su efecto inhibitor de la secreción de gonadotropinas endógenas (2).

Inicialmente aumentan la liberación de FSH y LH (efecto “*flare-up*” o llamarada) y producen una regulación a la baja o desensibilización. Tienen una gran afinidad por el receptor de GnRH. Es su administración continua la que provoca después de 1 o 2 semanas una caída en los niveles de FSH y LH por el mecanismo de “*down-regulation*”.

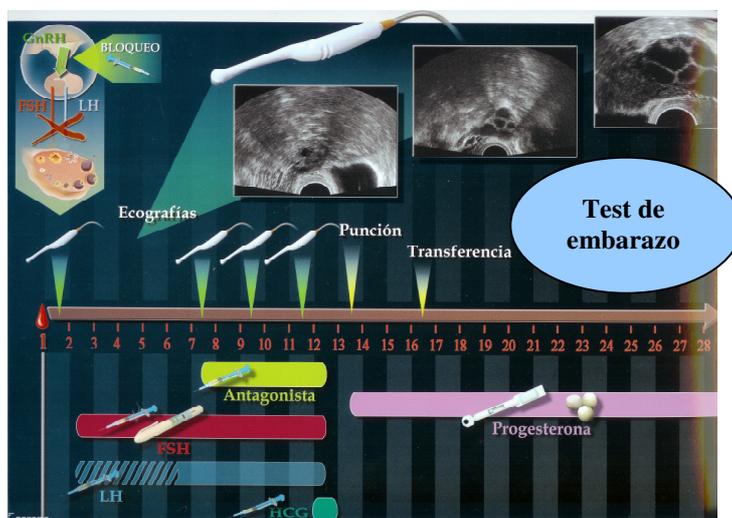


Figura 2. Protocolos largo y corto con análogos de la GnRH.

### **Antagonistas de la GnRH:**

Producen una inhibición competitiva uniéndose al receptor, bloqueándolo, provocando así la supresión hipofisaria en el transcurso de horas.

Resultan más cómodos de administrar, ya que se inician una vez que ya ha empezado la estimulación ovárica. Otra ventaja es que precisan dosis menores de gonadotropinas y su duración es menor.



*Figura 3. Protocolo con antagonistas*

### **Reclutamiento folicular:**

El tratamiento con gonadotropinas generalmente se inicia con una dosis diaria de 2 a 6 ampollas (150 UI-450 UI), por vía subcutánea o intramuscular, según la preparación, comenzando el 2º o 3º día del ciclo menstrual. La FSH o la hMG (FSH+LH) pueden darse solas o combinadas. La dosis diaria de gonadotropinas puede ser fija, aunque según la respuesta de la paciente puede sufrir modificaciones:

- *step up protocol*: dosis aumentada progresivamente
- *step down protocol*: dosis disminuida progresivamente

El *step down protocol* se asemeja a las condiciones naturales, ya que en la fase folicular temprana, los niveles relativamente altos de FSH reclutan folículos del grupo sensible a gonadotropinas.

Es de vital importancia individualizar los tratamientos en función de factores como la edad cronológica, IMC, la reserva ovárica y el estado endocrinológico de la paciente.

Generalmente, la dosis inicial de gonadotropinas es la que determina el resultado final.

El último día de control en la consulta es el día 10º de estímulo. Aquí, el ginecólogo valorará el reclutamiento folicular y la cifra de E2 para pautar la administración del fármaco que ha de desencadenar la ovulación: hCG o análogo de la GnRH. Es en este momento cuando también puede decidir no seguir adelante con el tratamiento y cancelar la punción, bien por baja respuesta o por alta.

Los aGnRH son péptidos sintéticos que han sufrido modificaciones en su estructura para alterar la afinidad del receptor de la GnRH o para retrasar el aclaramiento metabólico, aumentando así su semivida y/o su potencia. La GnRH nativa se desdobla rápidamente en las posiciones Gli6-Leu7 y Pro9-Gli10, lo que conlleva una semivida de menos de 10 minutos. Las sustituciones en los aminoácidos de las posiciones 6 y 10 pueden causar un aumento de la afinidad por la unión al receptor y una disminución de la degradación por las peptidasas hipofisarias (13).



*Figura 4. Ecografía de ovario con múltiples folículos*

La decisión de desencadenar con uno u otro depende sobretodo del riesgo de hiperestimulación ovárica.

El ginecólogo valora ecográficamente el aspecto de los ovarios y la presencia de líquido libre y se considera bastante arriesgado desencadenar la ovulación con hCG en pacientes con E2 altos y un recuento folicular elevado.

Con un E2 superior a 5000 pg/ml y un recuento folicular superior a 20 folículos se suele cancelar la punción. Al menos esta era la actitud habitual antes de la introducción del análogo en la práctica clínica.

También se podría cancelar por una respuesta ovárica excesivamente baja y programar en este caso una inseminación artificial si el semen cumple criterios. Estos criterios suelen ser un recuento de espermatozoides de movilidad progresiva superior a 5 millones/ml y más de un 4% de formas normales.

Otro motivo de cancelación, esta vez ya posterior a la punción folicular, es la ausencia de ovocitos maduros o la generación de embriones de mala calidad. En este caso la transferencia no se llevaría a cabo.

### ***3.4. PUNCIÓN FOLICULAR Y PROTOCOLOS DE LABORATORIO F.I.V:***

---

La extracción de los ovocitos se realizó por vía vaginal con sedación (*propofol 2%*).

La extracción de los cúmulos-ovocitos la realizó un ginecólogo con seguimiento ecográfico y utilizando una aguja y una guía especial (*Ova- staff ovum aspiration leedle, Cook*) , además una enfermera le asiste y otra maneja un sistema de aspiración (*Aspirator 4014, Labotect*).

El objetivo de este proceso es recuperar los ovocitos contenidos en el líquido de la punción folicular y conseguir que sobrelleven adecuadamente el proceso de fecundación y posterior desarrollo embrionario.

Los pasos a seguir para todo ello son:

1. Obtención de los ovocitos.
2. Lavado de los ovocitos.
3. Clasificación morfológica de los ovocitos.

Al obtener líquido folicular este se le da al biólogo, que en placas petri separa los cúmulos los aspira con pipetas embriotestadas (*Stripper tips, Origio*). Estas granulosas se lavaron

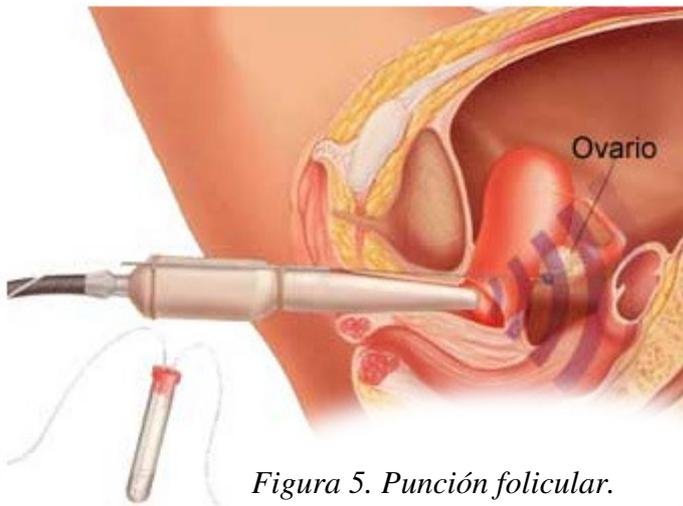


Figura 5. Punción folicular.

inicialmente en un medio de cultivo (*Gamete Buffer, Cook*) y luego se pasaron a otro medio de cultivo (*Fertilization Medium, Cook*). Aquí permanecieron, en placas de 4 pocillos (*Nunc*) y cultivados a 37°C y 6% de CO<sub>2</sub> hasta dos horas más tarde (*Heracell 150i, Heraeus*).

Es indispensable que exista coordinación entre el equipo de quirófano (tanto de ginecología como de anestesia) y el de laboratorio: el biólogo no debería permitir que se acumulen más de cuatro tubos para procesar para evitar someter a los ovocitos a demasiado estrés.

Para facilitar la búsqueda, se debe efectuar un barrido sistemático de las placas, aspirando y soltando líquido continuamente con la pipeta y teniendo cuidado de no hacer burbujas.

Se deben revisar los bordes de la placa detenidamente.

Todo este proceso se realiza en una campana de flujo laminar.

Los ovocitos obtenidos pueden seguir dos caminos: Fecundación in Vitro (FIV) clásica o microinyección intracitoplasmática (ICSI).

Los criterios para la inclusión en una u otra técnica son las siguientes:

*FIV*: Generalmente con muestras seminales de más de 3 millones de espermatozoides con movilidad progresiva y un número de ovocitos superior a doce, sin ciclos previos con fallos

de FIV clásica se puede hacer FIV clásica o una técnica mixta utilizando parte de los ovocitos para ICSI y parte para FIV.

En la FIV a las cuatro horas de la punción se dejan los ovocitos en una concentración de  $20 \times 10^5$  espermatozoides de movilidad progresiva. En la FIV clásica la presencia de células del cúmulo es indispensable para beneficiar la fecundación.

*ICSI*: Número de ovocitos menor o igual a 8 y REM  $< 3 \times 10^6$  progresiva.

En el caso de que los ovocitos vayan a ser tratados mediante ICSI deben decumularse a las 2 horas de la punción; esto es, eliminar química y mecánicamente la granulosa que lo rodea para poder visualizar perfectamente el corpúsculo polar y poder manejar el gameto.

La manera de decumularlos químicamente fue ponerlos en contacto durante menos de un minuto con hialuronidasa comercial a una concentración de 80 UI/ml. En segundo lugar y después de haber estado en contacto con la hialuronidasa, mecánicamente se hace aspirando y soltando los ovocitos con pipetas flexiflet embriotestadas de diferente diámetro repetidamente. Tras este proceso siguieron en el mismo medio de cultivo (*Fertilization Medium, Cook*) y a las dos horas de la decumulación se hizo la ICSI.

La ICSI, puesta a punto por Palermo a finales del siglo pasado, es considerada como la técnica que revolucionó este tipo de tratamientos y se lleva aplicando desde 1991 rutinariamente en todo el mundo. En un principio se focalizó al factor masculino severo, pero hoy en día se trata de una técnica ampliamente utilizada debido a su mayor eficacia para conseguir fertilización.

Entre las indicaciones más relevantes para la ICSI están:

- Factor masculino grave: Se considera cuando, tras un proceso de mejora de la muestra llamado capacitación espermática, el número de espermatozoides móviles con buena progresión no supera los 500000 / ml. o cuando el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales no supera el 14% independientemente de su movilidad (13).
- Azoospermia: Pacientes carentes de espermatozoides en el eyaculado. En estos casos se recurre a TESE (biopsia testicular).
- Criptoospermia: Concentraciones de espermatozoides en el eyaculado menores a 100000 / ml.
- Oligozoospermia: Baja concentración de espermatozoides en el eyaculado.
- Astenoospermia: Disminución patológica de la movilidad de los espermatozoides.
- Teratoospermia: Alto porcentaje de espermatozoides con morfología anómala.
- Causa inmunológica: Aunque la FIV tradicional mejoró el pronóstico de los pacientes que presentan anticuerpos antiespermatozoide en el eyaculado la tasa de fecundación y gestación seguía siendo baja. La aparición de la ICSI constituyó un avance para este grupo de pacientes.
- “Sémenes valiosos”: La radioterapia o quimioterapia afectan a la espermatogénesis del paciente. Estos pacientes, si tienen deseos de ser padres, deberían congelar muestras seminales antes del tratamiento antineoplásico. Estos sémenes en general presentan pocos espermatozoides, se llaman “valiosos” ya que en el futuro probablemente no vamos a disponer de más gametos que los congelados. Aunque cumplieran criterios para FIV o IA no se dispondría de más muestra que para uno o

dos ciclos en este último caso, por lo que es preferible donde las posibilidades se multiplican al ser la tasa de fertilización mayor que en FIV y al necesitar menor cantidad de muestra que la IA.

- Fallo previo de fecundación por FIV.
- Fallo de gestación tras varios ciclos de IA.
- DGP: Es el estudio de normalidad de los cromosomas de los embriones. Consiste en la extracción de 1 ó 2 blastómeras del embrión, cuyo núcleo es fijado. Posteriormente se incorporan al núcleo sondas específicas, marcadas con fluorescencia, para los cromosomas que queremos estudiar y tras la *hibridación in situ* (FISH), se observa la presencia de los marcadores en un microscopio de fluorescencia. La práctica de esta técnica exige la realización de ICSI ya que si hiciéramos FIV puede haber contaminación con espermatozoides que pudieran arrastrarse en la biopsia de blastómera.

A pesar de la revolución que supuso la ICSI y de sus múltiples aplicaciones la FIV sigue siendo una técnica válida. No se debe olvidar que es una técnica menos agresiva para los gametos y que sigue siendo eficaz si se aplica con una minuciosa metodología, en ausencia de factor masculino grave e incluso con escaso número de ovocitos.

No existen diferencias en las tasas de embarazo entre una y otra técnica.



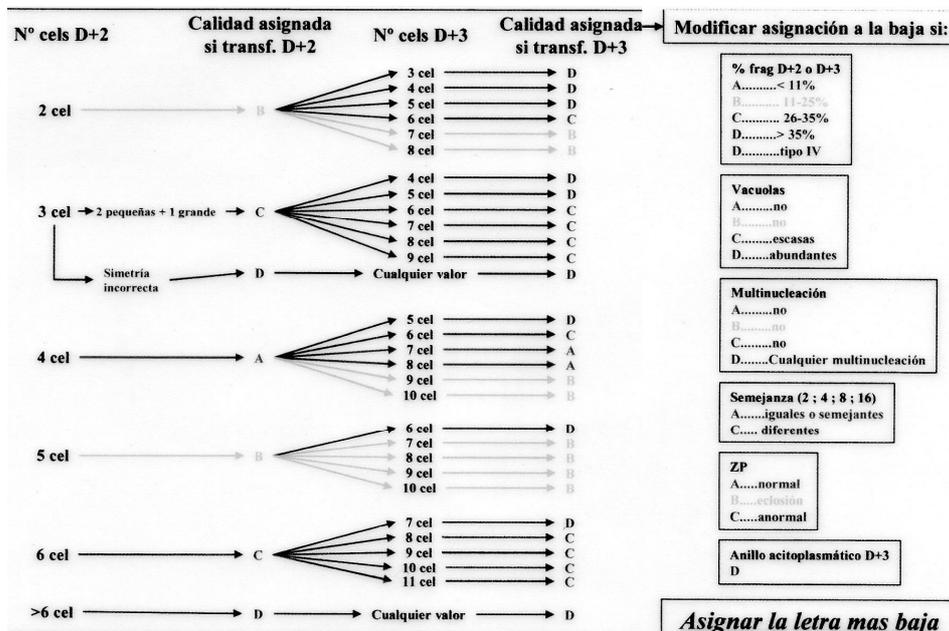
*Figura 6. Microinyección intracitoplasmática.*

En nuestro centro realizamos la ICSI a las cuatro horas de la punción. Depositamos en una placa (*BD Falcon Petri Dish 50x9 mm*) los ovocitos en medio *Gamete Buffer, Cook* y la muestra de semen en una gota de polivinilpirrolidona (*PVP clinical Grade, Origio*) o de ácido hialurónico (*SpermSlow, Origio*) para poder trabajar con los espermatozoides más cómodamente.

Tras hacer la ICSI, 17-20 horas después se evaluó la fertilización, y se dieron como bien fertilizados los cigotos en los que se visualizaron 2 pronúcleos y dos corpúsculos polares. Tanto el día +1, como los dos días posteriores los embriones se mantuvieron en microgotas de cultivo (40 µl) tras ser lavados en microgotas de lavado del mismo medio de cultivo (50 µl).

Los siguientes días: Día +2 y Día +3 se observaron también los embriones resultantes para ver su calidad. El criterio de Calidad Embrionaria utilizado fue el de ASEBIR.

Criterio ASEBIR de clasificación embrionaria en día +2 y día +3:



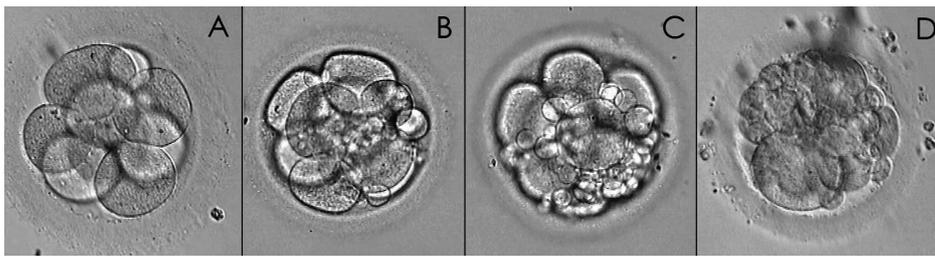


Figura 7. Ejemplo de embriones clasificados según los criterios de ASEBIR.

### 3.5. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA:

La transferencia embrionaria en un ciclo normal se lleva a cabo el día +2 o día +3 dependiendo de varios factores, pero el que más peso tiene a la hora de tomar la decisión es el número de ovocitos fertilizados:

- Menos o 3 ovocitos fertilizados → día +2.
- Número mayor de tres ovocitos fertilizados → día +3

Si no existe un *pool* suficiente de embriones de buena calidad es preferible transferir los embriones lo antes posible al útero materno. La razón es que las condiciones *in vitro* nunca son como las naturales.

Si hay muchos embriones de buena calidad su velocidad de crecimiento de día +2 a día +3 o incluso hasta el estadio de blastocisto en día +5 es un parámetro más de calidad embrionaria que nos permite una mejor clasificación embrionaria .

La transferencia embrionaria (TE) supone el último y decisivo paso en el camino hacia la consecución de la gestación a través de la FIV o ICSI. Es crucial realizar una buena TE después de todo el esfuerzo puesto en la estimulación ovárica, técnicas de cultivo, etc...

La TE representa la acción mecánica mediante la cual el o los embriones se depositan en el interior de la cavidad uterina.

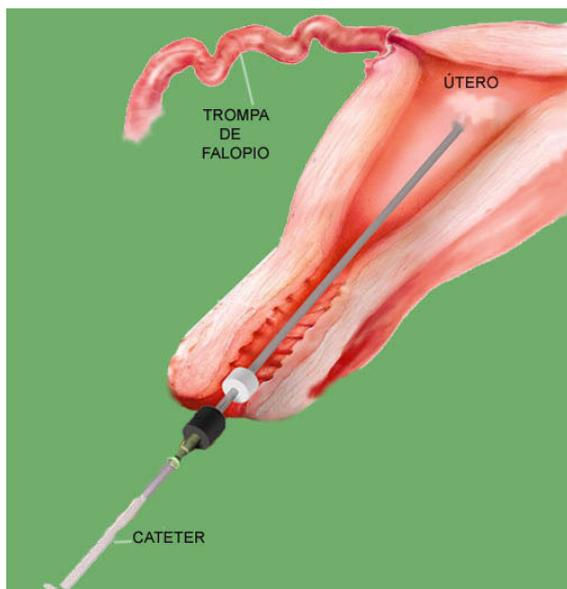
En la fisiología de la reproducción la fecundación se produce en las trompas y el embrión llega a la cavidad endometrial en estadio de mórula, donde completa su desarrollo preimplantacional, pasa a blastocisto y eclosiona de su membrana pelúcida para implantarse. La vía de acceso transcervical hace que el embrión llegue de forma precoz a su sitio.

Como cualquier procedimiento invasor, requiere unas adecuadas condiciones de asepsia.

En cuanto a los agentes nocivos para el embrión, deberemos tratar de reducir al máximo tanto el tiempo que los embriones permanecen fuera del incubador como su exposición a la luz antes de depositarlos en el útero.

Existe una amplia variedad de cánulas de transferencia, con distintos grados de rigidez. Las cánulas poco rígidas permiten realizar la TE sin mucha manipulación cervical, lo que ocurre, es que en ocasiones la propia anatomía dificulta la técnica. Por todo esto se debe buscar la cánula que nos permita ejercer el menor traumatismo posible pero sin perder eficacia.

Se les indicó a las pacientes que bebieran bastante agua antes de pasar a realizar la TE ya que esto facilita la técnica por la corrección de la anteflexión uterina por efecto mecánico de la distensión vesical.



*Figura 8. Transferencia embrionaria*

Por otro lado, la aspiración de moco cervical pretende eliminar la posibilidad de que los embriones queden retenidos en el espesor del mismo.

La carga de los embriones en el catéter la realizó el biólogo, que le pasaba el catéter al ginecólogo. Esta carga se llevó a cabo en el catéter dejando los embriones en medio de cultivo y rodeado de columnas de aire que los

protegen.

La ley establece un máximo de tres embriones para transferir. En general y si se dispone de ellos en nuestra Unidad se transfieren 2 embriones, siempre de acuerdo con la pareja.

### **3.6. PROTOCOLO DE SOPORTE DE LA FASE LÚTEA PARA TRANSFERENCIA EN FRESCO:**

El día de la punción folicular, la paciente se ponía un comprimido de progesterona por vía vaginal, por la mañana y por la noche, hasta el día del test de embarazo.

La noche previa y la mañana de la transferencia se le indicó a la paciente que se tomara la progesterona vía oral.

Después de la transferencia debía continuar con la progesterona vía vaginal hasta que realizaba el test de embarazo o hasta que le bajaba la regla.

Si además de los embriones que se transfieren hay embriones de buena calidad estos se congelaron para ser transferidos *a posteriori*.

### 3.7. SISTEMAS DE GONGELACIÓN DE EMBRIONES:

Las técnicas de congelación utilizadas fueron la congelación lenta o la vitrificación .

Uno de los parámetros directamente relacionado con el éxito de la técnica de congelación es la selección de los embriones para congelar. La supervivencia de los embriones fragmentados disminuye drásticamente si se compara con la de los embriones que no lo están (14).

El **método lento** utiliza un congelador programable (*Planer Kryo 360-1.7*), utilizando 1,2-propanodiol (PROH) como crioprotector permeable y sacarosa como crioprotector no permeable. Consta de las fases de equilibrio con el crioprotector, congelación, almacenamiento y descongelación.

Se basa en conservar las estructuras celulares tras la incorporación del crioprotector permeable, previa deshidratación celular, durante tiempo indefinido sin que altere su estructura y fisiología tras la descongelación.

Tras pasar los embriones por las distintas concentraciones de criopreservador el congelador programable se encarga de ir bajando la temperatura poco a poco. Cuando se encuentra a -7°C induciremos con unas pinzas enfriadas la formación de hielo extracelular para evitar que el hielo entre en las células. Este paso recibe el nombre de “*seeding*”.

La **vitrificación** se basa en el uso de crioprotectores de elevadas concentraciones para llevar los embriones a un medio en estado vítreo, evitando así la formación de cristales.

En cuanto a las pacientes con riesgo de Síndrome de Hiperestimulación a las que se les ha desencadenado la ovulación con el análogo, los embriones no se transfieren en fresco.

Aquí los embriones que cumplan criterios en cuanto a morfología se congelan para transferirlos *a posteriori*.

### ***3.8. PROTOCOLO DE SOPORTE DE LA FASE LÚTEA PARA CRIOTRANSFER:***

---

Las pacientes iniciaron un protocolo de preparación de la fase lútea cuando se iban a transferir los embriones:

- Inyección intramuscular de **Gynecrin® 3,75 mg** (leuprorelina acetato) el día 21 del ciclo precedente (unos 7 días antes del día que se espere la menstruación). El 1º día de la regla, que coincide con el primer día del nuevo ciclo, comenzaba con la administración de: **progynova® 1 mg** (valerato de estradiol) (2 comprimidos vía oral cada 8 horas) y **estradox® 75 mg** (estradiol hemihidrato) (2 parches cada 3 días).
- El día 12-14 del ciclo acudía a la consulta para hacer un control ecográfico. Si el endometrio estaba preparado (más de 8 mm de grosor), se incorporaba el tratamiento al tratamiento precedente de progynova® y estradox® **utrogestan 200 mg** (progesterona) (2 comprimidos cada 12 horas por vía vaginal, hasta el día 28 del ciclo).

- La transferencia se realizaba el 2º-3º día después de comenzar con el *utrogestan*.
- Se mantenía la medicación hasta el día de la prueba de embarazo, que se realizaba 15 días después de la transferencia.

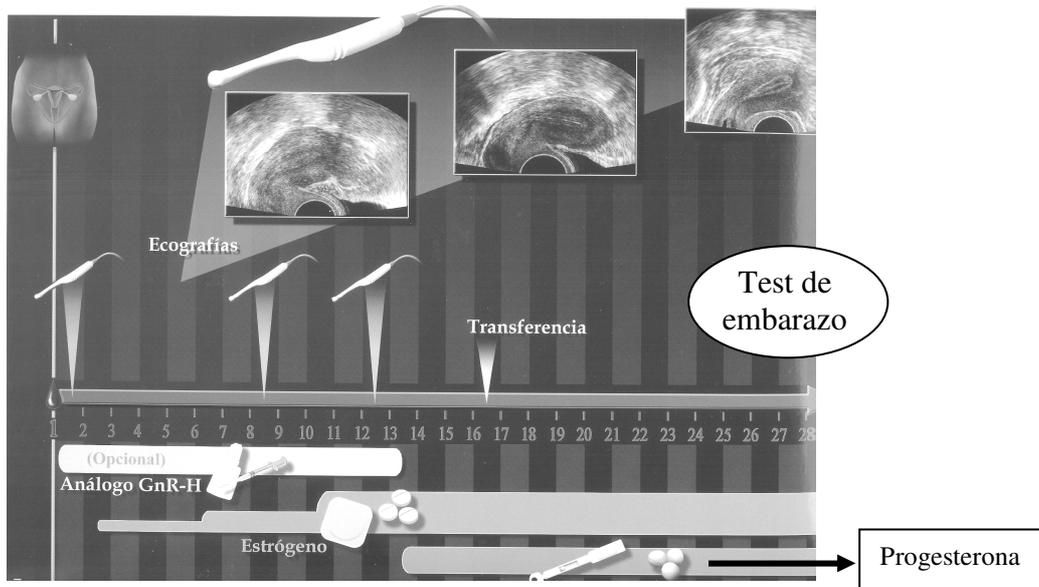


Figura 9. Protocolo de estimulación para criotransfer.

#### **4. RESULTADOS**

En los resultados que se mostrarán a continuación el grupo de pacientes sometidas a tratamiento con aGnRH viene representado por “1” mientras que las pacientes a las que se les administró hCG son las representados por “2”.

Se considerarán resultados estadísticamente significativos los que tengan un p-valor inferior a 0,05.

##### ***4.1. ANÁLISIS DE LA MUESTRA EN CUANTO A EDAD Y FSH AL 3º DÍA:***

---

Los dos grupos analizados son homogéneos en lo que se refiere a edad y FSH en día +3. Ambos grupos presentan una respuesta ovárica excesiva con E2 superiores a 3000 pg/ml como media en ambos grupos.

El recuento folicular sí es mayor en el grupo de las pacientes tratadas con análogo (22,8 vs 18,1 ; p-valor: 0,005), quizás por las propias características de la muestra.

Tabla1. Descripción de la muestra:

	<i>Grupo</i>	N	<b>Media ± SD</b>
FSH día 3	1: aGnRH	35	<b>5,916 ± 1,6282</b>
	2: hCG	42	<b>6,224 ± 1,8477</b>
	Total	77	<b>6,084 ± 1,7469</b>
Edad	1: aGnRH	35	<b>33,74 ± 3,081</b>
	2: hCG	43	<b>34,35 ± 3,664</b>
	Total	78	<b>34,08 ± 3,407</b>
E2 día 10	1: aGnRH	35	<b>3974,49 ± 1739,605</b>
	2: hCG	43	<b>4028,09 ± 942,572</b>
	Total	78	<b>4004,04 ± 1349,659</b>
Folículos día 10	1: aGnRH	35	<b>22,83 ± 8,365</b>
	2: hCG	43	<b>18,09 ± 5,245</b>
	Total	78	<b>20,22 ± 7,178</b>

Solo se encontraron diferencias significativas en el número e folículos el día 10 ( $p < 0,005$ ) siendo el resto de variables iguales en ambos grupos.

#### **4.2. COMPARACIÓN DE PARÁMETROS EVALUADOS PREVIOS A LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES:**

---

Se analizaron los resultados obtenidos en los dos grupos de pacientes. Los parámetros evaluados antes de realizar la transferencia embrionaria fueron el número total de ovocitos, número de ovocitos maduros (MII), nº de ovocitos fertilizados y nº de embriones de buena calidad (categorías A y B).

Todos los parámetros son similares en los dos grupos, excepto el nº de ovocitos fertilizados (7,6 vs 6,2; p-valor: 0,038). En el grupo al que se le administró el análogo la tasa de fertilización es significativamente mayor (p-valor 0,038).

*Tabla 2. Variables analizadas en ambos grupos previas a la transferencia:*

	Grupo	N	Media $\pm$ SD
Nº Ovocitos	1: aGnRH	35	<b>14,69 <math>\pm</math> 6,694</b>
	2: hCG	42	<b>12,83 <math>\pm</math> 4,558</b>
	Total	77	<b>13,68 <math>\pm</math> 5,667</b>
MII	1: aGnRH	35	<b>11,91 <math>\pm</math> 5,757</b>
	2: hCG	41	<b>10,54 <math>\pm</math> 3,994</b>
	Total	76	<b>11,17 <math>\pm</math> 4,900</b>
Nº Ovocitos Fertilizados	1: aGnRH	35	<b>7,63 <math>\pm</math> 3,255</b>
	2: hCG	41	<b>6,20 <math>\pm</math> 2,522</b>
	Total	76	<b>6,86 <math>\pm</math> 2,952</b>
Embriones A y B	1: aGnRH	35	<b>3,77 <math>\pm</math> 2,237</b>
	2: hCG	41	<b>3,00 <math>\pm</math> 2,025</b>
	Total	76	<b>3,36 <math>\pm</math> 2,146</b>

**4.3. COMPARACIÓN DE LAS TRANSFERENCIAS EN LOS DOS GRUPOS Y TASAS DE EMBARAZO EN FRESCO EN AMBOS GRUPOS:**

---

Debido a las características de los ciclos con análogo y su fase lútea se transfieren muchos menos embriones en fresco que con hCG. Casi un 63% de las pacientes con aGnRH no se transfieren en fresco. Cuando se transfieren en fresco es porque no cumplen los criterios de calidad embrionaria suficiente para la congelación.

Solo a 13 mujeres se les transfirieron embriones en fresco tras desencadenar la ovulación con un análogo. A éstas se les transfirieron siempre 2 embriones.

*Tabla 3. Número de embriones por transferencia:*

			Nº embriones transferidos en fresco				Total
			0	1	2	3	0
Recuento	Grupo	1	22	0	13	0	35
		2	4	2	34	1	41
	Total		26	2	47	1	76
% transferencias	Grupo	1	62,9%	0%	37,1%	0%	100,0%
		2	9,8%	4,9%	82,9%	2,4%	100,0%
	Total		34,2%	2,6%	61,8%	1,3%	100,0%

Aunque no llega a ser significativo, en fresco las mujeres del grupo del análogo tienen un **12,5%** de tasa de embarazo frente al **32,4%** de las mujeres sin análogo (p-valor 0,179), considerando el embarazo como la presencia de latido fetal a las 8 semanas.

Si consideramos el **embarazo bioquímico** (test de embarazo positivo a las 2 semanas) la diferencia es aún mayor (**15,4%** vs. **43,2%**) y el p-valor baja a 0,098.

*Tabla 4. Tasa de embarazo bioquímico tras transferencia en fresco:*

		Grupo		Total
		1: aGnRH	2: hCG	
				0
Recuento	Embarazo No	11	21	32
	Embarazo Sí	2	16	18
	Total	13	37	50
	% embarazo bioquímico	15,4%	43,2%	36,0%

Las tasas de implantación en las pacientes con análogo nunca llegan a ser de las más altas, pero el número de embarazos en este grupo es tan bajo que no es posible estudiar este dato a nivel estadístico.

#### ***4.4. CICLOS CON CONGELACIÓN DE EMBRIONES EN AMBOS GRUPOS:***

---

Debido a las características del tratamiento con el análogo y a su efecto directo sobre el endometrio se congelan más embriones por paciente.

Esta diferencia con el número de embriones que se congelan tras la inyección de hCG es significativa, como era de esperar.

Aunque en los dos casos era esperable que se congelaran embriones debido a que en los ciclos con hiperestimulación se obtienen un gran número de ovocitos y en general se generan muchos embriones.

En los casos de análogos desde un principio van dirigidos a la congelación de embriones.

En los de hCG solo se congela si hay embriones sobrantes de buena calidad.

*Tabla 5. Embriones congelados:*

	Grupo	N	Media $\pm$ SD
Congelados	1: aGnRH	35	<b>3,29 <math>\pm</math> 2,630</b>
	2: hCG	40	<b>1,50 <math>\pm</math> 2,532</b>
	Total	75	<b>2,33 <math>\pm</math> 2,713</b>
Descongelados	1: aGnRH	27	<b>3,44 <math>\pm</math> 2,225</b>
	2: hCG	16	<b>2,31 <math>\pm</math> 2,213</b>
	Total	43	<b>3,02 <math>\pm</math> 2,262</b>
NºTransferidos Cong.	1: aGnRH	27	<b>1,48 <math>\pm</math> 0,935</b>
	2: hCG	11	<b>1,82 <math>\pm</math> 1,168</b>
	Total	38	<b>1,58 <math>\pm</math> 1,004</b>
Supervivencia	1: aGnRH	26	<b>2,08 <math>\pm</math> 1,354</b>
	2: hCG	10	<b>2,30 <math>\pm</math> 1,337</b>
	Total	36	<b>2,14 <math>\pm</math> 1,334</b>

Existen diferencias significativas en el número de embriones congelados, siendo mayor este número en el grupo del análogo (3,29 vs. 1,50), con una significación estadística de 0,004. En cambio, no existen diferencias significativas en el número de embriones descongelados, en el número de embriones que se transfieren tras la descongelación ni en la supervivencia de los mismos.

#### 4.5. TASAS DE EMBARAZO EN CICLOS CON CONGELADOS EN AMBOS GRUPOS:

En los ciclos con **embriones congelados**, el número de embarazos es mucho menor, en total solo un 5,9% (2 embarazos de 34).

Los análogos consiguen menos embarazos que la hCG (4,2% vs 10%) aunque las diferencias no son significativas (p-valor 1,000).

*Tabla 6. Tasa de embarazo (latido a las 8 semanas) tras congelación:*

			Grupo		
			1: GnRH	2: hCG	Total
Recuento	Embarazo Cong:	0	23	9	32
	latido a las 8	1	1	1	2
	semanas				
	Total		24	10	34
	% embarazo		<b>4,2%</b>	<b>10%</b>	<b>5,9%</b>
	Total		100,0%	100,0%	100,0%

Los embarazos bioquímicos en este mismo grupo, es decir en el que se congelan embriones y posteriormente se descongelan para transferir, alcanzan el 21,4% globalmente y son los mismos con o sin análogo (21,1% y 22,2%, p-valor: 1,000).

#### 4.6. TASAS DE EMBARAZO GLOBALES:

En global, es decir, considerando el embarazo de la mujer independientemente de que se haya conseguido tras una criotransfer o tras una transferencia en fresco es significativamente mayor en el grupo que no se ha sometido a la utilización del análogo (**p-valor 0,025**). Aunque las diferencias en el embarazo bioquímico no llegan a ser significativas.

*Tabla 7. Tasa de embarazo (latido a las 8 semanas) global:*

			Grupo		Total
			1: aGnRH	2: hCG	
Recuento	Embarazo	No	26	26	52
		Sí	3	15	18
	Total		29	41	70
	% embarazo		<b>10,3%</b>	<b>36,6%</b>	<b>25,7%</b>
	Total		100,0%	100,0%	100,0%

*Tabla 8. Tasa de embarazo bioquímico global:*

			Grupo		Total
			1: aGnRH	2: hCG	0
Recuento	Embarazo bioquímico	0	18	23	41
		1	6	18	24
	Total		24	41	65
	% embarazo bioquímico		<b>25%</b>	<b>43,9%</b>	<b>36,9%</b>
	Total		100,0%	100,0%	100,0%

Las pacientes que se iban a someter a una *criotransfer* recibieron soporte de la fase lútea a base de E2 y progesterona, mientras que a las que se les transferían los embriones en fresco solo se les administró progesterona.

#### ***4.7. ANÁLISIS DEL RIESGO DE SHEO EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS:***

---

En cuanto al SHEO se registraron 3 casos en total y los 3 pertenecen al grupo de las que además de presentar una respuesta exagerada llevaban pauta de la hCG, es decir, un 8,3% de este grupo.

En el grupo del análogo no hubo ningún caso. Esto supone que el SHEO ocurre en el 100% de los casos con el concurso de la hCG.

Tabla 9. Prevalencia del SHEO:

			Grupo		Total
			1: aGnRH	2: hCG	0
Recuento	SHEO	0	21	33	54
		1	0	<b>3</b>	3
			21	36	57
	% SHEO		0%	8,3%	
	Total		100,0%	100,0%	

#### ***4.8. ANÁLISIS DE LAS TASAS DE CANCELACIÓN EN AMBOS GRUPOS:***

---

Hasta 2006, la hCG era la única opción para desencadenar la ovulación, y cancelar los ciclos la única manera de evitar el SHEO.

En estos ciclos la tasa de cancelación se sitúa en 3,9%.

A partir de 2007, con la introducción de los antagonistas en las pautas de estímulo, se puede desencadenar la ovulación con un bolo de agonista evitando el SHEO.

En estos ciclos la tasa de cancelación se sitúa en el 3,4%.

## 5. DISCUSIÓN

El SHEO es una de las complicaciones más importantes en las TRA.

Tras una pauta de estimulación, el desencadenamiento de la ovulación con hCG, provoca una serie de efectos mediados por su larga vida media, que están en el origen del SHEO cuando el ovario responde de manera excesiva a las pautas de estimulación.

Hasta hace unos pocos años, la única alternativa para evitar el SHEO era cancelar el ciclo antes de la inyección de hCG. Sin embargo, la introducción de nuevas pautas de tratamiento que usaban antagonistas en vez de agonistas para realizar el frenado hipofisario, han dado lugar a que, en ciclos con riesgo de hiperestimulación, se pueda usar un bolo de agonista para desencadenar la ovulación, evitando así que se produzca un SHEO.

No obstante, se ha observado que esto provoca una deficiencia de fase lútea y efectos negativos sobre el endometrio, que redundan en peores tasas de embarazo (15).

En general, la mayoría de los autores concluyen que en estos ciclos lo mejor es congelar ovocitos y/o embriones para transferirlos en ciclos posteriores donde haya una adecuada preparación endometrial y un adecuado soporte de fase lútea.

En nuestro trabajo, hemos comparado los resultados de los ciclos en riesgo de SHEO en los que la ovulación se desencadenó con hCG con los que lo hicieron con un bolo de agonista.

En cuanto a las variables previas a la transferencia (*tabla 1*) no se obtuvieron diferencias.

No existen diferencias significativas en la edad de las pacientes de los dos grupos. Cabe

destacar, que en ambos casos todas las pacientes de los dos grupos que están en riesgo de SHEO son menores de 38 años.

Con respecto al número de ovocitos obtenidos (*tabla 2*) en ambos protocolos no existen diferencias significativas y tampoco en el porcentaje de ovocitos maduros (MII) o embriones de calidad A y B, que desde un punto de vista morfológico son los que tienen mayor tasa de implantación. Este resultado lleva a destacar que el desenadenamiento de la ovulación con un bolo de agonista no interfiere de forma negativa con la maduración ovocitaria. Si así fuera, se observaría una menor tasa de ovocitos MII en las pacientes tratadas con agonista y probablemente llevaría asociada una menor tasa de fertilización. Estos resultados concuerdan con los publicados en programas de donación de ovocitos en los que las donantes son chicas jóvenes y por tanto, en mayor riesgo de SHEO.

En estos casos la ovulación con agonista es el protocolo de elección porque se descarta el efecto negativo sobre el endometrio, al ser otra mujer la receptora de los embriones, y no se han encontrado diferencias en el número de ovocitos o el grado de madurez de los mismos (15).

Algún otro estudio previo sí que había apuntado una ligera diferencia en la madurez, mostrando valores mayores de ovocitos MII en el grupo del análogo. La hipótesis en la que se basaban era un posible efecto de la FSH endógena generada también con el análogo, que actuaría conjuntamente con la LH.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos que no recomiendan el uso habitual de los agonistas de la GnRH como activador de la maduración final de ovocitos en ciclos autólogos con óvulos frescos debido a las bajas tasas de nacidos vivos y

de embarazos en curso (15) y dado que no encontramos diferencias ni en el número de ovocitos obtenidos, ni en el número de MII ni en la calidad embrionaria.

Cuando analizamos los resultados por transferencia en ambos grupos (*tablas 3 y 4*) observamos que la tasa de embarazo con transferencia en fresco es más baja en el grupo del análogo. Esto es debido a que en estos ciclos lo que se pretende es congelar los embriones y transferirlos en un ciclo posterior. Cuando se realiza la transferencia es porque la calidad embrionaria no es lo suficientemente buena para asegurar la supervivencia tras la congelación.

En cuanto a los ciclos con congelación de embriones (*tabla 5*), se esperaría una alta tasa de congelación con ambos tratamientos ya que generalmente se obtiene un número elevado de ovocitos y por tanto de embriones. No obstante, es en los ciclos con análogos donde más se congela ya que desde un principio van dirigidos a este proceso si la calidad embrionaria lo permite. Cabe destacar en estos resultados que en el grupo de hCG, a pesar de generar un elevado número de embriones, no se generan muchos de calidad A y/o B, que son los que tienen criterios de congelación. Esto estaría en consonancia con la tendencia actual de ir hacia pautas de estimulación más suaves (*Mild Stimulation*), en las que se persigue una ovulación más fisiológica, en la que se recluten un menor nº de folículos y ovocitos, pero de mejor calidad. Por otro lado, las pautas de estímulo más suave evitarían en gran medida el SHEO (20). Otro dato a favor de las pautas más fisiológicas sería que en los ciclos con transferencia de embriones congelados (*tabla 6*), las tasas de embarazo son menores.

Cuando se analizan las tasas de embarazo globales (*tabla 7*), se observa que el análogo da tasas significativamente menores que en el grupo que se desencadena con hCG.

Considerando los embarazos globales y entendiendo que la diferencia entre los embarazos bioquímicos y los embarazos comprobados por ecografía a las 8 semanas (latido fetal) extrapolan una pérdida gestacional temprana, esta pérdida es mayor en el grupo del análogo: 14,7% vs. 7,3% (*tablas 7 y 8*). Así como en fresco esta extrapolación de pérdida gestacional es mayor en el grupo de hCG (10,8% vs 2,9%) en congelados es menor en el grupo tratado con hCG ( 12,2% vs 16,9%).

Este mal resultado se explicaría porque en el grupo 1 cuando hay una transferencia en fresco es porque no hay una calidad embrionaria óptima para la congelación (y por tanto tampoco para la transferencia). También porque en los ciclos con congelación (la mayoría para el análogo) las tasas de embarazo siempre son más bajas que con embriones en fresco.

Como ocurre muchas veces en medicina, a veces lo que se busca en un grupo particular de pacientes, las que tienen riesgo de SHEO, es producir la menor iatrogenia posible. En nuestros resultados las únicas pacientes que llegaron a sufrir SHEO pertenecían al grupo de hCG.

Hablar de un 25% (6 pacientes) de embarazo bioquímico o un 10,3% (3 pacientes) de embarazo con latido fetal positivo a las 8 semanas (*tablas 7 y 8*), supone rescatar a un grupo de pacientes que de no ser así, probablemente se hubieran cancelado. Lo que es aún más importante es evitar el riesgo de SHEO.

En un trabajo futuro habría que ver si los ciclos con riesgo de SHEO, tienen diferencias significativas con el resto de ciclos de tratamiento en cuanto a número de embriones generados y calidad de los mismos, así como en la tasa de congelación. En lo que se refiere a las tasas globales de embarazo, destaca que el grupo 2 tiene una tasa mayor que la global para todas las parejas que se someten a tratamiento en la Unidad de Reproducción Asistida. Esta está en torno a un 30% (*comunicación verbal Dra. Sánchez*). Para completar este resultado habría que comprobar si en estos ciclos se genera un mayor número de embriones A y/o B que son los que tienen mayor capacidad de implantación y de dar lugar a embarazos evolutivos. Dos variables a destacar en el grupo con riesgo de SHEO son la edad y el factor de esterilidad. En este caso la edad no supera los 38 años, a partir de los cuales disminuye la probabilidad de éxito en las TRA y quedan descartados los fallos ováricos precoces, que en general son de mal pronóstico. Aunque no se han tenido en cuenta las causas de esterilidad, quedaría excluída esta última patología, pues ninguna paciente con fallo ovárico se pondría en riesgo de SHEO tras una estimulación ovárica.

Además de optimizar los programas de criopreservación embrionaria, se deben buscar mejoras en la preparación endometrial antes de transferir los embriones.

Finalmente hay que señalar que a pesar de los protocolos de estimulación establecidos, siempre se puede dar el caso de alguna paciente que en el momento de desencadenar la ovulación esté en riesgo de SHEO.

Es por todo ello que algunos autores van más allá para depurar esta herramienta terapéutica y trabajan en nuevas propuestas al soporte de fase lútea estándar para mejorar los resultados, como puede ser la adición de LH recombinante a la clásica con P. La base

teórica de este protocolo es que la LH endógena es responsable de la regulación de varios factores implicados en la implantación y es regulada a la baja por el aGnRH y las concentraciones suprafisiológicas de esteroides. Lo que ocurre es que esta regulación a la baja cuando se emplea hCG es contrarrestada por la larga vida media de la gonadotropina coriónica humana (16).

Otros grupos comparan el uso de E2/P convencional añadiendo o no dosis bajas de hCG en la fase lútea. Con esta pauta, las concentraciones de VEGF fueron similares en ambos grupos y más cantidad de líquido libre se vio en la pauta que añadían bajas dosis de hCG (17).

Todas estas nuevas pautas para soporte de fase lútea buscan abrir nuevas puertas para estas pacientes, tanto en donantes de ovocitos como en el resto de pacientes, se trata de buscar un equilibrio entre evitar el SHEO y procurar mayor confort a las pacientes (sobretudo en el caso de las donantes evitar la acumulación de mucho líquido en los ovarios) con los resultados finales.

Además de la modificación con dosis bajas de hCG, existen dos perspectivas más para el futuro:

- *Citrato de clomifeno (CC)*: Es un modulador estrogénico selectivo que se suele usar como inductor de la ovulación en mujeres anovuladoras. Posee un efecto directo negativo sobre el endometrio si es administrado durante la fase folicular al interferir con los receptores de E2 y P. Sin embargo, durante la fase lútea fomenta la

secreción de LH y se cree que se podría explicar por un descenso endógeno de la actividad opioide endógena. Es importante que el aumento de los pulsos de LH que siguen a la administración de CC producen un aumento en las concentraciones de E2 y P alargando la fase lútea. En base a todo esto, se necesitaría estudiar más a fondo si la aplicación de CC tras la administración de aGnRH en ciclos de estimulación con antagonistas de la GnRH aumenta la concentración endógena de LH en cantidad suficiente para alargar la fase lútea sin comprometer la implantación (18).

- *Antagonistas de los opiáceos*: Los opioides endógenos producen una disminución en la secreción de LH. Son varios los estudios que demuestran que la aplicación a corto plazo del antagonista “*naloxona*” conduce a un aumento marcado en la liberación de LH durante la fase lútea. Sin embargo, cantidades mayores no producían ningún efecto. Es por eso que deberían llevarse a cabo más estudios afinando estas hipótesis, además de estudiar la seguridad en el uso de estas sustancias en potenciales embarazos (18).

Es conocido que este tipo de tratamientos induce en las pacientes una situación de estrés importante (19). Esta situación se podría acentuar si las pacientes ni siquiera llegan a tener la oportunidad de someterse a una punción folicular. En todos los casos puede llegar a cancelarse una transferencia por ausencia de embriones de buena calidad, pero en el caso de algunas pacientes con hCG también se cancela la punción para evitar el riesgo de SHEO.

De ahí que nos parece muy importante reducir el número de pacientes a las que se les cancela la punción.

Por otro lado, es cierto, que la tasa de cancelación por hiperrespuesta no ha variado demasiado en los últimos años. Quizás, entre otras cosas, porque los protocolos utilizados en nuestra Unidad no son demasiado agresivos y cada vez se tiende más a una estimulación suave.

## **6. CONCLUSIONES**

- Los parámetros referentes a calidad embrionaria y ovocitaria son similares en los dos grupos. El análogo de GnRH no altera la maduración de los ovocitos ni implica una menor calidad embrionaria. La tasa de fertilización es significativamente mayor en el grupo en el que se desencadena la ovulación con aGnRH.
- La tasa de embarazo tanto de embriones en fresco, congelados, como considerándola de una manera global, es menor en el grupo de los análogos.
- Pese a encontrarse una tasa de cancelación similar en ambos grupos, la utilización del análogo sería ventajosa para la prevención del SHEO. No se ha encontrado asociación entre la utilización de análogos y la aparición de SHEO puesto que los únicos casos de SHEO vistos en nuestro centro provienen de mujeres sometidas a tratamiento con hCG.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertility and Sterility* 2010,94:389-400.
2. Bajo Arenas JM, Coroleu Lletget B. *Fundamentos de Reproducción*. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O). Madrid, 2009.
3. Cerrillo M, Rodríguez S, Mayoral M, Pacheco A, Martínez-Salazar J, García-Velasco JA. Differential regulation of VEGF alter final oocyte maturation with GnRH agonist versus hCG: a rationale for OHSS reduction. *Fertility and Sterility* 2009,91:1526-1528.
4. Gómez R, Soares SR, Busso C, García-Velasco JÁ, Simón C, Pellicer A. Physiology and Pathology of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine* 2010,28:448-457.
5. Bodri D, Guillén JJ, Trullenque M, Schwenn K, Esteve C, Coll O. Early ovarian hyperstimulation syndrome is completely prevented by gonadotropin releasing-hormone agonist triggering in high-risk oocyte donor cycles: a prospective, luteal-phase follow-up study. *Fertility and Sterility* 2010,93:2418-2420.
6. Humaidan P, Kol S, Papanikolaou EG. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice? *Human Reproduction Update* 2011, 17:510-524.
7. Humaidan P, Papanikolaou EG, Tarlatzis BC. GnRH to trigger final oocyte maturation: a time to reconsider. *Human Reproduction* 2009, 24:2389-2394.
8. Griesinger G, Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Diedrich K, Van Steirteghem A, Devroey P, et al. Triggering of final oocyte maturation with gonadotropin-releasing

- hormone agonist or human chorionic gonadotropin. Live birth after frozen-thawed embryo replacement cycles. *Fertility and Sterility* 2007,88:616-621.
9. Acevedo B, Gómez-Palomares JL, Ricciarelli E, Hernández ER. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonists does not compromise embryo implantation rates. *Fertility and Sterility* 2006,86:1682-1687.
  10. Radesic B, Tremellen K. Oocyte maturation employing a GnRH agonist in combination with low-dose hCG luteal rescue minimizes the severity of ovarian hyperstimulation syndrome while maintaining excellent pregnancy rates. *Human Reproduction* 2011,26:3437-3442.
  11. Menocal G, Sánchez RA, Dueñas J, Batista A, Romero S, Velázquez ER. Progesterona en microesferas para el tratamiento en infertilidad. *Acta médica grupo Ángeles* 2008,6:8-13.
  12. Manzanares MA, Gómez-Palomares JL, Ricciarelli E, Hernández ER. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormona agonist in in Vitro fertilization patients with polycystic ovarios does not cause ovarian hyperstimulation síndrome despite very high estradiol levels. *Fertility and Sterility* 2012,93:1215-1219.
  13. Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. *Reproducción Humana*. Segunda Edición McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2002.
  14. Remohí J, Cobo A, Romero J, De los Santos MJ, Pellicer A. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Tercera Edición. McGraw-Hill, Interamericana de España. Madrid, 2008.
  15. Youssef M, Van der Veen F, Al-Inany H, Griesinger G, Mochtar M, van Wely M. Agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas versus hCG para la activación de ovocitos en los ciclos de tecnología de la reproducción asistida con antagonistas

- hormonales (Revisión Cochrane traducida). Cochrane Database of Systematic Reviews 2010 Issue 11. Art n°:CD008046.
16. Papanikolaou EG, Verpoest W, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P, Tournaye H. A novel method of luteal supplementation with recombinant luteinizing hormone when a gonadotropin-releasing hormone agonist is used instead of human chorionic gonadotropin for ovulation triggering: a randomized prospective Prof. of concept study. *Fertility and Sterility* 2010, (in press) Doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.023.
  17. García-Velasco JA, Motta L, López A, Mayoral M, Carrillo M, Pacheco A. Low-dose human chorionic gonadotropin versus estradiol/progesterone luteal phase support in gonadotropin-releasing hormone agonist-triggered assisted reproductive technique cycles: understanding a new approach. *Fertility and Sterility* 2012,94:2820-2823.
  18. Humaidan P, Papanikolaou EG, Kyrou D, Alsbjerg B, Polyzos NP, Devroey P, et al. The luteal phase after GnRH-agonist triggering of ovulation: present and future perspectives. *Reproductive Biomedicine Online* 2012, 24:134-141.
  19. Bloch M, Azem F, Aharonov I, Ben Avi I, Yagil Y, Schreiber S, et al. GnRH-agonist induced depressive and anxiety symptoms during in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility* 2011,95:307-309.
  20. Toledano M, Lamazou F, Gallot V, Frydman R, Fanchin R, Grynberg M. Are mild ovarian stimulation for IVF-ET a significant progress in assisted reproductive technologies? *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 2012,41:6-13.