

## Influencia del protocolo de estimulación en la concentración hormonal de líquidos foliculares

### *Influence of stimulation protocol in hormonal concentration in follicular fluid*

Santalla A, López-Moreno M.E, López-Criado M.S, Fontes J, Gonzalvo M.C, Pérez M, López Jurado R, Ramos B, Calderón MA, Castilla J.A, Martínez L.

Unidad de Reproducción Asistida Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.

#### **Resumen**

**Objetivo:** *Determinar si existen diferencias en las concentraciones hormonales de los líquidos foliculares obtenidos tras utilizar dos protocolos de estimulación (análogo largo vs antagonista) y analizar su relación con la obtención de gestación. Material y Métodos:* *Ensayo clínico prospectivo y aleatorizado con 150 pacientes que se sometieron a FIV/ICSI. Setenta y cinco pacientes fueron asignadas al protocolo largo de estimulación con agonistas de la GnRh y otras 75 utilizaron el protocolo de antagonistas de la GnRh. Se incluyeron pacientes menores de 40 años con esterilidad primaria que se sometían a un primer ciclo de FIV/ICSI. De cada grupo, se seleccionaron aquellos líquidos foliculares que se consideraron claros (sin contaminación sanguínea) (53 y 18 respectivamente), determinándose la concentración de estrógenos, progesterona, testosterona, FSH, LH y prolactina. Resultados:* *No se encuentran diferencias significativas entre los niveles de hormonas esteroideas y proteicas en el líquido folicular en función del protocolo de estimulación usado o la consecución de embarazo o no.*

**Conclusión:** *Nuestros resultados nos hacen pensar que los cambios séricos (disminución de LH, estancamiento del estradiol) que acontecen en los ciclos de antagonista no repercuten sobre los niveles de hormonas a nivel folicular, por lo que cabe la posibilidad que la utilización de dichos fármacos no repercuta de forma negativa ni sobre el folículo, ni sobre la calidad ovocitaria.*

**Palabras Clave:** Líquidos foliculares. Niveles hormonales, Protocolos de estimulación. Embarazo.

#### **Summary**

**Objective:** *To determinate if there are any differences in hormonal concentration in follicular fluid obtained after ovarian stimulation for IVF/ICSI with GnRH agonist or antagonist and to evaluate their association with clinical pregnancy.. Methods:* *A prospective study with 150 women undergoing IVF/ICSI was carried out. Seventy five women were treated with GnRH agonist and 75 were treated*

---

**Correspondencia:** Dr. D. Angel Santalla  
Servicio Obstetricia y Ginecología.  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves  
Avda Fuerzas Armadas s/n  
18014 Granada. España.  
e-mail: aasantallah@fundacionhvn.

*with GnRH antagonist. All women participating in the study were under 40 years old. In each group, those follicular fluid considered as "clear" (without hematic contamination) were collected and follicular fluid concentrations of oestradiol, progesterone, testosterone, FSH, LH and prolactine were quantified. Results: No differences were found in follicular fluid concentrations of hormones between groups. These differences were also not found when the final result (clinical pregnancy) was considered. Conclusion: We think that serical changes found when GnRH antagonist are used for ovarian stimulation (decrease of LH and low rising of oestradiol) do not affect follicular fluid hormonal concentrations. Therefore, GnRH antagonist could not negatively affect follicle or ovocitary quality.*

**Key words:** Follicular fluid. Hormonal concentrations. Ovarian stimulation. Pregnancy.

## INTRODUCCIÓN

La prevención del pico de LH durante la estimulación ovárica controlada en ciclos de FIV/ICSI se ha realizado clásicamente con fármacos agonistas de la GnRh, generalmente mediante el llamado protocolo largo. Con este protocolo se han descrito una serie de inconvenientes(1): Mayor duración del ciclo, posibilidad de administración del agonista de la GnRh al inicio de la gestación, mantenimiento del cuerpo lúteo del ciclo previo a la estimulación, síntomas de privación hormonal, peor respuesta en bajas respondedoras, mayor gasto en gonadotropinas, la inducción de la ovulación sólo es posible mediante inyección de HCG, etc...

La introducción de los protocolos de estimulación ovárica mediante antagonistas de la GnRh pretendió eliminar algunos de dichos inconvenientes. Así el uso de antagonistas de la GnRh en técnicas de reproducción asistida simplifica y acorta la estimulación ovárica, disminuye el riesgo de hiperestimulación ovárica y disminuye el gasto en gonadotropinas. Sin embargo, las tasas de gestación obtenidas son menores que con el uso de agonistas.(2) Esta disminución de las gestaciones se ha achacado a un manejo inadecuado del antagonista debido a la corta experiencia en el uso del mismo, pero también se ha descrito que la drástica caída de la LH tras administrar el fármaco puede afectar al funcionamiento de las células de la granulosa, lo que justificaría la caída del estradiol sérico que se produce en muchas ocasiones (3, 4).

Una de las posibilidades para intentar estudiar el correcto funcionamiento de las células de la granulosa es analizar el líquido folicular. El líquido folicular es un complejo compartimento funcional en el que se integran distintas señales, endocrinas, inmunológicas y mitógenas. Durante la maduración folicular, se desarrolla un aumento del volumen de líquido folicular, así como de los niveles hormonales intrafolliculares,

elaborando un microambiente adecuado para el crecimiento y la maduración del ovocito (5). Diversos estudios han identificado los niveles hormonales en líquido folicular de estradiol, progesterona, prolactina, así como de otras sustancias, como marcadores potenciales de la calidad ovocitaria.(5-8) relacionándolos con las tasas de gestación (9-12). Así, se encuentran diferencias en los niveles hormonales en función de que los ovocitos asociados sean o no fecundados in vitro tras ciclos de estimulación.

Los niveles de estradiol en el líquido folicular se relacionan con la calidad global del folículo relacionándose su concentración con el número de células de la granulosa. Por su parte, los niveles de progesterona se relacionan con la madurez del ovocito y con el grado de luteinización del folículo. También los niveles de andrógenos se han usado como parámetro de calidad ovocitaria encontrando que los niveles de testosterona se encuentran significativamente disminuidos en el líquido folicular cuyos ovocitos se fecundaron.

El objetivo de este estudio es determinar si existen diferencias en las concentraciones hormonales de los líquidos foliculares obtenidos tras utilizar dos protocolos de estimulación (análogo largo vs antagonista).

Analizar la relación de dichos niveles hormonales con la obtención del embarazo.

## MATERIAL Y MÉTODO

Entre Mayo y Diciembre de 2005, se seleccionaron de forma prospectiva y aleatorizada 150 pacientes del programa de Reproducción Asistida de la Unidad de Reproducción del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" de Granada que se sometieron a FIV/ICSI.

Setenta y cinco pacientes fueron asignadas al protocolo largo de estimulación con agonistas de la GnRh y otras 75 utilizaron el protocolo de antagonistas de la GnRh.

Se incluyeron pacientes menores de 40 años con esterilidad primaria que se sometían a un primer ciclo de reproducción asistida.

En el protocolo de análogo largo, se inició la estimulación cuando se evidenció reposo ovárico establecido por la ausencia ecográfica de folículos mayores de 10mm en los ovarios. Las dosis de FSH fueron de 300UI los dos primeros días y 150 UI el resto, realizando un primer control ecográfico el día 7º, partir del cual se individualizaba la administración de FSH.

En el protocolo de Antagonista se inició la estimulación el 2º día de un ciclo espontáneo o inducido con anticonceptivos. Se usó la misma pauta de estimulación que en el otro grupo 300 UI de FSH los dos primeros días y 150 UI el resto. El antagonista se iniciaba cuando el folículo mayor medía 14 mm. de diámetro medio y se mantenía hasta el día previo a la administración de HCG. En todos los casos se administró 10000 U.I. de HCG recombinante cuando se observaban más de tres folículos mayores de 18 mm, realizando la punción folicular a las 35-37 horas. La gonadotropina utilizada en todos los casos fue FSH recombinante.

Una vez obtenidos los líquidos foliculares, se seleccionaron aquellos que contenían un complejo cúmulo corona ovocito y que se consideraron claros (sin contaminación sanguínea). Una vez aislado el ovocito, se realizó un pool de líquidos de cada paciente, se centrifugó (400g) en el laboratorio durante 10 minutos, con el objetivo de decantar el sobrenadante eliminando el contenido celular. Los líquidos foliculares fueron congelados a -80 ° C hasta la determinación hormonal. Para dicho análisis hormonal se utilizaron kits comerciales (Roche/Hitachi modular E-170 system, Madrid, España) determinándose en cada paciente la concentración de: estrógenos, progesterona, testosterona, FSH, LH y prolactina.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el procesador estadístico SPSS 13.0

## RESULTADOS

La edad media de las pacientes seleccionadas era de 33,1 años. La etiología de la esterilidad fue similar en ambos grupos, encontrando que la causa más frecuente fue el factor masculino (53,1% de los casos) seguido de la esterilidad sin causa aparente (24,1%) y la existencia de factor tubárico (19,6%), no encon-

trando diferencias significativas entre ambos grupos de estudio.

Los ciclos puncionados y los líquidos obtenidos en función del protocolo seguido se describen en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Ciclos puncionados y líquidos obtenidos en función del protocolo utilizado*

<b>N: 150</b>	<b>Agonistas</b>	<b>Antagonistas</b>
Ciclos	75	75
Punciones	70	65
Líquidos claros	53	38

Las principales variables clínicas, relativas a la estimulación y de laboratorio obtenidas con ambos protocolos de estimulación se reflejan en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2**

*Variables clínicas en función del protocolo de estimulación usado*

VARIABLES CLÍNICAS	AGONISTAS (n=75)	ANTAGONISTAS (n=75)
Edad (años)	33,2 ± 4,1 (18-40)	32,6 ± 3,8 (22-40)
Días estimulación (ciclos no cancelados)	11,4 ± 2,2 (5-18)	10,0 ± 2,3 * (4 -16)
Nº folículos >17 mm (ciclos no cancelados)	6,4 ± 3,1 (1-16)	6,2 ± 3,3 (1-16)
Dosis total FSHr (UI) (ciclos no cancelados)	2619,4 ± 1278,4 (800 - 6900)	2402,5 ± 1548,4 (850 - 6300)
Estradiol sérico (día hCG) pg/mL (ciclos no cancelados)	2497,7 ± 1731,0 (459 - 6929)	1468,2 ± 1540,5 (417 - 6830)
LHr ampollas	12,6 ± 6,8 (2 -31) n=46	11,0 ± 6,8 (2 - 32) n=50
Dosis tres primeros días (FSHr)	743,6 ± 201,5 (450-1350)	774,4 ± 196,5 (450-1450)
*p<0,001		

El estudio de los líquidos foliculares claros en ambos grupos, no halló diferencias estadísticamente significativas en las variables clínicas, de laboratorio y de resultado analizadas (Tabla 4).

Al realizar el estudio comparativo entre los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular procedentes de pacientes sometidas a DFM con protocolo de agonista largo para ICSI y en líquido folicular de pacientes sometidas igualmente a DFM para ICSI con protocolo de antagonista, no se encuentran dife-

**Tabla 3**  
*Variables de laboratorio en función del protocolo de estimulación usado*

VARIABLES LABORATORIO		AGONISTAS	ANTAGONISTAS
Nº ciclos puncionados		70	65
Nº ciclos con transferencia		72,7% (101/139)	63,0% (85/135)
Nº ovocitos por punción		8,9 ± 4,9 (1-32)	8,2 ± 4,1 (1 -19)
% ovocitos metafase II		78,3 ± 23,0 (20-100)	77,2 ± 23,6 (20-100)
% ovocitos fecundados/ ovocitos microinyectados		69,0 ± 32,7 (0 -100)	65,0 ± 36,5 (0 -100)
Tasa de punciones con fallo total de fecundación		14,4% (17/118)	23,4% (26/111)
% emb calidad	(tipo I)	29,2% (73/250)	35,9% (83/231)
	(tipo II)	10,8% (27/250)	9,1% (21/231)
% emb >4 células		74,7% (186/250)	72,7% (168/231)
% transferencia tras punción		85,6% (101/118)	76,6% (85/111)
Nº embriones por transferencia		2,1 ± 1,0 (1-3)	2,0 ± 1,1 (1-3)
% embriones no transferidos con desarrollo hasta blastocisto		14,7% (5/34)	14,3% (6/42)
N.S.			

**Tabla 4**

*Variables clínicas, de laboratorio y resultados de los ciclos de pacientes tratadas con agonistas y antagonistas cuyos líquidos foliculares claros fueron analizados*

VARIABLES CLÍNICAS, DE LABORATORIO Y RESULTADOS	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
Líquido folicular claro (LFC)	53	38
Edad (años)	33 ± 4,8 (18 - 40)	32,4 ± 3,6 (22 - 39)
Días de estimulación	11,6 ± 2,1 (7 -18)	10,8 ± 1,8 (8 -14)
Dosis total FSHr (UI)	2546,9 ± 1304,4 (1137 - 6900)	2612,8 ± 2223,3 (1000 -14625)
Estradiol sérico (día de hCG) pg/ml	2071 ± 2053 (459 - 6356)	1830 ± 1391,7 (214 - 6136)
N.S		

rencias significativas en ninguna de las hormonas evaluadas. Estradiol, progesterona, testosterona, ofrecen unos niveles en líquido folicular muy semejantes en ambos grupos de pacientes. Igualmente, los rangos de valores máximos y mínimos para cada hormona

**Tabla 5**

*Niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre protocolo con agonista largo y antagonista*

HORMONAS ESTEROIDEAS	AGONISTA (n=53)	ANTAGONISTA (n=38)
Estradiol pg/mL	554.763 ± 326.778 (76.200 - 1.431.200)	445.357 ± 245.010 (5.496 - 1.462.000)
Progesterona ng/mL	12.992±4.622 (1.424-28.040)	12.502±4.927 (826-22.124)
Testosterona ng/mL	5,2 ± 1,5 (1,8-12,4)	5,1 ± 1,1 (2,6-9,0)
N.S		

también son similares entre ambos grupos de pacientes (Tabla 5).

No se hallaron diferencias al comparar los niveles

**Tabla 6**

*Niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación en función del resultado final (embarazo o no).*

*Protocolo con agonistas de la GnRH*

HORMONAS ESTEROIDEAS	Gestaciones (n=15)	No gestaciones (n=38)
Estradiol pg/mL	494.334 ± 299.552 (95240 - 1181600)	577.629 ± 337.566 (76200 - 1431200)
Progesterona ng/mL	13.517 ± 4.620 (2700-21180)	12.794 ± 4.671 (1424-28040)
Testosterona ng/mL	(3,8 - 7,6) 5,0 ± 1,0	5,2 ± 1,7 (1,8 - 12,4)
N.S		

**Tabla 7**

*Niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación en función del resultado final (embarazo o no).*

*Protocolo con antagonistas de la GnRH*

HORMONAS ESTEROIDEAS	Gestaciones (n=6)	No gestaciones (n=32)
Estradiol pg/mL	431.960 ± 208.392 (289520 - 446520)	438.466 ± 263.403 (5496 - 1462000)
Progesterona ng/mL	11.591 ± 5.351 (4612- 19280)	12.573 ± 5.200 (816- 22124)
Testosterona ng/mL	4,2 ± 1,2 (2,6 -5,3)	5,4 ± 1,0 (4,0 - 9,0)
N.S		

de dichas hormonas en función de si se consiguió embarazo o no para cada uno de los grupos de estudio (Tablas 6 y 7).

Tampoco encontramos diferencias significativas al comparar los niveles de distintas hormonas proteicas en el líquido folicular en función del protocolo de estimulación usado (protocolo de agonista largo o protocolo de antagonistas) o del resultado final obtenido (embarazo o no) (Tablas 8, 9 y 10). FSH y LH presentan en ambos grupos de pacientes niveles en LF comparables tanto en sus valores medios como en los rangos de máximos y mínimos.

**Tabla 8**

*Niveles de hormonas proteicas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre agonistas y antagonistas.*

HORMONAS PROTEICAS en LF	AGONISTAS (n=53)	ANTAGONISTAS (n=38)
FSH mUI/mL	4,4 ± 3,6 (0,5 - 1 5,1)	3,7 ± 2,4 (0,8 - 10,3)
LH mUI/mL	0,2 ± 0,2 (0,1 - 1,6)	0,5 ± 0,5 (0,1 - 2,1)
PRL ng/mL	55,9 ± 25,9 (22,5 - 144,8)	44,4 ± 15,0 (22,5 - 93,5)
N.S.		

**Tabla 9**

*Niveles de hormonas proteicas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no). Protocolo con agonistas de la GnRH*

HORMONAS PROTEÍCAS	Gestaciones (n=15)	No gestaciones (n=38)
FSH mUI/mL	5,7 ± 5,5 (1,5 - 14,5)	4,0 ± 3,4 (0,5 - 15,1)
LH mUI/mL	0,2 ± 0,1 (0,1-0,5)	0,2 ± 0,2 (0,1-1,6)
PRL Ng/mL	53,0 ± 29,1 (29,0)-136,4)	57,1 ± 24,8 (22,5-144,8)
N.S		

**Tabla 10**

*Niveles de hormonas proteicas en líquido folicular de ciclos de DFM. Comparación entre ambos protocolos de estimulación y resultado final (embarazo o no). Antagonista*

HORMONAS PROTEÍCAS	Gestaciones (n=15)	No gestaciones (n=32)
FSH mUI/mL	2,8±1,9 (1,1 - 6,6)	4,0±2,6 (0,8 - 10,3)
LH mUI/mL	0,8 ± 0,4 (0,2-1,5)	0,4 ± 0,4 (0,1-2,1)
PRL ng/mL	44,0 ± 15,1 (25,2-70,4)	44,0 ± 15,2 (22,5-93,4)
N.S		

## DISCUSIÓN

En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias en las concentraciones hormonales en los líquidos foliculares obtenidos de ciclos estimulados con agonistas o antagonistas. Tampoco hemos hallado diferencias en el análisis de dicho líquido entre pacientes que quedaron gestantes vs no embarazadas, independientemente del protocolo de estimulación aplicado. Esta circunstancia nos hace pensar que los cambios séricos (disminución de LH, estancamiento del estradiol) que acontecen en los ciclos de antagonista no repercuten sobre los niveles de hormonas a nivel folicular, por lo que cabe la posibilidad que la utilización de dichos fármacos no repercuta de forma negativa ni sobre el folículo, ni sobre la calidad ovocitaria.

En programas de donación de ovocitos, los resultados obtenidos con embriones provenientes de ciclos de antagonista son similares a los obtenidos cuando los ovocitos provienen de ciclos de agonista (13). El hecho de que, embriones que se han obtenido tras el uso de antagonistas de la GnRH durante la estimulación, al ser trasferidos a endometrios formados mediante terapia hormonal sustitutiva no modifiquen las tasas de gestación en receptoras de ovocitos, debe hacernos pensar que, quizá, en el resto de las pacientes, las alteraciones séricas que este tipo de fármacos produce o el fármaco por si mismo actúan de forma deletérea sobre el endometrio y ésta sea la causa de la menor tasa de gestación existente. Los estudios publicados hasta ahora muestran resultados contradictorios. Así Kolibianakis y colaboradores (2002) (14) en un estudio prospectivo encuentran un mayor grado de madurez histológica endometrial en el momento de la punción ovárica cuanto más tarde se añade el antagonista durante el protocolo de hiperestimulación ovárica controlada. Por el contrario Saadat y colaboradores (2004) (15) no encuentran diferencia alguna en la madurez endometrial en el momento de la punción ovárica entre dos grupos de donantes en cuya hiperestimulación ovárica controlada se usaron agonistas o antagonistas de la GnRh. Deben plantearse nuevos estudios de receptividad endometrial que aclaren la influencia del antagonista sobre el endometrio.

La comentada disminución de LH a nivel periférico que provocan los antagonistas podría traducirse en unos niveles inferiores de PG a nivel folicular en pacientes tratadas con estos fármacos. Nuestros resultados no avalan éste hecho por lo que, como han sugerido otros autores (16), la producción de progesterona por las células de la granulosa tras la administración

de hCG podría no depender de los niveles previos de LH.

En una reciente revisión Cochrane publicada (17), la adición de LH a los protocolos de estimulación no ha demostrado aumentar la tasa de embarazo en FIV/ICSI. Esta conclusión se repite al analizar específicamente el subgrupo en el que la estimulación se realizó con antagonistas de la GnRH. Lo cual parece sugerir que la mencionada disminución de LH no modifica negativamente las tasas de embarazo.

García Velasco y cols (2001)(12) en un ensayo clínico aleatorizado con 19 y 25 casos en cada grupo, encuentran menor concentración de estradiol sérico y folicular en un grupo tratado con antagonistas de la GnRH frente al tratado con agonistas de la GnRh. Nuestro estudio con una mayor potencia (el doble de casos) no haya esas diferencias. Encontramos dos diferencias fundamentales entre nuestro estudio y el de estos autores: Nuestras cohortes recibieron igual dosis de FSH al inicio de la estimulación mientras que, en el estudio comentado, el grupo de antagonistas de la GnRH recibió inicialmente menos dosis, lo cual, como señala Blumenfeld (18), se puede relacionar con la concentración de estradiol folicular y podría condicionar la diferencia en concentración de estradiol en líquido folicular hallada en dicho trabajo. Al analizar el resto de resultados obtenidos en nuestro estudio observamos como éstos son superponibles a los hallados en el de 2004 excepto en el número de ovocitos recuperados en el grupo tratado con análogos de la GnRH donde dicho número duplica llamativamente al que nosotros recuperamos, existiendo una gran disparidad con el valor de la misma variable en el grupo de antagonistas de la GnRh. Es el valor de estradiol sérico y folicular de esta cohorte el que difiere sustancialmente del que nosotros obtenemos y permite a los autores encontrar diferencias significativas. Esto, probablemente pasó por que esa cohorte no tenía las mismas características basales que la otra del estudio. Probablemente el pool de líquido folicular obtenido tras una estimulación que ha desarrollado de media 16 ovocitos tenga concentraciones de estradiol mayores reflejando el microambiente folicular existente.

Podemos concluir que, con los fármacos antagonistas del GnRh obtenemos una menor tasa de gestaciones clínicas, si bien no parece que la causa se encuentre a nivel del complejo foliculo-ovocito. Por otro lado los niveles de hormonas a nivel folicular no son predictivas de la posibilidad de embarazo en estas pacientes. Futuros estudios, probablemente a nivel endometrial, deben realizarse para aclarar la menor tasa de gestaciones que se obtienen con estos fármacos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Felberbaum RE, Ludwig M, Diedrich K.:** Clinical application of GnRH-antagonists. *Mol Cell Endocrinol.* 2000, 15;166: 9-14, Review.
2. **Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M.:** Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 19: 3.
3. **Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V.:** GnRH agonist versus GnRH antagonist in poor ovarian responders: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2006; 13: 618-27.
4. **Ludwig M, Felberbaum R, Albano C, Smitz J.:** Plasma and follicular fluid concentrations of GNRH antagonist Cetrorelix after multiple application of different doses for the hormonal stimulation in IVF. Paper presented in the 14th Annual Meeting of ESHRE-Goteborg. *Human Reprod.* 1998. Vol. 13. Abstr. book I. No.: 76.
5. **Tarlatzis BC, Pazaitou K, Bontis J, Papadimas J, Lagos S, Sapanos E, Mantalenakis S.:** Growth hormone, estradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993; 8: 1612-1616.
6. **Botero-Ruiz W, Laufer N, De Cherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR.:** The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1984; 41: 820-826.
7. **Fishel SB, Edwards RG, Walters DE.:** Follicular steroids as prognosticators of successful fertilization of human oocytes in vitro. *J Endocrinol* 1983; 99: 335-339.
8. **Laufer N, Botero-Ruiz W, De Cherney AH, Haseltine F, Polan ML, Behrman RH.:** Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human oocytes successfully fertilized in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 54: 430-435.
9. **Lin PC, Abdallah MA, Eblen AC, Nakajima ST.:** Serum and follicular fluid levels during ovulation induction. *Fertil Steril* 2002; 77: 635-637.
10. **Jimena P, Castilla JA, Peran F, Ramirez JP, Vergara F Jr, Molina R, Vergara F, Herruzo A.:** Adrenal hormones in human follicular fluid. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1992; 127: 403-6.
11. **Jimena P, Castilla JA, Peran F, Molina R, Ramirez JP, Acebal M, Vergara F, Herruzo A.:** Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. *J Reprod Fertil.* 1992; 96: 641-7.
12. **Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazabal A, Remohi J, Simon C, Pellicer A.:** Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetrorelix). *Hum Reprod.* 2001; 16: 2533-9.
13. **Bodri D, Vernaeva V, Guillen JJ, Vidal R, Figueras F, Coll O.:** Comparison between a GnRH antagonist and a GnRH agonist flare-up protocol in oocyte donors: a randomized clinical trial. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2246-51.
14. **Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, Devroey P.:** Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril.* 2002; 78: 1025-9.
15. **Saadat P, Boostanfar R, Slater CC, Tourgeman DE, Stanczyk FZ, Paulson RJ.:** Accelerated endometrial maturation in the luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation: impact of gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists. *Fertil Steril.* 2004; 82: 167-71.
16. **Venetis CA, Kolibianakis EM, Papanikolaou E, Bontis J, Devroey P, Tarlatzis BC.:** Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2007; 13: 343-55.
17. **Mochtar MH, Van der Veen, Ziech M, van Wely M.:** Hormona luteinizante recombinante (rLH) para la hiperestimulación ovárica controlada en ciclos de reproducción asistida (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd.
18. **Blumenfeld Z.:** Confirmation needed for follicular fluid estradiol levels in different ovarian stimulation protocols. *Hum Reprod.* 2002 Jun; 17(6): 1671; author reply 1671.