

# Fertility & Sterility

**Artículos Seleccionados Traducidos**



# FERTILITY AND STERILITY

## Editor-in-Chief:

Alan H. DeCherney, M.D.

Chief, Reproductive Biology and Medicine Branch,  
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

A Publication of the American  
Society for Reproductive Medicine

[www.fertstert.org](http://www.fertstert.org)

ISSN: 0015-0262

For more information about  
submission to *Fertility & Sterility*,  
please contact:

Eric Steinmull, Managing Editor  
*Fertility and Sterility* Editorial Office  
American Society for Reproductive  
Medicine

1209 Montgomery Highway  
Birmingham, AL 35216-2809

Tel: 205-978-5000

Email: [esteinmull@asrm.org](mailto:esteinmull@asrm.org)

Submit manuscripts online at  
<http://ees.elsevier.com/fst>

For information about  
advertising in *Fertility & Sterility*,  
please contact:

Carol Clark

Elsevier

360 Park Avenue South  
New York, New York 10010

Tel: 212-633-3719

Fax: 212-633-3620

Email: [cc.clark@elsevier.com](mailto:cc.clark@elsevier.com)



ELSEVIER 1102260-0/04

*Fertility and Sterility* is a monthly international journal for obstetricians, gynecologists, reproductive endocrinologists, urologists, basic scientists and others who treat and investigate problems related to infertility and other human reproductive conditions.

The Journal publishes peer-reviewed original scientific articles in clinical and laboratory research relevant to reproductive endocrinology, urology, andrology, physiology, immunology, genetics, contraception, and menopause.

*Fertility and Sterility* encourages and supports meaningful basic and clinical research, and facilitates and promotes excellence in professional education, in the field of reproductive medicine.

Access to [www.fertstert.org](http://www.fertstert.org) is included with your paid subscription!

**For more information or to order, contact**

**Phone:**

1-800-654-2452 (U.S. and Canada)

1-314-453-7041 (other countries)

**Visit:**

[www.us.elsevierhealth.com](http://www.us.elsevierhealth.com)

## Live birth after vitrification of in Vitro matured human oocytes

### *Nacimiento tras la vitrificación de ovocitos madurados in Vitro*

Ri-Cheng Chian, Ph.D.,<sup>a</sup> Lucy Gilbert, M.D.,<sup>b</sup> Jack Y. J. Huang, M.D.,<sup>a</sup> Ezgi Demirtas, M.D.,<sup>a</sup> Hananel Holzer, M.D.,<sup>a</sup> Alice Benjamin, M.D.,<sup>c</sup> William M. Buckett, M.D.,<sup>a</sup> Togas Tulandi, M.D., M.H.C.M.,<sup>a</sup> and Seang Lin Tan, M.D., M.B.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> McGill Reproductive Centre, McGill University Health Centre, <sup>b</sup> Division of Gynecological Oncology, and <sup>c</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

#### **Summary**

**Objective:** *To report the first healthy live birth from immature oocytes retrieved in a natural menstrual cycle, followed by in vitro maturation (IVM) and cryopreservation of the oocytes by vitrification.*

**Design:** *Case report.*

**Setting:** *University-based tertiary medical center.*

**Patient(s):** *A 27-year-old woman with tubal disease and polycystic ovaries.*

**Intervention(s):** *Immature oocytes were retrieved by transvaginal ultrasound guided follicle aspiration on day 13 of her natural menstrual cycle, matured in vitro and vitrified. The oocytes were thawed in a subsequent menstrual cycle, inseminated by intracytoplasmic sperm injection, and the resulting embryos transferred.*

**Main Outcome Measure(s):** *Oocyte maturation and survival rates, pregnancy, and live birth.*

**Result(s):** *One metaphase II and 18 germinal vesicle stage oocytes were collected; 16 out of 18 germinal vesicle oocytes matured, and a total of 17 oocytes were vitrified. After thawing, four IVM oocytes survived; three embryos were transferred. The woman went on to deliver a single healthy live baby at term.*

**Conclusion(s):** *We provide proof-of-principle evidence that the novel fertility preservation strategy of immature oocyte retrieval, IVM, and vitrification of oocytes can lead to successful pregnancy and healthy live birth. (Fertil Steril 2009; 91:372–6. 2009 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Key Words:** Oocyte. In vitro maturation. Vitrification. Cryopreservation. Live birth. Fertility preservation

## **Resumen**

**Objetivo:** Reportar el primer nacimiento saludable de ovocitos inmaduros obtenidos en ciclo natural, seguido de maduración in Vitro (MIV) y criopreservación para vitrificación.

**Diseño:** Caso clínico.

**Lugar:** Centro médico universitario superior.

**Paciente(s):** mujer de 27 años con enfermedad tubaria y ovarios poliquísticos.

**Intervención(es):** Ovocitos inmaduros fueron obtenidos por aspiración folicular bajo guía ecográfica en día 13 de su ciclo menstrual natural, madurados in Vitro y vitrificados. En un segundo ciclo menstrual los ovocitos fueron descongelados, inseminados por inyección intracitoplasmática y los embriones resultantes fueron transferidos.

**Principales resultado(s) obtenido(s):** Maduración de ovocitos y tasas de sobrevida, embarazo y nacimiento.

**Resultado(s):** Fueron obtenidos un ovocito en estadio de metafase II y 18 en estadio de vesículas germinales; maduraron 16 de los 18 ovocitos en estadio de vesículas germinales, y un total de 17 ovocitos fueron vitrificados. Después de descongelar, 4 ovocitos MIV sobrevivieron, 3 embriones fueron transferidos. La mujer tuvo un parto de un recién nacido vivo sano de término.

**Conclusión(es):** Nosotros aportamos pruebas que evidencian una nueva estrategia de preservación de la fertilidad que es la obtención de ovocitos inmaduros, MIV, y vitrificación puede llevar a un embarazo exitoso y a un recién nacido sano (*Fertil Steril*(r) 2009;91:372-6. (r)2009 by American Society for Reproductive Medicine. )

**Palabras clave:** Ovocitos. Ovocitos madurados in vitro. Vitrificación. Nacimiento. Preservación de la fertilidad.

Un cáncer invasivo es diagnosticado en alrededor de 600000 mujeres en Norte América cada año; el 8% están por debajo de los 40 años (1). Con los protocolos modernos de tratamientos de cáncer, el 80% sobrevive. Se estima que, en los próximos años serán más de una de 250 adultas jóvenes las que sobrevivan a un cáncer de la infancia (2, 3); sin embargo la infertilidad puede ser una consecuencia. Un rango amplio de opciones de preservación de la fertilidad pueden ser ofrecidos a estas pacientes antes de que comiencen el tratamiento gonadotóxico, incluido la criopreservación de ovocitos, embriones y tejido ovárico y la ooforopexia (4, 6).

La única estrategia establecida de preservación de la fertilidad para las pacientes mujeres sería la estimulación ovárica, seguido de la aspiración y fertilización in Vitro (FIV) de ovocitos maduros y la criopreservación de los embriones resultantes (7, 8).

Sin embargo, este procedimiento retrasa mínimo de 2 a 5 semanas el tratamiento del cáncer y produce relativamente niveles elevados de estradiol, lo cual puede ser considerado inseguro en ciertos tipos de cáncer según algunos oncólogos. Además, esta estrategia

no sería fehaciente para pacientes jóvenes sin pareja masculina, o aquellas con objeciones personales, morales o religiosas de la criopreservación de embriones, y aquellas con tiempo inadecuado o contraindicación para someterse a estimulación hormonal.

La criopreservación de tejido ovárico es una posible opción para pacientes sin pareja masculina y aquellos sin tiempo y con contraindicación para estimulación ovárica. Sin embargo, a pesar de los mayores avances que se han hecho, este procedimiento todavía es considerado experimental y es, en el presente, relativamente ineficiente (9).

Una estrategia atractiva para preservación de la fertilidad para mujeres sin pareja masculina es la criopreservación de ovocitos. La criopreservación de ovocitos que utiliza el método convencional de congelación lenta es considerada un procedimiento experimental por la inconsistencia de la sobrevida y las tasas de embarazo y el limitado número de nacimientos conseguidos (8,9).

Avances recientes en técnicas de vitrificación han mejorado marcadamente las tasas de sobrevida de

ovocitos después de descongelar y las tasas de embarazo conseguidas (10-14).

A veces todos los reportes de embarazos y nacimientos provenientes de ovocitos criopreservados han dependido del uso de gonadotropinas para estimular y generan el desarrollo de múltiples folículos en los ovarios. Esta técnica está asociada con el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), medicación costosa, y necesita un monitoreo cercano y, para pacientes con cáncer, un retraso en su tratamiento, y otros riesgos potenciales en algunos casos por la elevación de los niveles de estrógenos.

Por lo tanto, hay una presión necesaria para desarrollar una opción para preservación de la fertilidad que sea aplicable en pacientes mujeres jóvenes con cáncer que no necesite estimulación ovárica, participación de la pareja masculina, o retrasos en el tratamiento del cáncer.

En este trabajo, describimos el primer nacimiento exitoso seguido de la obtención de ovocitos inmaduros en un ciclo menstrual natural, madurados in Vitro (MIV), y vitrificación de los ovocitos MIV. Esto constituye una estrategia novedosa para la preservación de la fertilidad que es aplicable para las mujeres jóvenes sin pareja masculina, que requieren un tratamiento urgente para preservación de la fertilidad, o que necesitan evitar la estimulación hormonal.

## CASO CLÍNICO

Una mujer de 27 años de edad con subfertilidad secundaria que consulta al Centro Reproductivo Mc Gill. Su historia médica pasada incluye dos abortos espontáneos de 6 y 8 semanas, respectivamente, un embarazo ectópico tubario que requirió una salpingectomía por laparotomía. La paciente también tenía hipotiroidismo y había tomado levotiroxina. Ella falló para concebir naturalmente por 3 años y se sometió a 8 ciclos de inducción de ovulación con clomifeno y gonadotropinas en otro lugar.

La paciente presentaba un ciclo menstrual normal de 24 a 28 días. El nivel de su hormona Folículo estimulante (FSH) en día 3 de su ciclo menstrual era de 6.4 UI/L, el nivel de la hormona luteneizante (LH) era 9.7 UI/L, y el nivel de estradiol era de 108 pmol/L. Sus estudios de aborto recientemente incluían la batería para trombofilias y todo fue negativo.

La ecografía transvaginal revelaban la presencia de ovarios poliquísticos. El análisis del semen realizado en su pareja mostraba recuento, motilidad, y morfología normal de los espermatozoides.

Después de asesoramiento, la paciente consintió a

la participación en un trabajo clínico para evaluar la eficacia del protocolo de Mc Gill de obtención de ovocitos inmaduros, MIV, vitrificación de los ovocitos MIV, y la subsecuente descongelación para fertilización. El estudio fue aprobado por comité de ética en investigación del Royal Victoria Hospital.

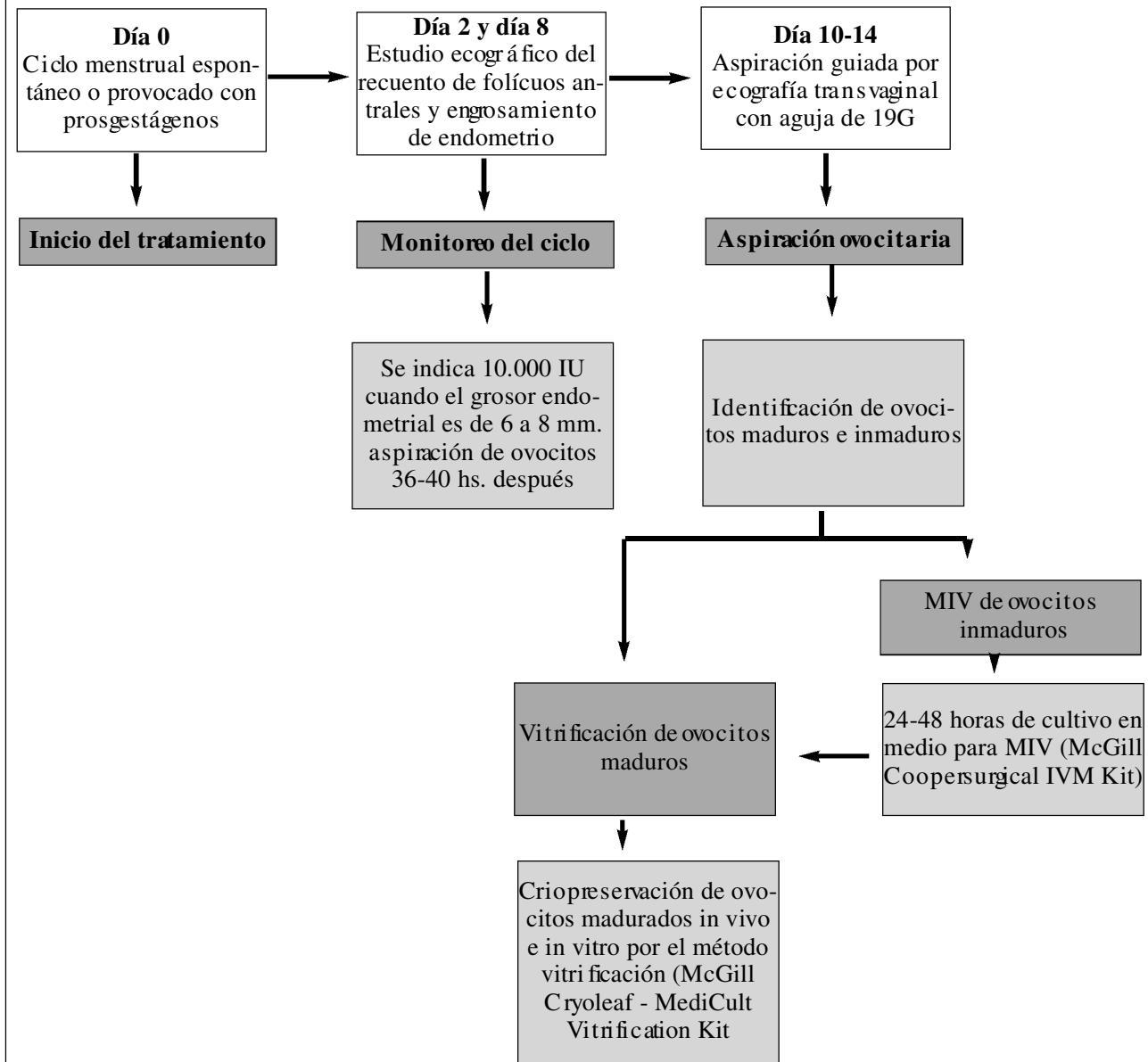
## Maduración in vitro y protocolos de vitrificación de ovocitos

El protocolo Mc Gill de MIV y vitrificación de ovocitos se muestra en la Figura 1.

En día 2 del ciclo menstrual de la paciente, el examen ecográfico revelaba recuento de folículos antrales de 36 y un grosor endometrial de 5,2 mm (15). En día 8 de su ciclo, su recuento de folículos antrales fue de 35, el diámetro del folículo más grande midió 9,5 mm, y su línea endometrial midió 8 mm. La paciente recibió una inyección subcutánea de 10.000UI de hormona coriónica humana (hCG) (Profasi; Serono, Oakville, Ontario, Canadá) en día 11 de su ciclo, y la obtención de los ovocitos fue realizada 36 horas más tarde (16, 17). El diámetro de los folículos más grandes midieron 10,0 mm en el momento de la obtención. Los ovocitos fueron obtenidos con una aguja de aspiración especialmente diseñada de calibre 19 de luz simple (K-OPS-7035-RWH-ET); Cook FIV, Brisbane, Queensland, Australia) bajo guía ecográfica transvaginal con una presión de 85 mmHg. La aspiración de todos los folículos visibles fue realizado bajo sedación intravenosa y anestesia local. La aspiración fue recolectada en tubos de cultivo de 10-mL (Falcon, Franklin Lakes, NJ) que contenían 2 mL de solución salina al 0,9% templada con 2 UI/ml de heparina (Baxter, Toronto, Ontario, Canadá).

Después de la obtención de ovocitos, el complejo cúmulus ovocitario fue evaluado para madurez, y los ovocitos maduros fueron vitrificados inmediatamente. Los ovocitos inmaduros fueron cultivados en 1 mL de medio de maduración (Cooper Surgical/SAGE, Trumbull, CT) suplementado con una concentración final de 75 mUI/mL de FSH y LH a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire con una alta humedad para maduración en cultivo. La madurez ovocitaria fue evaluada 24 horas después del cultivo de MIV, y cualquier ovocito adicional maduro fue vitrificado. Los ovocitos maduros (metafase II, MII) fueron criopreservados usando un método de vitrificación previamente descrito en otros lugares (5, 6). En breve, los ovocitos fueron suspendidos en un medio de equilibrio que contenía 7,5% (v/v) glycol etileno + 7.5% (v/v) 1,2 -propanodiol por 5 minutos a temperatura ambiente, y luego fueron transferidos para vitri fi-

Protocolo de Mc Gill para MIV y vitri ficación de ovocitos



**Figura 1**

*Protocolo de Mc Gill de maduración ovocitaria in vitro y vitri ficación*

cación a un medio que contenía 15% (v/v) de glycol etileno + 15% (v/v) 1,2 propanodiol 1 + 0,5 M sacarosa a temperatura ambiente por 45 a 60 segundos. Luego fueron colocados en un dispositivo de vitri ficación especialmente diseñado, el Mc Gill Cryoleaf (Medicult, Jillinge, Denmark), y fueron sumergidos

inmediatamente en líquido nitrogenado (LN<sub>2</sub>) para almacenamiento.

Se realizó la descongelación después de 2 meses de almacenamiento. Para descongelar, el Mc Gill Cryoleaf fue directamente insertado en un medio de descongelación de 1.0M sacarosa en fluido tubárico

humano (HTF) amortiguado por HEPES por un minuto a 37°C. Los ovocitos templados fueron transferidos a un medio diluido I (0,5 M sacarosa en HTF amortiguado por HEPES) y a un medio diluido II (0,25 M sacarosa), respectivamente, por 3 minutos cada uno; luego fueron lavados en un medio (HTF amortiguado por HEPES que contenía 10% de albúmina sérica humana). La sobrevivencia de los ovocitos fue evaluada basada en la integridad de la membrana del ovocito y de la zona pelúcida después de descongelar y cultivarlos por 2 horas. Los ovocitos viables fueron inseminados por inyección espermática intracitoplasmática, y los cigotos fertilizados posteriormente fueron cultivados por 2 días antes de la transferencia embrionaria.

## RESULTADOS

El día 5 de julio de 2005 un total de 19 ovocitos fueron obtenidos en día 13 del ciclo menstrual natural de la paciente; un ovocito fue maduro, y los 18 restantes fueron inmaduros. Seguidos de cultivo por 48 horas, 16 ovocitos alcanzaron el estadio de MII. Un total de 17 ovocitos fueron criopreservados por vitrificación (Tabla 1). Dos meses más tarde, se le dio a la paciente 2 mg de 17β-estradiol micronizado (Estrace,; Roberts Pharmaceutical, mississauga, Canada) tres veces al día, empezando desde el día 1 del ciclo menstrual para preparar el endometrio. Cuando su grosor endometrial alcanzó los 8 mm en día 11, se tomó la decisión de descongelar los ovocitos vitrificados.

Después de descongelar, cuatro ovocitos MIV sobrevivieron. Después de la inseminación de esperma por inyección intracitoplasmática, tres ovocitos fertilizaron, y tres embriones fueron transferidos en día 2. El soporte lúteo después de la transferencia embrionaria fue administrada en forma de progesterona micronizada intramuscular 50 mg una vez por día. Cinco semanas después de la transferencia embrionaria, una gestación simple fue observada por ecografía transvaginal. El curso del embarazo fue sin complicaciones. La paciente fue a una cesárea electiva por presentación de nalgas a las 39 semanas de gestación, tuvo un parto de una niña sana, de 7,5-lb (3480 gramos) el 5 de Junio de 2006. El score de Apgar fue 9 y 9 al minuto y a los 5 minutos, respectivamente. El pH del cordón umbilical fue 7,3. El examen por un pediatra del recién nacido no encontró evidencia de malformaciones congénitas, y la niña continuó su desarrollo normal.

**Tabla 1**  
Detalles del perfil embrionario

	Número	Observaciones
	%	
Ovocitos aspirados	19	
Ovocitos metafase II	1	
Ovocitos en estadio de vesícula germinal	18	
Ovocitos maduros	16 (89)	
Ovocitos criopreservados	17	
Ovocitos que sobrevivieron	4(24)	Todos los ovocitos fueron madurados in vitro
Originarios de ovocitos en estadio de vesícula germinal	4	
Ovocitos fertilizados	3 (75)	
Embriones transferidos	3	
Resultado clínico	1	1 saco gestacional con latido cardíaco positivo (5 sem después de la transferencia)
Recién nacido vivo	1	Cesárea electiva a las 39+1 semanas de gestación
Peso al nacer		7,5 libras (3480 grs)

## DISCUSIÓN

El caso reportado demuestra que la MIV y la vitrificación de ovocitos, la cual es una técnica de preservación de la fertilidad mínimamente invasiva, puede resultar en un nacimiento sano. La obtención de ovocitos inmaduros sin precedente de estimulación ovárica con gonadotropinas, cultivados por MIV, y fertilización de ovocitos frescos es segura y una opción de tratamiento efectiva para una población grande de mujeres infértiles y ha alcanzado tasas de embarazo clínico de 35% (18-21); en casos selectos, se puede alcanzar una tasa de embarazo por ciclo arriba del 48% (22). Esta tasa es comparable con aquella alcanzada de los tratamientos con FIV Standard reportados en varios registros nacionales (23-25). Nosotros también hemos demostrado recientemente que los bebés nacidos después de MIV no tienen incrementada las anomalías fetales comparado con los FIV regulares o los embarazos espontáneos en mujeres fértiles (26). Las ventajas de la obtención de los ovocitos inmadu-

ros sin estimulación ovárica incluye evitar las gonadotropinas costosas y el SHO. La incidencia del SHO severo es de 0,6% a 1,9% pero puede ser tan alto como 6% en grupos de alto riesgo como mujeres jóvenes con ovarios poliquísticos (27). Aunque numerosas estrategias han sido propuestas para predecir y evitar esta complicación que potencialmente pone en riesgo la vida, evitando la estimulación ovárica por completo es el único método certero para eliminar el SHO.

En el presente, hay opciones limitadas disponibles para preservación de la fertilidad para pacientes jóvenes con cáncer, muchas de las cuales no tienen pareja masculina y presentan una limitación de tiempo y se debe considerar el efecto a largo plazo de la estimulación con gonadotropinas. Un protocolo de tratamiento estándar de estimulación ovárica supone 4 a 6 semanas de demora en desensibilizar a la pituitaria, seguido de la estimulación con gonadotropinas y la obtención de ovocitos (28).

Aún si un protocolo con antagonistas de GnRH es usado, habrá una demora de hasta 2 a 5 semanas, dependiendo en el tiempo de la primera consulta en relación al ciclo menstrual siguiente cuando las gonadotropinas pueden ser comenzadas en la fase folicular temprana (28).

Por otro lado, el protocolo de MIV de ovocitos vitrificados lleva 2 a 10 días (4). Otras razones para desear evitar estimulación con gonadotropinas repetidas incluyen el costo sustancial de las drogas y los efectos a largo plazo de las dosis repetidas de gonadotropinas en el riesgo de desarrollar cáncer ovárico, endometrial y de mama. (29, 30).

En resumen, la obtención de ovocitos inmaduros sin estimulación ovárica seguidos de MIV y vitrificación de ovocitos -lo cual evita el incremento de exposición estrogénica, y retrasa el tratamiento del cáncer, y la necesidad de una pareja masculina o el uso de un donante de semen- representa una propuesta atractiva de preservación de la fertilidad para pacientes jóvenes con cáncer que requieren quimioterapia. Nosotros hemos provisto de pruebas que evidencian que un embarazo exitoso y un nacimiento sano puede ser alcanzado utilizando este nuevo protocolo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **American Cancer Society.** Cancer facts and figures 2006. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2006.
2. **Bleyer W.:** The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin* 1990; 40: 355-67.
3. **Ries L, Percy C, Bunin G.:** Introduction. In: Gurney J, Linet M, Tamra T, Young J, Bunin G, eds. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995* (NIH Pub No 99-4649). Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999: 1-15.
4. **Rao GD, Chian RC, Son WS, Gilbert L, Tan SL.:** Fertility preservation in women undergoing cancer treatment. *Lancet* 2004; 363: 1829-30.
5. **Huang JY, Buckett WM, Gilbert L, Tan SL, Chian RC.:** Retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: a case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 542-4.
6. **Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC.:** Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril*. Published online June 1, 2007.
7. **Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerly K, et al.:** American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2917-31.
8. **Ethics Committee of the American Society of Reproductive Medicine.** Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril* 2005; 83: 1622-8.
9. **Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine.** Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2004; 82: 993-8.
10. **Kuleshova LL, Lopata A.:** Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449-54.
11. **Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E.:** High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80: 223-4.
12. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP.:** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-8.
13. **Chian RC, Son WY, Huang JYJ, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL.:** High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil Steril* 2005; 84: S36.
14. **Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A.:** Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 108-11.
15. **Tan SL, Child TJ, Gulekli B.:** In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: predicting the number of immature oocytes retrieved by



early follicular phase ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 684-9.

16. **Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL.:** Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1999; 341: 1624-6.
17. **Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL.:** Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165-70.
18. **Chian RC, Buckett WM, Tan SL.:** In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 148-66.
19. **Chian RC, Lim JH, Tan SL.:** State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16: 211-9.
20. **Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al.:** In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005; 20: 420-4.
21. **Jurema MW, Nogueira D.:** In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril* 2006; 86: 1277-91.
22. **Son WY, Chung JT, Dean N, Lukic J, Holzer HE, Chian RC, et al.:** Comparison of fertilization and embryonic development in sibling mature oocytes retrieved from different follicle sizes on retrieval in IVF cycles. *Hum Reprod* 2007; 22: i109.
23. **Centers for Disease Control and Prevention. 2003 Assisted Reproductive Technology (ART) Report:** Section 2-ART Cycles Using Fresh, Nondonor Eggs or Embryos. Available at: [http://www.cdc.gov/art/art2003/sect2\\_fig3-13.htm#Figure%203](http://www.cdc.gov/art/art2003/sect2_fig3-13.htm#Figure%203). Accessed on October 20, 2007.
24. **Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG.:** Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2006; 21: 1680-97.
25. **Gunby J, Daya S.:** Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2003 results from the Canadian ART Register. *Fertil Steril* 2007; 88: 550-9.
26. **Buckett WM, Chian RC, Holzer H, Dean N, Usher R, Tan SL.:** Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 885-91.
27. **Brinsden PR, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HS.:** Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 767-72.
28. **Tan SL, Maconochie N, Doyle P, Campbell S, Balen A, Bekir J, et al.:** Cumulative conception and live-birth rates after in vitro fertilization with and without the use of long, short, and ultrashort regimens of the gonadotropin-releasing hormone agonist buserelin. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 513-20.
29. **Venn A, Watson L, Bruinsma F, Giles G, Healy D.:** Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation. *Lancet* 1999; 354: 1586-90.
30. **Venn A, Jones P, Quinn M, Healy D.:** Characteristics of ovarian and uterine cancers in a cohort of in vitro fertilization patients. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 64-8.

## The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count

### *El papel de la hormona antimülleriana en la predicción de los resultados de FIV: comparación con el recuento de folículos antrales*

Simone L. Broer, B.Sc.,<sup>a</sup> Ben Willem J. Mol, M.D., Ph.D.,<sup>b</sup> Dave Hendriks, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup>  
and Frank J. M. Broekmans, M.D., Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Reproductive Medicine, Division of Obstetrics, Neonatology, and Gynecology, University Medical Center, Utrecht; and <sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

#### **Summary**

*Objective:* To assess the value of antimüllerian hormone (AMH) as a test to predict poor ovarian response and pregnancy occurrence after IVF and to compare it with the performance of the antral follicle count (AFC).

*Design:* A systematic review of existing literature and a meta-analysis were carried out. After a comprehensive search, studies were included if 2 X 2 tables for outcomes poor response and pregnancy in IVF patients in relation to AMH or AFC could be constructed.

*Setting:* Academic referral center for tertiary care.

*Patient(s):* Cases indicated for IVF.

*Intervention(s):* None.

*Main Outcome Measure(s):* Poor response and nonpregnancy after IVF.

*Result(s):* A total of 13 studies were found reporting on AMH and 17 on AFC. Because of heterogeneity among studies, calculation of a summary point estimate for sensitivity and specificity was not possible. However, for both tests summary receiver operating characteristic curves for the outcome measures poor response and nonpregnancy

could be estimated and compared. The curves for the prediction of poor response indicated no significant difference between the performances of AMH and AFC. For the prediction of nonpregnancy, poor performance for both AMH and AFC was found.

*Conclusion(s):* In this meta-analysis it was shown that AMH has at least the same level of accuracy and clinical value for the prediction of poor response and nonpregnancy as AFC. (*Fertil Steril*(r) 2009;91:705-14. (r)2009 by American Society for Reproductive Medicine).

**Key words:** Antimüllerian hormone. Antral follicle count. IVF. Poor response. Pregnancy. Meta-analysis.

## **Resumen**

**Objetivos:** *calcular el valor de la hormona antimülleriana (AMH) como predictora de respuesta ovárica pobre y embarazos después de FIV y poder compararla con el rendimiento del recuento de folículos antrales (AFC).*

**Diseño:** *Una revisión sistemática de la literatura existente y un meta-análisis fue llevado a cabo. Después de una búsqueda exhaustiva, se incluyeron estudios si se podía construir una tabla de 2 x 2 para resultados de pobre respuesta y embarazos en pacientes de FIV en relación a AMH o AFC.*

**Lugar:** *centro académico de referencia para asistencia médica superior.*

**Paciente(s):** *casos indicados para FIV.*

**Intervención(es):** *ninguna*

**Principal(es) resultado(s) obtenido(s):** *baja respuesta y no embarazo después de FIV.*

**Resultado(s):** *Un total de 13 estudios fueron encontrados reportando sobre AMH y 17 sobre AFC. Debido a la heterogeneidad de los estudios no fue posible el cálculo de un punto en común para la sensibilidad y especificidad. Sin embargo sí pudo ser estimada y comparada para ambos exámenes la curva ROC (curva de rendimiento predictivo) para las medidas obtenidas de pobre respuesta y no embarazo. Las curvas para la predicción de pobre respuesta indicó una diferencia no significativa entre el rendimiento de AMH y AFC. Para la predicción de no embarazo, se encontró pobre rendimiento tanto en AMH como en AFC.*

**Conclusión(es):** *en este meta-análisis se ha mostrado que la AMH tiene el mismo nivel de precisión y valor clínico para la predicción de baja respuesta y no embarazo que AFC. (Fertil Steril\_2009;91:705-14. \_2009 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Palabras claves:** Antimüllerian hormone, antral follicle count, IVF, poor response, pregnancy, meta-analysis

El incremento del nivel educacional femenino y la participación en la vida laboral ha resultado en un claro aumento en la edad en la que las mujeres se plantean su primer hijo en las sociedades de estilo-ocidente (1). Como la fertilidad natural comienza a declinar a partir de los 30 años, muchas mujeres por lo tanto se enfrentarán a muchos problemas en quedarse embarazadas debido a la reserva ovárica disminuida (2-4). Se ha demostrado que las tasas de la reserva ovárica declinan variablemente en cada mujer haciendo de esto un reto para solicitar exámenes que estimen el resto de vida reproductiva en forma individual a una determinada edad (4).

La reserva ovárica habla tanto de la cantidad como de la calidad del pool folicular ovárico. El número de folículos primordiales que quedan en el ovario a una determinada edad es en consecuencia un indicador importante para reserva ovárica y dicta de eventos reproductivos como la edad de menopausia (4). Aunque la medida del pool de folículos primordiales es imposible, se ha demostrado que el número de folículos antrales en el ovario está proporcionalmente relacionado al tamaño de la reserva de la cual ellos fueron reclutados (5).

Por lo tanto se cree que el recuento folicular

(AFC) es representativo del envejecimiento ovárico (6). Desafortunadamente de momento se carece de marcadores que reflejen directamente calidad ovocitaria. Como consecuencia el descenso de la fertilidad relacionado a la edad no puede ser determinado a través de un examen directo. Solo a través de medidas de cantidad de ovocitos se puede obtener información acerca de la calidad de la reserva ovárica (7,8).

La respuesta ovárica en la hiperestimulación en FIV es otra forma en la cual se puede expresar la reserva ovárica cuantitativa. Aunque una baja respuesta puede ser considerada un signo de reserva ovárica disminuida, esto también puede deberse a otros factores como bajas dosis en obesidad o ciertos polimorfismos de receptores de FSH (9). El estudio de la verdadera naturaleza de una respuesta ovárica pobre puede ayudar al manejo del paciente (7, 10, 11). Además, la correcta identificación de pobres respondedoras, especialmente en pacientes mayores antes de comenzar un ciclo de FIV es importante porque puede ayudar al correcto manejo en lo que se refiere a dosis de gonadotrofinas y rechazo de tratamiento. Para ello los exámenes de elección son el AFC y la FSH basal, como se mostró en una revisión comparativa (12).

La hormona antimülleriana (AMH), un miembro de la familia los factores transformadores de crecimiento  $\beta$ , es producida en las células de la granulosa (13). El mayor nivel de expresión de AMH está presente en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños hasta de 6 mm de diámetro (14), mientras que esta expresión cesa en folículos creciendo a la dominancia (15, 16). La hormona antimülleriana apenas se detecta al nacimiento y alcanza sus valores máximos después de la pubertad, luego decrece progresivamente con la edad y se vuelve indetectable con la menopausia (17, 18). Los niveles séricos de AMH se muestran fuertemente relacionados con el número de folículos antrales (19, 20) y parecen independientes del ciclo (21, 22). En muchos estudios se la menciona como predictor de respuesta ovárica en la hiperestimulación (23, 24) y posiblemente incluso de la posibilidad de embarazo después de FIV (25).

El objetivo de la presente revisión fue calcular la verdadera certeza de la AMH como factor pronóstico para los resultados de tratamiento de FIV/ inyección intracitoplasmática (ICSI), comparado con AFC el cual se ha mostrado como el mejor predictor de pobre respuesta después de FIV (12).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente revisión, se seleccionaron estudios que abordaran la evaluación de AFC y AMH como predictores de resultados de pobre respuesta y embarazo después de tratamientos de FIV o ICSI. No se utilizaron criterios preseleccionados para la definición de respuesta ovárica pobre o embarazo. La definición de respuesta ovárica pobre incluyó cancelación de ciclos, número de folículos dominantes en ecografía, ovocitos extraídos por debajo un cierto umbral, o combinaciones de estos. La definición de embarazo incluyó tanto embarazo en curso como clínico. Además cualquier punto de corte o serie de puntos de cortes para un resultado anormal de un examen fueron incluidos en la revisión y análisis.

Se llevó a cabo una sistemática búsqueda en Medline utilizando las palabras claves "in vitro fertilization" o "in vitro fertilisation" o "assisted," "intracytoplasmatic," o "intracytoplasmic" en combinación con "antimullerian hormone," "mullerianinhibiting substance," o "mullerian-inhibiting factor.". En la búsqueda se cubrió un período incluyendo todos los años alrededor de 2006. Los abstracts de todos los estudios identificados fueron leídos por un investigador (S.B.). Cualquier artículo que pudiera posibilitar la

evaluación para la asociación entre AMH y resultados de FIV en respuesta ovárica pobre o embarazo fue preseleccionado. En el próximo paso, dos investigadores (S.B. y D.H.) han leído y evaluado cuidadosamente todos los artículos preseleccionados independientemente. Si se determinó que era posible la construcción de tablas 2 x 2, donde los resultados de los exámenes fueron relacionados en un punto de corte para los parámetros obtenidos para pobre respuesta y/o embarazo, el estudio fue seleccionado para el registro y análisis. Cuando hubo cualquier desacuerdo entre los dos investigadores, la opinión de un tercero (F.B.) fue la definitiva. Se contactaron vía correo electrónico los autores de los estudios en los que no existía la posibilidad de crear una tabla 2 x 2 y se le pidió que provean los datos necesarios para crear dicha tabla. Si se obtuvieron los datos adecuados de esta forma, se sumó el estudio a la selección. En cada estudio selecto, se escaneó la lista para identificar estudios que puedan posiblemente ser incluidos en la selección y procesados como ha sido descrito.

Cada estudio seleccionado fue posteriormente calificado por un investigador S.B. y D.H. en las siguientes características cualitativas del estudio: 1) muestreo (consecutivo vs otros); 2) colección de datos (prospectivo vs. retrospectivo); 3) diseño del estudio (cohorte vs estudio de caso y control); 4) ciego (ausente o presente); 5) sesgo de selección; 6) sesgo de verificación; 7) análisis de uno o múltiples ciclos por parejas; y 8) estimulación (antagonistas o agonistas de la GnRH). Además se archivaron los datos utilizados de los niveles de corte, así como también el ensayo utilizado para medir AMH.

Para la comparación de AMH y AFC, se pusieron al día los meta-análisis recientemente publicados (8-12) sobre la eficacia del AFC. El período a ser cubierto para la búsqueda sistemática de estudios que reportaran AFC en la predicción de pobre respuesta y no embarazo después de FIV se extendió más allá de diciembre de 2006 (8, 12). La misma serie básica de palabras claves fue utilizada como el listado de arriba, en combinación con "antral follicle count" o "antral follicle number". Si por esta búsqueda se encontraron nuevos estudios y juzgados como apropiados por procesarse acorde al procedimiento descrito, se sumaron a los estudios de AFC ya analizados. Si un estudio fue localizado tanto para AMH como para AFC en las búsquedas, este estudio fue utilizado para ambos grupos de revisión.

Debido a que esta revisión utilizó solo datos publicados de la literatura, no requirió aprobación de un tribunal institucional.

## ANÁLISIS

Primero, por cada estudio finalmente incluido calculamos la sensibilidad y especificidad para las tablas de 2 x 2. Los puntos de sensibilidad y especificidad fueron resumidos en una curva de rendimiento predictivo ROC. La homogeneidad de los puntos de sensibilidad y especificidad fueron examinados por las medias del test chi-square. Se calculó una suma de puntos que estima la sensibilidad y especificidad y un intervalo de confianza de 95% si la homogeneidad de ambos parámetros no podría ser rechazada. En caso de heterogeneidad de uno de los dos parámetros, se utilizó una regresión logística para evaluar si las características del estudio fueron asociadas con la capacidad discriminativa. Si se encontró que una de las características del estudio tenía un impacto estadísticamente significativo en la eficiencia del examen, se realizaron análisis posteriores en subgrupos de pacientes. Si no, se exploró si las diferencias en las combinaciones de sensibilidad y especificidad fueron el resultado del uso de los diferentes niveles umbrales. Para este propósito se calculó una correlación de coeficiente Spearman para la asociación entre sensibilidad y especificidad.

En caso de una correlación negativa definida como un coeficiente de correlación de 0.5 o menos, se estimó una curva ROC, usando un modelo de efecto de regresión (26-28) y asumiendo que los estudios eran heterogéneos por el uso de diferentes umbrales. Se siguieron los mismos procedimientos para estudios en AFC de la búsqueda.

Se examinaron las diferencias estadísticamente significativas para la curva ROC construida de AMH y AFC con un modelo de regresión lineal, similar al modelo utilizado para evaluar el impacto de las características del estudio.

## RESULTADOS

### Revisión sistemática

La búsqueda sistemática en Medline produjo 742 resultados de los cuales fueron selectos 24 estudios basados en sus abstracts. Pudimos realizar tablas de 2 x 2 de nueve estudios. Contactamos los autores de los demás estudios, de los cuales 4 nos proveyeron con la información necesaria para construir tablas de 2 x 2.

A través de esta estrategia de búsqueda y selección, se identificaron un número final de 13 estudios que reportan la capacidad de la AMH para predecir la respuesta ovárica y/o no embarazo después de FIV y

que son considerados adecuados para la extracción de datos y meta-análisis (20, 29-40). Cinco estudios reportaron tanto baja respuesta como embarazo, un estudio embarazo solamente, y 7 sobre baja respuesta. Las características de los estudios incluidos están incluidas en la tabla 1. De esta tabla se muestra que todos los estudios presentaron datos de un ciclo por pareja y que la mayoría utilizó un diseño de cohorte prospectivo. Por lo tanto la definición de baja respuesta fue bastante uniforme. Sin embargo se detectaron sesgos de selección en un número considerable de estudios.

Para la AFC, la búsqueda sistemática y selección no reveló estudios adicionales elegibles para el análisis. Como consecuencia un total de 17 estudios sobre AFC fueron disponibles

### Certeza de predicción de baja respuesta

La sensibilidad y especificidad de predicción de baja respuesta ovárica calculada en cada estudio y reportada en AMH se resume en la tabla 2. La sensibilidad varía entre 40% y 91% y la especificidad entre 64% 100%. La homogeneidad entre ambos tuvo que ser rechazada (valor P para el test X<sup>2</sup> para sensibilidad y especificidad: .04 y .001 respectivamente). Por esta razón el cálculo de un único punto en común estimado para sensibilidad y especificidad no tenía sentido.

El análisis de regresión logística mostró que ninguna de las características del estudio grabadas tiene un impacto estadísticamente significativo en el rendimiento reportado de predicción de AMH.

Por ejemplo, si el diseño del estudio fue retrospectivo o prospectivo, no hubo influencia en la capacidad pronóstica de la AMH como fue estimado en los estudios. Un gráfico con los puntos de sensibilidad y especificidad en un espacio ROC se muestran en la Figura 1. La correlación del coeficiente Spearman para sensibilidad y especificidad fue - 0.31, el cual fue evaluado como suficiente para estimar un resumen de curva ROC (Fig.1).

### Certeza de predicción de no embarazo

Para la predicción de no embarazo la sensibilidad y especificidad de cada estudio se resumieron en la Tabla 2. En forma similar a la respuesta ovárica, la homogeneidad para sensibilidad tuvo que ser rechazada. Sin embargo la especificidad parece ser homogénea (x<sup>2</sup> test: P= .11). La sensibilidad varía entre 19% y 66%, sin embargo la especificidad varía entre

TABLE 1

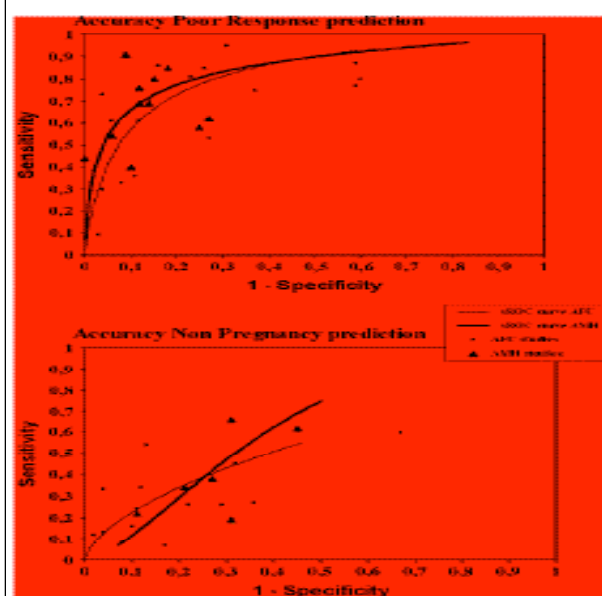
Characteristics of the 13 included studies for antimüllerian hormone (AMH).

Author	Consecutive	One cycle per couple	Data per cycle	Cohort/ case-control	Prospective/ retrospective	Blinding	Selection bias	Verification bias	Agonist/ antagonist	Definition of poor response/ pregnancy	AMH assay
Ebner 2006 (37)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	Yes	Both	<4 oocytes/ clinical	Beckman-Coulter
Mulawandira 2007 (33)	No	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Both	<4 oocytes or cancellation/ ongoing	Immunoassay-Coulter
Van Rooj 2002 (20)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Agonist	<4 oocytes	Immunoassay-Coulter
Pararubio 2005 (31)	Yes	Yes	Yes	Case-control	Retrospective	No	No	No	Agonist	Cancellation/ clinical	Immunoassay-Coulter
Tremellen 2005 (32)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Agonist	≥4 oocytes	Beckman-Coulter
Pudugupati 2006 (35)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	No	No	Agonist	<6 oocytes	DGL
La Marca 2006 (32)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	No	Yes	Agonist	<4 oocytes or cancellation	Immunoassay-Coulter
Molteni 2007 (34)	No	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Agonist	≥4 oocytes	Beckman-Coulter/ Immunoassay
Kwon 2007 (42)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Agonist	<6 oocytes	DGL
Mulawandira 2005 (23)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Retrospective	No	No	No	Agonist	≥4 oocytes	Immunoassay-Coulter
Edris-Grava 2005 (38)	Yes	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Agonist	Ongoing	Immunoassay-Coulter
Froeur 2007 (39)	No	Yes	Yes	Cohort	Prospective	No	Yes	No	Not clear	<6 oocytes	Beckman-Coulter/ DGL
Smeenk 2007 (36)	No	Yes	Yes	Cohort	Prospective	Yes	Yes	No	Agonist	<4 oocytes/ ongoing	Immunoassay

Data from: [13]. doi:10.1371/journal.pone.0015737.t001

FIGURE 1

Accuracy of poor response and nonpregnancy predictions. AFC = antral follicle count; AMH = antimüllerian hormone; ROC = receiver operating characteristic.



Basal AMH in IVF outcome prediction. Fertil Steril 2009.

55% y 89%. Para la estimación de un punto de resumen para la sensibilidad y especificidad se necesitó una homogeneidad estadística para ambos parámetros. Consecuentemente esta solución fue abandonada. Un gráfico de puntos de sensibilidad-especificidad en una curva ROC es mostrado en la Figura 1.

La correlación del coeficiente Spearman para sensibilidad y especificidad fue de -0.71 para la predicción de no embarazo, el cual se evaluó como suficiente para estimar una curva ROC (Fig. 1).

## VALOR CLÍNICO

Basado en las curvas ROC representadas en la Figura 1, se calculó un rango de posibles ratios positivos correspondientes a diversos puntos de sensibilidad y especificidad en esta curva ROC. Por cada una de estos posibles valores ratio la probabilidad en el pre examen de AMH de pobre respuesta o no embarazo (fijado en 20% y 80% respectivamente) fue convertido en una probabilidad post examen de AMH. La Tabla 3 dibuja una serie de rangos posibles y la probabilidad de obtener un examen AMH correspondiente a este rango de posibles ratios, así como también a la probabilidad post examen de pobre respuesta y no

TABLE 2

Performance of antimüllerian hormone (AMH) in the prediction of poor response and nonpregnancy in IVF patients and shift from pretest to posttest probability of poor response and nonpregnancy for patients with an abnormal test result.

Author	Cycles (n)	AMH cut-off value	Prediction characteristics			Pretest probability (%)	Posttest probability (%)	Proportion with abnormal test (%)
			Sens	Spec	LR+			
<b>Poor response</b>								
Van Rooij 2002 (20)	119	0.1 µg/L	0.49	0.94	9.2	29	77	18
	119	0.2 µg/L	0.54	0.99	5.4	29	78	23
	119	0.3 µg/L	0.60	0.89	5.5	29	79	25
Mutukrishna 2004 (30)	69	0.1 ng/ml	0.76	0.88	5.8	25	68	28
Mutukrishna 2005 (29)	108	0.2 ng/mL	0.87	0.64	2.4	Not possible to calculate		
Ponemaju 2005 (31)	90	4.9 pmol/l	0.40	0.92	5.0	26	62	16
Ebner 2006 (37)	141	1.66 ng/mL	0.69	0.68	4.9	26	63	29
Falcioglu 2006 (38)	44	0.25 µg/mL	0.91	0.51	10.1	26	77	30
La Marca 2006 (72)	48	0.5 ng/ml	0.85	0.62	4.7	26	63	35
	48	0.75 ng/mL	0.80	0.93	11.4	26	77	37
McLellan 2007 (34)	84	1.25 ng/mL	0.56	0.75	2.3	57	76	44
Smeenk 2007 (30)	90	1.4 µg/L	0.62	0.73	2.3	16	31	33
Tremellen 2005 (32)	75	9.3 pmol/l	0.80	0.65	5.9	27	87	32
Fracor 2007 (39)	69	1.20 µg/L	0.44	1.00	∞	13	100	5
Kwee 2007 (40)	104	0.8 µg/L	0.55	0.94	9.2	27	75	19
	104	1.0 µg/L	0.66	0.94	11	27	78	22
	104	1.2 µg/L	0.69	0.88	5.8	27	80	27
	104	1.4 µg/L	0.76	0.85	5.4	27	85	31
	104	1.6 µg/L	0.79	0.78	3.6	27	55	33
<b>Pregnancy</b>								
Van Rooij, 2002 (20)	106	0.1 ng/mL	0.22	0.69	2.0	75	35	19
	106	0.2 ng/mL	0.27	0.85	1.6	75	84	24
	106	0.3 ng/mL	0.29	0.61	1.5	75	91	25
Elder-Geva 2005 (33)	56	18 pmol/l	0.87	0.69	2.2	64	71	50
Ponemaju 2005 (31)	90	Not stated	0.62	0.55	1.4	66	73	56
Ebner 2006 (37)	132	1.66 ng/mL	0.49	0.69	0.6	51	39	25
Smeenk 2007 (38)	80	1.4 µg/L	0.38	0.73	1.4	50	56	33
Kwee 2007 (40)	104	1.4 µg/L	0.34	0.79	1.6	77	84	34

Note: If a study reported on multiple cut-off values, data for all cut-off values are shown. LR+ = likelihood ratio for a positive test result; Sens = sensitivity; Spec = specificity.

Revis: AMH en IVF - source: prediction, Post Shift 24%

embarazo. A un posible ratio positivo máximo de ~8, la probabilidad de examen post AMH de pobre respuesta aproximará a 65% si la probabilidad del pre examen AMH se asume tan alta como un 20%. La probabilidad de obtener un resultado de examen para AMH con un posible ratio de ~8 es lo suficientemente alta para considerar la AMH ser un examen clínico valioso para predicción de pobre respuesta.

Para la predicción de no embarazo, el nivel de corte de la AMH extremadamente bajo que es necesario para obtener un moderado ratio posible positivo de ~5 basado en una tasa pre examen de 20%, ocurre solo en un extremadamente limitado número de pacientes

(Tabla 3). La curva ROC no se aleja demasiado de la línea de igualdad, indicando que la mayoría de la curva ROC es unformativa (ratio posible ~1).

### Comparación de AMH con AFC

En el análisis de los 17 estudios disponibles la sensibilidad y especificidad para AFC en la predicción de pobre respuesta y no embarazo muestran heterogeneidad. Después de excluir la necesidad de un subgrupo de análisis de los análisis de las características del estudio, la correlación del coeficiente Spearman entre sensibilidad y especificidad para baja



**TABLE 3**

Occurrence of both antimüllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC) results within a specified likelihood ratio (LR) range and the concomitant posttest probabilities of poor response and nonpregnancy, given a prevalence of poor response of 20% and nonpregnancy of 80%.

Prediction of poor response (pretest probability = 20%)				Prediction of nonpregnancy (pretest probability = 80%)			
LR range	Occurrence of test results in range (%)		Posttest probability of poor response (%)	LR range	Occurrence of test results in range (%)		Posttest probability of nonpregnancy (%)
	AMH	AFC			AMH	AFC	
0-1	66	68	<20	0-1	75	77	<80
1-2	7	10	20-33	1-2	15	16	80-89
2-3	5	4	33-43	2-3	6	5	89-93
3-4	7	6	43-50	3-4	1	0	93-94
4-5	1	0	50-56	4-5	3	2	94-95
5-6	1	0	56-60	5-6	0	0	95-96
6-7	0	0	60-64	6-7	0	0	96-96.5
7-8	0	0	64-67	7-8	0	0	96.5-97
>8	13	12	>67	>8	0	0	>97

Note: For a high level of LR (i.e., >8) the probability of producing a poor response is ~70%. The chance of obtaining such a test result at the cut-off level for AMH used would be ~13%. At the same high level of positive LR the chance of not becoming pregnant is ~97%. The probability of measuring AMH at that low cut-off, however, is close to zero.

Revis: AMH in IVF outcome prediction. Fertil Steril 2009.

respuesta y no embarazo fue juzgada como suficiente para estimar una curva ROC (-0.63 y -0.67, respectivamente). Estas curvas se dibujan en la Figura 1 y muestran exactitud para la predicción de pobre respuesta ovárica pero una exactitud limitada para predicción de no embarazo.

La comparación de las curvas ROC estimadas para la predicción de pobre respuesta no muestran aumento de la eficacia de AMH comparada con AFC (P=.73). La exactitud general para predecir no embarazo fue pobre para ambos exámenes. No hubo diferencia significativa entre las curvas ROC para predicción de no embarazo entre ambos exámenes (P=.67).

El valor clínico esquematizado en la Tabla 3 indica un rendimiento ligeramente mejor para AMH comparado con AFC. En especial el trazado de la curva ROC a través del eje Y sugiere que en muchos casos de pobre respuesta se pueden identificar con solo un limitado número de falsos positivos. Si se aceptan más falsos positivos, la sensibilidad puede ascender hasta 70% con solo una tasa de falso positivo de 10%, y el rendimiento de este examen implicará un número realista de exámenes anormales.

## DISCUSIÓN

### Principales descubrimientos

Este meta-análisis resume la evidencia disponible en la exactitud de AMH comparado con AFC en la predicción de respuesta ovárica pobre después de estimulación para FIV. Las curvas ROC no sugieren una clara mejor habilidad de predicción por la AMH que por la AFC, y la diferencia no fue estadísticamente significativa (p=.73). Esto implica que el mejor predictor de pobre respuesta hoy en día, AFC (12), ha obtenido la compañía de un test que pueda tener algunas ventajas cruciales. Este examen no necesita ser realizado en un día específico del ciclo porque los niveles de AMH han mostrado fluctuar ligeramente y la predicción extrayendo sangre en cualquier día del ciclo tendrá la misma exactitud (21, 36, 41). Muchas veces la extracción de sangre se realiza como preparación de un tratamiento de FIV y por ello no sería necesaria una nueva venopuntura. Actualmente la disponibilidad del ensayo de AMH puede presentar algunos problemas pero seguramente este sistema de examen se convertirá en parte de uno de las tantas ba-



terías de petición automáticas, con una validez de control inherente y variación de ensayo limitada. En contraste, AFC necesita operadores cualificados en ecografía quienes identifiquen, midan y cuenten los folículos ováricos. Aunque los sesgos de observador pueden ser limitados técnicamente (42, 43), una nueva fuente de sesgos puede surgir del hecho que el ecografista está habilitado en el corte para el juicio del examen y para el tratamiento de la pareja. Esta inflación de los exámenes ha sido recientemente sugerida de un estudio en pacientes mayores para FIV quienes fueron permitidas o rechazadas en base a estos exámenes (11). Entonces, AFC tuvo que ser llevado a cabo en la fase folicular temprana del ciclo, aunque las variaciones del recuento a través del ciclo pueden ser muy modestas (44).

El rendimiento para la predicción de no embarazo es claramente pobre para ambos AMH y AFC. Esto no es una sorpresa porque tanto AMH como AFC representan solo el tamaño de cohorte de folículos con sensibilidad a FSH continuamente presentes en los ovarios. La respuesta a la hiperestimulación ovárica se relacionará directamente al tamaño de esta cohorte (45). La relación entre cantidad y ovocitos y calidad embrionaria es mucho menos clara. Por ello, las posibilidades de embarazo después de FIV dependen de mucho más factores que solo el tamaño de cohorte, como calidad embrionaria, técnica de transferencia, y receptividad endometrial (46). También en las décadas pasadas no se han evaluado ni un examen de reserva ovárica en una serie de ciclos subsecuentes. Parecería que solo estudiando varios ciclos consecutivos se puede obtener una representación de la capacidad reproductiva restante de la mujer. Sólo un estudio ha demostrado un valor predictivo certero en la obtención de embarazo en un grupo selecto de casos con normal FSH y niveles de AFC (25). Este estudio, sin embargo, no pudo ser incluido en el presente meta-análisis por la falta de datos para producir una tabla de contingencias.

### **Limitaciones**

Este meta-análisis contiene posibles debilidades. Primero, la definición de pobre respuesta en los estudios fue definida de diferentes formas. Las mayorías de las definiciones estaban basadas en parámetros de los resultados de los tratamientos de FIV, como ciclos cancelados por crecimiento folicular limitado, número de ovocitos obtenidos, o el número de folículos maduros en la ecografía. A pesar de la definición de pobre respuesta, el valor de corte de pobre respuesta también cambió a lo largo de los estudios; por ejem-

plo, el número de ovocitos obtenidos pudo variar entre <4 y <7 ovocitos. Esto pudo llevar a grupos de estudios heterogéneos y por lo tanto a potenciales dificultades en obtener datos. Sin embargo, debido a que los estudios parecían bastante homogéneos en lo que refiere a la calidad de las características analizadas, el despliegue a través del diagrama ROC indica que el valor de corte y las definiciones para las variables de los resultados utilizados son la causa más probable de estas variaciones. Esto también se ejemplifica por el hecho de que la curva ROC puede ser ajustada a los estudios.

Se puede recordar que el propósito de cualquier examen de reserva ovárica es la identificación de mujeres con reserva ovárica pobre para su edad. El presente meta-análisis evaluó el rendimiento de la AMH en un contexto único, independiente de la edad de la mujer, aunque la edad es el predictor más importante para los resultados de FIV (47). Por ello, antes de establecer la aplicabilidad definitiva de AMH se necesitan estudios clínicos en los que se estudien el rendimiento de AMH en un análisis multivariable que explique su interacción con la edad de la mujer.

Finalmente, no existe un ensayo estándar internacional para medir AMH, que posiblemente contribuye a la discordancia a través de los estudios y por ello se hace comparaciones entre dificultades de laboratorios (31). También, hay una moderada variabilidad interciclo e interobservador en AFC (42). Actualmente no se puede analizar separadamente el rol de estos factores.

### **Implicaciones para la práctica clínica**

La pregunta es si la habilidad predictiva buena e imparcial de AMH en lo que refiere a la incidencia de pobre respuesta a la hiperestimulación tiene un valor clínico o no. Un test para reserva ovárica ideal debería identificar un porcentaje substancial de casos indicados para FIV con una probabilidad prácticamente de cero de embarazarse en una serie de ciclos de tratamientos debido a los efectos adversos de la reserva ovárica disminuida. Estos casos pueden abstenerse de entrar al programa y la bastante alta carga de pacientes con solo resultados decepcionantes puede ser de este modo prevenida. Entonces se pueden evitar altos costos para solo resultados bajos. La predicción certera de baja respuesta puede por lo tanto tener valor clínico si las perspectivas de embarazo son tan desfavorables que se le pudiera negar tratamiento una paciente diagnosticada de pobre respondedora.

Aquí vemos dos problemas. Primero el hecho de que la predicción de pobre respuesta no es totalmente

fiable y que mujeres con exámenes falsos positivos pueden ser incorrectamente abstenidos de FIV. De la curva ROC en la Figura 1 se puede leer que para un nivel deseado de sensibilidad de 70%-80% una tasa de falsos positivos de 10%-20% puede ser esperada. Si efectivamente las bajas respondedoras predichas tienen muy bajo pronóstico de embarazo y deberían ser rechazadas de tratamiento, deberían utilizarse niveles de corte extremadamente bajos para prevenir falsos positivos. Esto puede implicar que solo se encontrará un pequeño porcentaje de exámenes anormales muchas pobres respondedoras pasarán desconocidas.

Segundo, muchas pobres respondedoras logran un embarazo, aunque las posibilidades efectivamente son menores que óptimas comparados con respondedoras normales (48). Especialmente las pobres respondedoras a una edad joven tienen un pronóstico diferente que pobres respondedoras mayores (10). Esto es de hecho la falta de una relación directa entre cantidad en la respuesta y calidad de los ovocitos que hace la identificación de muy mal pronóstico muy difícil. Además, se debería considerar el valor del peso de los falsos positivos y falsos negativos de las predicciones. Si se pregunta a los pacientes por su opinión acerca de que es peor: el rechazo incorrecto a un tratamiento de FIV comparado con un FIV con resultados incorrectos, ellos consideran al primero mucho peor que el segundo, de ahí la implicancia de que los exámenes de reserva ovárica disponibles tienen poca exactitud insuficiente para rechazar un FIV (49).

Aparte del significado predictivo de la incidencia de embarazo después de FIV, la predicción de respuesta ovárica pobre es también potencialmente importante para el ajuste individual de las dosis de gonadotropinas antes de FIV. Los pacientes en los que se espera una baja respuesta se considera que se beneficiarían con dosis de comienzo de 225 IU/día en vez de 150/día (51).

De hecho el punto debe ser elevado a si hay algún manejo efectivo y probado para pobres respondedoras. Hay dos estrategias. El primer método funcional utilizando altas dosis de gonadotropinas, y el segundo método funcional en el pensamiento de la creencia que la sensibilidad del ovario puede incrementarse con la adición de medicación. Aunque se han usado altas dosis de gonadotropinas por la gran mayoría de los autores, los resultados han sido controversiales y en muchos estudios prospectivos randomizados han mostrado poco o ningún beneficio. Terapias avanzadas con hormona de crecimiento (GH) o factores liberadores de GH no han aumentado significativamente los resultados. El uso de corticoides y óxido nítrico

ha mostrado resultados alentadores en donantes, pero faltan estudios confirmatorios. Finalmente, ciclos naturales con FIV han producido resultados que son comparables a aquellos obtenidos con ciclos estimulados en verdaderas pobres respondedoras. Se necesitan estudios bien diseñados, randomizados y a grandes escalas para estudiar la verdadera eficacia de estas diferentes estrategias de manejo (52).

Al día de hoy, la FSH basal es el examen más comúnmente usado para la estimación de la reserva ovárica. La exactitud y valor clínico de este examen ha sido muy debatido en un estudio reciente (6). En comparación con AFC, la FSH basal parece inferior en la predicción de pobre respuesta (12). Por ello, basados en los resultados presentados, la AMH puede convertirse en un examen para reserva ovárica cuantitativa que puede ser preferida a la FSH basal. Aparte de la inestabilidad en el ciclo de la FSH (21) comparado con AMH, los niveles de FSH pueden estar elevados por otras causas como la diszigocidad familiar o polimorfismos de receptor de FSH (9, 53,54).

Basados en el actual estatus de los exámenes de reserva ovárica se puede proponer que FIV puede ser iniciado sin ningún examen de reserva ovárica. La respuesta en el primer ciclo puede servir como un examen de primera línea y si este es pobre, se puede necesitar la aplicación de un test de reserva ovárica como AFC o AMH. Si estos exámenes pudieran confirmar la existencia de una reserva ovárica pobre entonces el pronóstico se puede considerar pobre y se podría rechazar futuros tratamientos (55). Si el examen es normal, se puede considerar meritorio una adaptación de dosis y se justifica la continuación de tratamiento.

### Investigación futura

En lo que respecta al conocimiento del proceso que dicta la edad reproductiva es todavía limitado. Nosotros entendemos que el número de folículos declina con la edad pero todavía existe una falta de conocimiento en como la reserva folicular producida en ovarios fetales es agotada subsecuentemente. De este modo no podemos explicar variaciones individuales en este proceso de reducción. Reconocemos que los ovocitos pierden la competencia de producir embriones viables con la edad, pero falta entender el mecanismo detrás de este proceso. Dos décadas de investigación en reserva ovárica no han propinado un examen endocrinológico o imagenológico exitoso que haga una clara diferencia en el manejo clínico de los pacientes. Parece necesario identificar marcadores genéticos de los procesos que regulan la cantidad

y calidad de folículos (56) así como también estudios longitudinales en la relación entre estos marcadores y la ocurrencia de menopausia (57), para avanzar en el campo de asesorar edad ovárica y predecir potencial reproductivo en forma individual.

En resumen, el presente meta-análisis ha mostrado que la AMH tiene por lo menos el mismo nivel de éxito y valor clínico para predicción de baja respuesta y no embarazo que AFC. La aplicabilidad clínica finalmente depende de la forma en que el resultado de un examen anormal puede alterar el manejo de un paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Leridon H.:** Demographic effects of the introduction of steroid contraception in developed countries. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 603-16.
2. **Spira A.:** The decline of fecundity with age. *Am J Human Biol* 1988; (Suppl 1): 15-22.
3. **Wood JW.:** Fecundity and natural fertility in humans. *Oxf Rev Reprod Biol* 1989; 11: 61-109.
4. **te Velde ER, Pearson PL.:** The variability of female reproductive aging. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 141-54.
5. **Gougeon A, Egochard R, Thalabard JC.:** Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of nongrowing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994; 50: 653-63.
6. **Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB.:** A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 685-718.
7. **Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, te Velde ER.:** A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1247-53.
8. **Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ.:** Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril* 2007; 87: 764-75.
9. **de Koning CH, Benjamins T, Harms P, Homburg R, van Montfrans JM, Gromoll J, et al.:** The distribution of FSH receptor isoforms is related to basal FSH levels in subfertile women with normal menstrual cycles. *Hum Reprod* 2006; 21: 443-6.
10. **Lashen H, Ledger W, Lopez-Bernal A, Barlow D.:** Poor responders to ovulation induction: is proceeding to in-vitro fertilization worthwhile? *Hum Reprod* 1999; 14: 964-9.
11. **van Disseldorp J, Eijkemans MJ, Klinkert ER, te Velde ER, Fauser BC, Broekmans FJ.:** Cumulative live birth rates following IVF in 41- to 43- year-old women presenting with favourable ovarian reserve characteristics. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 455-63.
12. **Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ.:** Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005; 83: 291-301.
13. **Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, et al.:** Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 571-6.
14. **Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al.:** Anti-mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 77-83.
15. **Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J.:** Serum antimullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2003; 18: 328-32.
16. **La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Lev ratti P, et al.:** Anti-mullerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004; 19: 2738-41.
17. **Hudson PL, Dougas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, et al.:** An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J.Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 16-22.
18. **de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC.:** Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77: 357-62.
19. **Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP.:** Anti-mullerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 85-90.
20. **van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, Jong FH, et al.:** Serum antimullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17: 3065-71.
21. **Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans FJ.:** Anti-mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J.Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4057-63.
22. **La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A.:** Serum antimullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006; 21: 3103-7.
23. **Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM.:** Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian res-

- ponse during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002; 77: 468-71.
24. **van Rooij IA, de Jong E, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER.:** High follicle-stimulating hormone levels should not necessarily lead to the exclusion of subfertile patients from treatment. *Fertil Steril* 2004; 81: 1478-85.
  25. **Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P.:** Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82: 1323-9.
  26. **Littenberg B, Moses LE.:** Estimating diagnostic accuracy from multiple conflicting reports: a new meta-analytic method. *Med Decis Making* 1993; 13: 313-21.
  27. **Midgette AS, Stukel TA, Littenberg B.:** A meta-analytic method for summarizing diagnostic test performances: receiver-operating-characteristic-summary point estimates. *Med Decis Making* 1993; 13: 253-7.
  28. **Moses LE, Shapiro D, Littenberg B.:** Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additional considerations. *Stat Med* 1993; 12: 1293-316.
  29. **Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P.:** Antral follicle count, antimüllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005; 112: 1384-90.
  30. **Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M.:** Inhibin B and antimüllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004; 111: 1248-53.
  31. **Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, et al.:** Basal and stimulation day 5 antimüllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005; 20: 915-22.
  32. **Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN.:** Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005; 45: 20-4.
  33. **Eldar-Geva T, Ben Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, et al.:** Dynamic assays of inhibin B, antimüllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005; 20: 3178-83.
  34. **McIlveen M, Skull JD, Ledger WL.:** Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod* 2007; 22: 778-85.
  35. **Ficicoglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z.:** Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006; 85: 592-6.
  36. **La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al.:** Anti-müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007; 22: 766-71.
  37. **Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G.:** Basal level of antimüllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 2006; 21: 2022-6.
  38. **Smeenk JM, Sweep FC, Zielhuis GA, Kremer JA, Thomas CM, Braat DD.:** Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007; 87: 223-6.
  39. **Freour T, Mirallie S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barriere P, Masson D.:** Measurement of serum antimüllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: comparison and relevance in assisted reproductive technology (ART). *Clin Chim Acta* 2007; 375: 162-4.
  40. **Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen AP, de Jong FH, Lambalk CB.:** Evaluation of AMH as test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril*. Published online October 17, 2007. [E-pub ahead of print.]
  41. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000; 73: 859-61.
  42. **Hansen KR, Morris JL, Thyer AC, Soules MR.:** Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting. *Fertil Steril* 2003; 80: 577-83.
  43. **Scheffer GJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER.:** Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 20: 270-5.
  44. **Pache TD, Wladimiroff JW, de Jong FH, Hop WC, Fauser BCJM.:** Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1990; 54: 638-42.
  45. **Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J.:** Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2003; 18: 1422-7.
  46. **Boomsma CM, Macklon NS.:** What can the clinician do to improve implantation? *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 845-55.
  47. **Templeton A, Morris JK, Parslow W.:** Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 1996; 348: 1402-6.
  48. **van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de**

- Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, et al.:** Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 476-80.
49. **Mol BW, Verhagen TE, Hendriks DJ, Collins JA, Coomarasamy A, Opmeer BC, et al.:** Value of ovarian reserve testing before IVF: a clinical decision analysis. *Hum Reprod* 2006; 21: 1816-23.
50. **Popovic-Todorovic B, Loft A, Bredkjaer HE, Bangsboll S, Nielsen IK, Andersen AN.:** A prospective randomized clinical trial comparing an individual dose of recombinant FSH based on predictive factors versus a "standard" dose of 150 IU/day in "standard" patients undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2003; 18: 2275-82.
51. **Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER.:** Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005; 20: 611-5.
52. **Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J.:** Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 61-76.
53. **de Koning CH, Popp-Snijders C, Martens F, Lambalk CB.:** Falsely elevated follicle-stimulating hormone levels in women with regular menstrual cycles due to interference in immunoradiometric assay. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 457-9.
54. **Lambalk CB, de Koning CH.:** Interpretation of elevated FSH in the regular menstrual cycle. *Am J Human Biol* 1998; 30: 215-20.
55. **Hendriks D, te Velde ER, Looman CW, Bancsi LF, Broekmans FJ.:** The role of poor response in the prediction of the cumulative ongoing pregnancy rate in vitro fertilisation. In: *Dynamic and basal ovarian reserve tests for outcome prediction in IVF: comparisons and meta-analyses*. [Academic thesis, University Utrecht]. 2005: 162-179.
56. **Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC.:** Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 58-65.
57. **Hefler LA, Grimm C, Bentz EK, Reinhaller A, Heinze G, Tempfer CB.:** A model for predicting age at menopause in white women. *Fertil Steril* 2006; 85: 451-4.