

# 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 Steinmetz, Managing Editor  
*Fertility and Sterility* Editorial Office  
American Society for Reproductive  
Medicine

1209 Montgomery Highway  
Birmingham, AL 35216-2609  
Tel 205-978-5000

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

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

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)



*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)

## **Elevada tasa de gestación tras la descongelación de ovocitos con dos pronucleos y cultivo prolongado hasta estadio de blastocisto**

### *High ongoing pregnancy rates after deferred transfer through bipronuclear oocyte cryopreservation and post-thaw extended culture*

Bruce S. Shapiro MD<sup>a,b</sup>, Said T. Daneshmand MD<sup>a,b</sup>, Forest C. Garner MSc<sup>a,b</sup>, Martha Aguirre PhD<sup>a</sup>, Cynthia Hudson MSc<sup>a</sup>, and Shyni Thomas BSc<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fertility Center of Las Vegas and <sup>b</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Nevada School of Medicine, Las Vegas, Nevada.

#### **Resumen**

**Objetivo:** Valoración de las tasas de éxito tras la congelación-descongelación de cigotos (2PN), cultivo prolongado y transferencia de blastocitos.

**Diseño:** Estudio retrospectivo.

**Lugar:** Centro privado de fertilidad.

**Paciente(s):** Se realizaron 48 transferencias de blastocitos tras cultivo prolongado post-descongelación en pacientes menores de 35 años y 43 transferencias de características similares en pacientes de 35-40 años.

**Intervención(es):** Las pacientes optaron por la criopreservación de toda su cohorte en el estadio 2PN. Una vez descongelados los cigotos fueron cultivados hasta blastocito, estadio en que tuvo lugar la transferencia.

**Resultado(s) Principal(es) Medido(s):** Implantación, embarazo en curso.

**Resultado(s):** En pacientes menores de 35 años, se realizaron 59 descongelaciones de ovocitos 2PN con 48 transferencias de blastocitos y 40 embarazos en curso (79,2% por transferencia). La tasa de implantación fue del 64,2% y la tasa de embarazo en curso por descongelación fue de 64,4%. En pacientes 35-40 años, se realizaron 58 descongelaciones con 43 transferencias de blastocitos y 22 embarazos en curso (51,2% por transferencia). La tasa de implantación en este grupo fue del 44,0%, y la tasa de embarazo en curso por descongelación fue de 39,3%. Pacientes menores de 35 años tuvieron tasas significativamente mayores de implantación y embarazo en curso que los pacientes de 35-40 años de edad. Los pacientes con 12 o más ovocitos 2PN tuvieron significativamente mayor tasa de embarazo en curso que los que tuvieron menos de 12 ovocitos 2PN.

**Conclusión(es):** El cultivo prolongado post-descongelación y la transferencia de blastocitos proporcionan tasas elevadas de implantación y embarazo en curso. La tasa de embarazo en curso disminuye con la edad. (Fertil Steril® 2009; 92:1594-9. ©2009 por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva).

**Palabras clave:** Criopreservación de embriones. FIV. Receptividad endometrial. Transferencia de blastocito. Cultivo prolongado.

## Summary

**Objective:** *To describe success rates with bipronuclear (2PN) oocyte cryopreservation, followed by thaw, extended culture, and blastocyst transfer.*

**Design:** *Retrospective study.*

**Setting:** *Private fertility center.*

**Patient(s):** *There were 48 blastocyst transfers after post-thaw extended culture in patients less than 35 years old and 43 transfers in patients 35-40 years old.*

**Intervention(s):** *Patients opted for cryopreservation of their entire cohorts at the 2PN stage. Thawed 2PN oocytes were cultured to the blastocyst stage before transfer.*

**Main Outcome Measure(s):** *Implantation, ongoing pregnancy.*

**Result(s):** *Among patients less than 35 years old at oocyte retrieval, there were 59 thaws of 2PN oocytes, 48 blastocyst transfers, and 40 ongoing pregnancies (79.2% per transfer), the implantation rate was 64.2%, and the ongoing pregnancy rate (PR) per thaw was 64.4%. Among patients 35-40 years of age at retrieval, there were 58 thaws, 43 blastocyst transfers, and 22 ongoing pregnancies (51.2% per transfer), the implantation rate was 44.0%, and the ongoing PR per thaw was 39.3%. Patients less than 35 years old had significantly greater rates of implantation and ongoing pregnancy than did patients 35-40 years of age. Patients with 12 or more 2PN oocytes had significantly greater rate of ongoing pregnancy than those with fewer than 12 2PN oocytes.*

**Conclusion(s):** *Post-thaw extended culture and blastocyst transfer yield high rates of implantation and ongoing pregnancy. Ongoing PRs decline with increasing age. (Fertil Steril® 2009; 92: 1594-9. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Key words:** Embryo cryopreservation. IVF. Endometrial receptivity. Blastocyst transfer. Extended culture.

La mayor parte de los embriones obtenidos y transferidos en los ciclos de fecundación in vitro con ovocitos frescos no dan lugar a fetos viables (1), a pesar de los esfuerzos por identificar y transferir los mejores embriones, desde el punto de vista morfológico, de los que se dispone. Los ciclos de donación de ovocitos frescos se asocian con mayores tasas de embarazo que las obtenidas tras cualquier tipo de ciclo de fecundación in vitro (1, 2). Estos ciclos originan embriones óptimos que son transferidos a un endometrio, artificialmente preparado en ausencia de niveles suprafisiológicos de hormonas, típico de ciclos autólogos en fresco tras hiperestimulación ovárica controlada (HOC).

En los estudios con ciclos de ovocitos compartidos, en la que los ovocitos de las donantes fueron compartidos entre las receptoras y donantes, se encontraron tasas de embarazo significativamente mayores en las receptoras que en las donantes de ovocitos, a pesar de que la fuente de ovocitos era la misma (3, 4). El empleo de ovocitos compartidos eliminó posibles dudas sobre el efecto de los ovocitos, por tanto la mejora en las tasas de implantación y emba-

razo era debida a una mejora en la receptividad del endometrio, en ausencia de HOC, en las receptoras.

Aunque la HOC se utiliza habitualmente para reclutar múltiples folículos en FIV, se asocia con una alteración en la receptividad del endometrio (4-12). Se han postulado diversos factores que pueden contribuir a la disminución de receptividad. Existe un estudio que asegura que la HOC proporciona tejido endometrial histológicamente avanzado, bioquímicamente diferente y genómicamente alterado (12).

Un mecanismo para la disminución de la receptividad es el potencial de la HOC para inducir el desarrollo de endometrio, dando lugar a la asincronía entre el embrión y el endometrio (13-17). Factores relacionados con la asincronía entre el embrión y el endometrio serían altamente predictivos de los resultados en ciclos de FIV autólogos en fresco (15). Un endometrio más desarrollado parece sesgar los ciclos autólogos hacia una implantación selectiva de los embriones de desarrollo más rápido (13-15).

En 2006 se observó que la implantación, embarazo y las tasas de nacidos vivos en nuestros ciclos de transferencia de embriones congelados eran mayores

que las logradadas en nuestros ciclos autólogos frescos en pacientes < 40 años (1). Con esa referencia, ofrecemos a nuestras pacientes la opción de criopreservar su cohorte embrionaria completa.

Pese a la publicación previa de altas tasas de embarazo con nuestros blastocitos criopreservados (14), la evaluación post descongelación de aquellos blastocitos se habís limitado a < 90 minutos, período relativamente corto de tiempo para evaluar criopresevación y daños de descongelación. Específicamente, fue difícil evaluar trofoectodermo, masa celular interna y potencial de desarrollo postdescongelación en los blastocitos descongelados, debido a su incompleta expansión y a la imposibilidad de evaluar con precisión el daño celular escondido tanto sutil como latente.

Recientemente se han publicado tasas elevadas de implantación y embarazo utilizando ovocitos bipronucleares (2PN) descongelados y cultivados hasta estadio de blastocito (18). Este cultivo prolongado postdescongelación nos proporciona un período más largo de observación en el laboratorio, permitiendo la evaluación de la morfología en la fase de blastocito y la observación del ritmo de desarrollo de los embriones, un conocido marcador de potencial de implantación en los ciclos autólogos en fresco (13-15). La calidad de la masa celular interna y trofoectodermo de un blastocito expandido, tras cultivo prolongado postdescongelación (PTEC), se evalúa mejor que en blastocitos no expandidos recién descongelados. Comparando con la evaluación de supervivencia, el desarrollo post-descongelación es una verificación más rigurosa de la ausencia de efectos perjudiciales significativos y de daño celular escondido, tanto sutil como latente. Esto permite un espectro de evaluación pretransferencia similar al de ciclos de donación de ovocitos en fresco.

Los blastocitos desarrollados a partir de ovocitos o embriones descongelados se pueden transferir a un ambiente uterino preparado artificialmente y reproducible. La preparación del endometrio sería idéntica a la de ciclos de donantes de ovocitos.

Este estudio evalúa la eficacia de la transferencia diferida a través de la criopreservación de toda la cohorte de ovocitos 2PN, seguido de PTEC, y la transferencia de blastocitos en un ambiente uterino preparado de manera uniforme y estandarizada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio incluyó a pacientes autólogos <41 años en el momento de la punción folicular, en los que se criopreservaron todos los ovocitos 2PN des-

pués de la punción. Los ciclos tuvieron lugar entre 2004 y 2008 de la siguiente manera: 1 ciclo en 2004, 1 ciclo en 2005, 21 ciclos en 2006, 69 ciclos en 2007 y 23 ciclos en el primer trimestre de 2008.

Los métodos para la HOC, obtención de los ovocitos, inseminación y

transferencia de blastocistos han sido descrito previamente (14). Todos los ovocitos 2PN criopreservados se inseminaron con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Los ovocitos fecundados correctamente fueron criopreservados en pajuelas de 0,25 ml de Francia con un control de congelación Criológico CL-5500 (Mulgrave, Victoria, Australia), utilizando una técnica de congelación lenta. La temperatura descendió de 0° C a -2° C/min, a continuación de -2,0° C a -1° C/min, y por último de -7,0° C a -0,3° C/min. Se mantuvieron a esta temperatura durante 10 minutos, y aproximadamente en la mitad de este período cada pajuela fue sellada tocando con las pinzas de frío. El enfriamiento se reanudó a -0,3° C/min hasta alcanzar una temperatura final de -32° C. Finalmente se procedió a sumergir todas las pajuelas en nitrógeno líquido. Los kits de Medios de Congelación de Embriones fueron obtenidos de Irving Scientific (Irvine Scientific, Santa Ana, CA).

Los ovocitos pronucleares criopreservados fueron descongelados a temperatura ambiente durante 20 minutos en medio de descongelación de embriones (Irvine Scientific). A continuación fueron cultivados en un medio Advantage Quinn Protein Plus Cleavage y posteriormente cultivados en un medio Advantage Quinn Protein Plus Blastocists (Sage, Trumbull, CT). Se transfirieron blastocitos expandidos en día 5 y día 6. Normalmente se transfirieron 2 blastocistos y los embriones sobrantes se criopreservaron tras la expansión completa. Las pacientes iniciaron E2 oral (Estrace 1,0 mg) 10-14 días antes de la descongelación y continuaron con E2 oral y parches epidérmicos (Vivelle Dot) a demanda para mantener los niveles de E2 sérico superiores a 200 pg/ml. Comenzaron con inyecciones de progesterona (100 mg/día) el día antes de la descongelación y pasaron a P oral y óvulos vaginales, a demanda para mantener niveles en suero iguales o superiores a 15 ng/mL. Los suplementos continuaron tras confirmación de embarazo hasta que la producción de la placenta fuera suficiente, alrededor de las 10 semanas de gestación. El embarazo se confirmó mediante niveles de hCG en suero superiores a 5 UI/L a los diez días de la transferencia. El embarazo clínico se confirmó mediante movimiento cardíaco fetal intrauterino a las 7 semanas de gestación. Se definió como embarazo en curso la confirmación

de movimiento cardíaco fetal intrauterino a las 10 semanas de gestación. Las pérdidas tempranas de embarazo incluyeron los embarazos que no evolucionaron a embarazos en curso desde el primer resultado de hCG positiva.

Se utilizó el test de Wilcoxon para comparar variables numéricas (edad, número de embriones transferidos). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para probar los efectos de las variables nominales (embarazo). Todas las pruebas fueron bilaterales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con JMP 5.01a (SAS Institute, Cary, NC).

Al tratarse de un estudio retrospectivo, no hubo asignación al azar dentro de cualquier población específica. Noventa y una pacientes tenían luteinización prematura (P sérica > 1,0 ng/ml en el día de la ovulación) en su ciclo de estimulación ovárica y 43 pacientes tenían fallo previo de implantación en los ciclos en fresco (algunas tenían luteinización prematura y fallo previo de implantación). En una de las primeras pacientes incluídas en el estudio se criopreservaron los embriones debido a una enfermedad que imposibilitaba la transferencia embrionaria. La opción de criopreservar cohortes enteras fue de mutuo acuerdo entre los médicos y los pacientes, y nunca fue requerido criterio específico. No se establecieron criterios relacionados con las pacientes y basados en el rendimiento de ovocitos. El estudio incluyó a pacientes con tan sólo un ovocito.

Se obtuvo la aprobación del Comité ético institucional (IRB) para realizar el estudio retrospectivo.

## RESULTADOS

La Tabla 1 es un breve resumen de los 115 ciclos autólogos en los que se descongeló en su totalidad la cohorte de ovocitos 2 PN. De estas descongelaciones se obtuvieron 24 cancelaciones por ausencia de desarrollo hasta blastocito y 91 ciclos con transferencia de blastocitos. Se transfirieron 186 blastocitos que dieron lugar a 77 embarazos, 101 latidos cardíacos fetales y 60 embarazos en curso. En la Tabla 2 se presentan las características de las pacientes y los parámetros de estudio comparados por edades. En las pacientes < 35 años se obtuvieron significativamente más folículos antrales, ovocitos en punción, ovocitos metafase II, y ovocitos 2PN que en pacientes de 35-40 años de edad. Sin embargo, las tasas de supervivencia y las tasas de blastulación (por ovocito 2PN descongelado) fueron similares entre los dos grupos de edad.

Los resultados tras la transferencia embrionaria se presentan en la Tabla 3. Pacientes menores de 35 años de edad tuvieron una tasa de embarazo en curso de 79,2% por transferencia (95% intervalo de confianza [CI]: 65,6% - 88,5%). Las pacientes de 35-40 años de edad tuvieron una tasa de embarazo en curso de 51,2% por transferencia (95% CI, 36,8% - 65,4%). Pacientes < 35 años obtuvieron tasas significativamente mayores de embarazo, implantación y embarazo en curso que pacientes con 35-40 años de edad. No se confirmó ningún embarazo ectópico. Los 95 blastocitos transferidos en pacientes < 35 años de edad dieron lugar a 67 sacos de gestación intrauterina. Hubo 61 confirmaciones de movimiento cardíaco fetal por ecografía, lo que se corresponde con un 64,2% de tasa de implantación. No se observaron gemelos monocigotos en este grupo de edad. En estos pacientes se obtuvieron 22 embarazos únicos, 18 mellizos y 1 triple.

Los 91 blastocitos transferidos en pacientes de 35-40 años resultaron en 47 sacos de gestación intrauterina. Hubo 40 confirmaciones de movimiento cardíaco fetal por ecografía, lo que se corresponde con una tasa de implantación del 44,0%. En este grupo de edad se observaron tres gemelos monocigóticos. Al corregir los datos por los gemelos monocigóticos, en 37 de los embriones transferidos se confirmó movimiento cardíaco fetal (con uno o dos latidos cardíacos fetales detectados), proporcionando una tasa de implantación corregida de 40,7%. En estas pacientes se obtuvieron 17 embarazos únicos, 7 dobles y 3 triples. Dos de los embarazos triples resultaron ser de gemelos monocigóticos. Las tasas de embarazo en curso también se relacionaron con el número de ovo-

**Tabla 1**

*Breve resumen de ciclos y resultados*

2PN descongelación de ovocitos	115
Edad del paciente en la recuperación de ovocitos (y)	33,8±4,4
Transferencias de blastocitos	91
Tasa de cancelación	20,9%
Media blastocitos transferidos	2,04±0,59
Tasa de embarazo <sup>a</sup>	84,6%
Tasa de implantación <sup>b</sup>	54,3%
Tasa de embarazo en curso <sup>a</sup>	65,9%

Nota: Los valores son medias ± 1 SD.

<sup>a</sup>Por transferencia.

<sup>b</sup>Por transferencia de embrión.

*Shapiro. Post-thaw extended culture. Fertil Steril 2009.*

**Tabla 2**  
Paciente y características del ciclo por grupo de edad

	Edad < 35	Edad 35-40	valor P
2PN descongelación de ovocitos	59	56	
Edad del paciente (y) <sup>a</sup>	30,4±3,2	37,5±1,8	<.0001
Día 3 niveles de FSH (IU/I)	6,8 ± 2,0	7,8 ± 2,9	.1071
Recuento folículo antral	20,8 ±11,2	13,4 ± 6,7	<.0001
Ovocitos recuperados <sup>a</sup>	19,6 ± 10,5	16,3 ± 9,8	.0415
MII ovocitos recuperados <sup>a</sup>	15,1 ± 8,6	12,3 ± 7,1	.0425
2PN ovocitos congelados <sup>a</sup>	13,0 ± 7,3	10,4 ± 6,5	.0110
2PN ovocitos descongelados	766	580	
Tasa de supervivencia (%)	85,0	87,9	.1291
Blastocistos formados	165	118	
Blastocistos por 2PN (%)	21,5	20,3	.6365

Nota: Los valores son medias ± 1 SD.  
 MII = Metafase II.  
<sup>a</sup>En el ciclo de recuperación de ovocitos  
*Shapiro. Post-thaw extended culture. Fertil Steril 2009.*

**Tabla 3**  
Resultado de la transferencia de blastocistos, comparación por grupos de edad

	Edad < 35	Edad 35-40	Valor P
Transferencias de blastocistos	48	43	
Tasa de cancelación (%)	18,6	23,2	.6479
Embriones transferidos	95	91	
Media de embriones transferidos	1,98 ± 0,48	2,12 ± 0,70	.3125
Latido cardíaco fetal	61	40	
Tasa de implantación (%) <sup>a</sup>	64,2	44,0	.0079
Tasa de implantación (corregido) (%) <sup>a,b</sup>	64,2	40,7	.0020
Embarazos	45	32	
Tasa de embarazo (%) <sup>c</sup>	93,8	74,4	.0178
Embarazos clínicos	41	27	
Tasa de embarazos clínicos (%) <sup>c</sup>	85,4	62,8	.0164
Embarazos en curso	38	22	
Embarazos en curso (%) <sup>c</sup>	79,2	51,2	.0075
Embarazos en curso (%) <sup>d</sup>	64,4	39,3	.0090
Pérdidas de embarazo prematuro	7	10	
Tasa de pérdida de embarazo precoz (%) <sup>e</sup>	15,6	31,3	.1623
Blastocistos supernumerarios	1,19 ± 1,92	0,63 ± 1,43	.1488

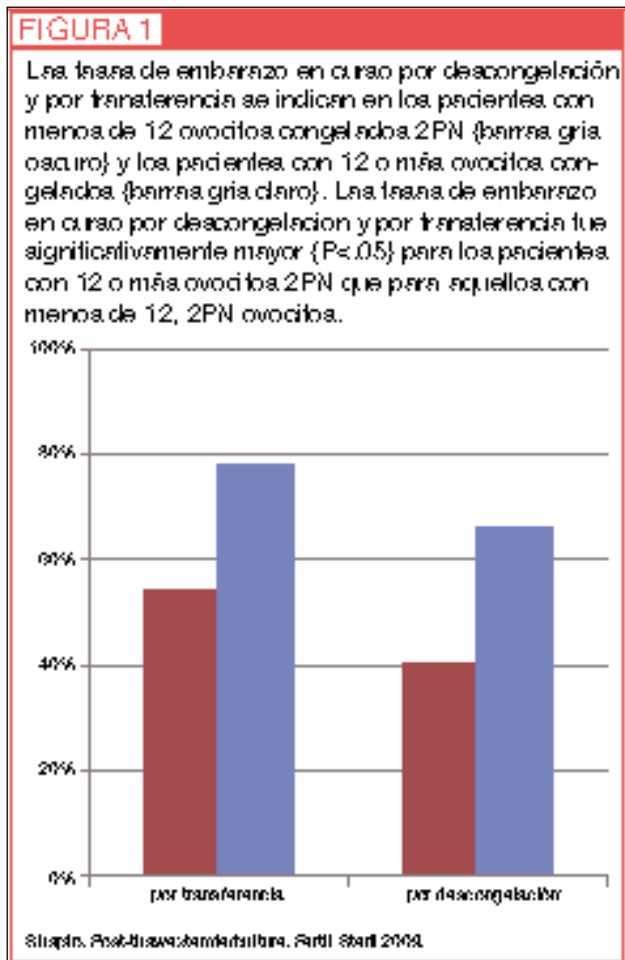
Nota: Los valores son medias ± 1 SD.  
<sup>a</sup>Por embrión transferido  
<sup>b</sup>Corregido por gemelos monocigóticos  
<sup>c</sup>Por transferencia de embriones  
<sup>d</sup>Por descongelamiento de cohorte completa.  
<sup>e</sup>Por embarazo.  
*Shapiro. Post-thaw extended culture. Fertil Steril 2009.*

citios 2PN disponibles (fig. 1). Entre los 62 pacientes con < 12 ovocitos 2PN congelados, 46 (74,2%) llegaron a transferencia de blastocistos y 25 obtuvieron embarazo en curso. De los 53 pacientes con 12 ovocitos 2PN congelados, 45 (84,9%) llegaron a transferencia de blastocisto y 35 obtuvieron embarazo en curso. Sin embargo, la tasa de embarazo en curso por descongelación fue de 40,3% en pacientes con < 12 ovocitos 2PN congelados y 66,0% en pacientes con 12 ovocitos 2PN, una diferencia que fue estadísticamente significativa (P=.0086). La tasa de embarazo en curso por transferencia fue de 54,4% en pacientes con < 12 ovocitos 2PN congelados y 77,8% en pacientes con 12 ovocitos 2PN, una diferencia que también fue estadísticamente significativa (P=.0266). Las tasas de cancelación en estos dos grupos no fue significativamente diferente (P=.1588).

### DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que el 79,2% de las transferencias de blastocisto dan lugar a embarazos en curso en pacientes autólogas de < 35 años de edad. La tasa de embarazo en curso por transferencia en pacientes de 35-40 años de edad fue de 51,2%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. Debido a la preparación previa del útero y que el ambiente uterino se mantiene constante entre los dos grupos de edad presentados en este estudio, cualquier diferencia en la tasa de embarazo se debe probablemente al efecto de la edad en la calidad de los embriones. Las edades expuestas se corresponden con la edad de las pacientes en el momento de la recuperación de los ovocitos, no de la descongelación posterior y ciclo de transferencia. Este estudio también demuestra que las pacientes con cohortes relativamente grandes de 12 ovocitos 2PN criopreservados tuvieron mayor tasa de embarazo en curso que aquellas de cohortes menores. Esto se debería al efecto de las grandes cohortes que originan un mayor número de blastocistos para seleccionar, y por lo tanto blastocistos más seleccionados para transferir. Un modelo multivariante describiría con más precisión la relación entre las variables independientes (incluyendo la edad del paciente, el tamaño de la cohorte y el embarazo en curso), pero necesitaría de un mayor conjunto de datos y por lo tanto se pospone para un estudio posterior.

Las tasas elevadas de implantación y embarazo en curso presentadas aquí sugieren que la transferencia diferida y PTEC son efectivas para eludir la receptividad endometrial comprometida en ciclos autólogos en fresco tras HOC (4-17). Este mismo grupo había pu-



blicado anteriormente una tasa de embarazo clínica disminuida en ciclos con luteinización prematura (15), definida como una P sérica < 1,0 ng/ml en el día de la inducción a la ovulación. Esto parece ser debido, al menos en parte, a la asincronía embrión-endometrio. Los métodos mostrados aquí parecen ser efectivos para eludir los efectos negativos de la estimulación ovárica en el endometrio. Se necesitan estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

La transferencia diferida y PTEC se presentan en este estudio como terapia primaria, en lugar de la habitual congelación de embriones supernumerarios tras la transferencia de embriones frescos. Puesto que aproximadamente uno de cada cinco pacientes no alcanzaron a obtener blastocistos viables para transferir, es importante considerar las tasas de éxito por descongelación con transferencia diferida. En pacientes menores de 35 años, un 64,4% (95% CI, 51,6%-75,4%) de sus 2 PN descongelados resultaron en embarazo en curso. Sin embargo en pacientes de 35-40 años de edad, un 39,3% (95% CI, 29,3%-50,3%) de



sus descongelados resultaron en embarazos en curso. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Las tasas de blastulación presentadas aquí (20% - 22% por ovocito 2PN descongelado) sugieren que la transferencia diferida puede ser de valor limitado para aquellos pacientes con pocos ovocitos 2PN. Esto puede ser cierto en pacientes con disminución de la reserva ovárica, con pocos ovocitos recuperados en punción y ovocitos de calidad disminuida. En estas pacientes se debería evaluar el aumento en la receptividad endometrial en comparación con la pérdida de la criopreservación.

Hubo tres casos de gemelos monocigotos en el grupo de mayor edad. Se ha tratado de relacionar la mayor incidencia de gemelos monocigóticos en FIV e ICSI con la transferencia de blastocisto (19-23).

Las tasas de implantación y embarazo múltiple, particularmente en pacientes menores de 35 años, sugieren que la transferencia diferida y PTEC junto con la transferencia de un embrión único puede ser una opción atractiva para parejas que desean evitar el embarazo múltiple.

En ninguna de las pacientes incluídas en este estudio se confirmó síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) y en ninguna se criopreservó sus ovocitos 2PN con el fin de evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica. Sin embargo, los métodos descritos aquí podrían ser especialmente atractivos para ese fin, dado que las pacientes en riesgo de SHO tienden a ser jóvenes altas respondedoras con muchos ovocitos 2PN. En el estudio se encontró que las pacientes jóvenes y aquellas con muchos ovocitos 2PN obtenían una elevada tasa de embarazo en curso.

Este es un estudio retrospectivo que describe una metodología específica proporcionada a determinadas pacientes para mejorar el nivel de atención a las mismas. La transferencia diferida y PTEC no fueron aleatorizadas dentro de un grupo de pacientes bien definidas, sino que se ofreció exclusivamente a pacientes en las que se esperaba una alteración en la receptividad del endometrio. Noventa y una pacientes presentaban luteinización prematura (P suero > 1,0 ng/mL) en su ciclo de estimulación ovárica y 43 pacientes tenían fallo previo de implantación en los ciclos en fresco (algunas presentaban luteinización prematura y fallo previo de implantación). La luteinización prematura y un fallo previo de implantación están asociados independientemente con una menor posibilidad de éxito (15, 24). Una de las primeras pacientes incluídas en el estudio, había aplazado la transferencia en fresco debido a una enfermedad médica que debía resolverse antes de la transferencia embrionaria. La opción de criopreservar toda la cohorte se dis-

cutió y acordó mutuamente entre los especialistas y las pacientes, y nunca se requirió ningún criterio específico para ser incluída en es estudio.

Para verificar los resultados presentados aquí y poder comparar los resultados de transferencia diferida/PTEC con los de transferencia de embriones frescos, se requiere de futuros estudios prospectivos controlados y randomizados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Society for Assisted Reproductive Technology.** IVF success rate reports: 2006. [www.SART.org](http://www.SART.org)
2. **Centers for Disease Control and Prevention;** American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology; and **RESOLVE:** The National Infertility Association. 2005 Assisted Reproductive Technology Society rates. Atlanta: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2005.
3. **Check JH, O'Shaughnessy A, Lurie D, Fisher C, Adelson HG.:** Evaluation of the mechanism for higher pregnancy rates in donor oocyte recipients by comparison of fresh with frozen embryo transfer pregnancy rates in a shared oocyte programme. *Hum Reprod* 1995; 10: 3022-7.
4. **Check JH, Choe JK, Katsoff D, Summers-Chase D, Wilson C.:** Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 416-20.
5. **Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Díaz J, Oehninger S.:** Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5742-52.
6. **Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW Jr.:** Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999; 14: 787-92.
7. **Kolb BA, Paulson RJ.:** The luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation and the possible impact of this hyperstimulation on embryo implantation. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 1262-7.
8. **Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, et al.:** 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.
9. **Papanikolaou EG, Bourgain C, Kolibianakis E, Tournaire H, Devroey P.:** Steroid receptor expression in la-

te follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes. *Hum Reprod* 2005; 20: 1541-7.

10. **Burns WN, Witz CA, Klein NA, Silverberg KM, Schenken RS.:** Serum progesterone concentrations on the day after human chorionic gonadotropin administration and progesterone/oocyte ratios predict in vitro fertilization/embryo transfer outcome. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 17-23.
11. **Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA.:** Factors affecting implantation after human in vitro fertilization: a hypothesis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 2020-3.
12. **Horcajadas JA, Díaz-Gimeno P, Pellicer A, Simón C.:** Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function. *Semin Reprod Med* 2007; 25: 454-60.
13. **Richter KS, Shipley SK, McVeary I, Tucker MJ, Widra EA.:** Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos. *Fertil Steril* 2006; 86: 862-6.
14. **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R.:** Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril* 2008; 89: 20-6.
15. **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Thomas S.:** Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil Steril* 2008; 90: 302-9.
16. **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.
17. **Murata Y, Oku H, Morimoto Y, Tokuda M, Murata T, Sugihara K, et al.:** Freeze-thaw programmes rescue the implantation of day 6 blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 428-33.
18. **Isachenko V, Todorov P, Dimitrov Y, Isachenko E.:** Integrity rate of pronuclei after cryopreservation of pronuclear-zygotes as a criteria for subsequent embryo development and pregnancy. *Hum Reprod* 2008; 23: 819-26.
19. **Wenstrom KD, Syrop CH, Hammitt DG, Van Voorhis BJ.:** Increased risk of monozygotic twinning associated with assisted reproduction. *Fertil Steril* 1993; 60: 510-4.
20. **Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z.:** Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture. *Hum Reprod* 1994; 9: 1318-21.
21. **Jain JK, Boostanfar R, Slater CC, Francis MM, Paulson RJ.:** Monozygotic twins and triplets in association with blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 103-7.
22. **Da Costa AA, Abdelmassih S, de Oliveira FG, Abdelmassih V, Abdelmassih R, Nagy ZP, et al.:** Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16: 333-6.
23. **Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM.:** Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 2003; 79: 503-6.
24. **Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST.:** Dramatic declines in implantation and pregnancy rates in patients who undergo repeated cycles of in vitro fertilization with blastocyst transfer after one or more failed attempts. *Fertil Steril* 2001; 76: 538-42.

## Efecto de metformina preconcepcional sobre el riesgo de aborto en síndrome de ovario poliquístico: una revisión sistemática y meta-análisis de ensayos controlados randomizados

### *Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*

Stefano Palomba M.D.<sup>a</sup>, Angela Falbo M.D.<sup>a</sup>, Francesco Orio Jr., M.D., Ph.D.<sup>b</sup> and Fulvio Zullo M.D., Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, University "Magna Graecia" of Catanzaro; and <sup>b</sup>Endocrinology, Faculty of Exercise Sciences, University "Parthenope," Naples, Italy.

#### **Resumen**

**Objetivo:** *Evaluar el efecto de la administración de metformina pregestacional sobre el riesgo de aborto en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS).*

**Diseño:** *Revisión sistemática y meta-análisis.*

**Lugar:** *Departamento académico de obstetricia y ginecología en Italia.*

**Paciente(s):** *Mujeres afectadas por PCOS que recibieron metformina pregestacional.*

**Intervención(es):** *Revisión sistemática de ensayos controlados randomizados (RCTs) publicados hasta junio de 2008 y meta-análisis subsecuente.*

**Principal resultado medido:** *tasa de aborto.*

**Resultado(s):** *Se incluyeron diecisiete RCTs en el análisis final. En total, no se detectó efecto de la administración de metformina en el riesgo de aborto. No se observó ningún efecto estadísticamente significativo de la metformina sobre el riesgo de aborto en cualquier comparación al subgrupo de los RCTs según el tratamiento recibido.*

**Conclusión(es):** *La metformina no tiene efecto en el riesgo de aborto en pacientes PCOS cuando se administra antes del embarazo. (Fertil Steril® 2009; 92: 1646-58. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Palabras clave:** Aborto. Metformina. Aborto. Síndrome de ovario poliquístico. Tratamiento.

#### **Summary**

**Objective:** *To evaluate the effect of pregestational metformin administration on abortion risk in polycystic ovary syndrome (PCOS) patients.*

**Design:** *Systematic review and meta-analysis.*

**Setting:** *Academic Department of Obstetrics and Gynecology in Italy.*

**Patient(s):** *Women affected by PCOS receiving pregestational metformin.*

Intervention(s): *Systematic review of randomized controlled trials (RCTs) published up to June 2008 and subsequent meta-analysis.*

Main Outcome Measure(s): *Abortion rate.*

Result(s): *Seventeen RCTs were included in the final analysis. Overall, no effect of the metformin administration was detected on the abortion risk. No statistically significant effect of metformin on the abortion risk was observed in any comparison when subgrouping the RCTs according to received treatment.*

Conclusion(s): *Metformin has no effect on the abortion risk in PCOS patients when administered before pregnancy. (Fertil Steril® 2009; 92: 1646-58. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)*

**Key words:** Abortion. Metformin. Miscarriage. Polycystic ovary syndrome. Treatment.

Una de las preocupaciones en el síndrome de ovario poliquístico (PCOS) es la reducción de la fertilidad (1). Se ha reportado un riesgo incrementado de aborto en pacientes PCOS después de concepciones espontáneas o asistidas hasta un 30% a 50% (2-4), y la tasa de aborto parece ser tres veces superiores en mujeres con PCOS que en mujeres saludables (5-6). Además, el desorden fue diagnosticado en cerca de 40% a 80% de las mujeres con abortos recurrentes (3, 5, 7).

Varios mecanismos contribuyentes están potencialmente envueltos en el riesgo aumentado de aborto espontáneo en esta población, y parece ser probable que la patogénesis de base de la pérdida precoz de embarazo es el resultado de una combinación de varios factores interrelacionados, incluyendo hormona luteinizante (LH) elevada, obesidad (9), hiperandrogenismo (10), resistencia a la insulina (11), y tratamientos de infertilidad (12).

Durante años recientes, la metformina, una biguanida oral insulino sensibilizante utilizada para tratar diabetes mellitus tipo II, fue utilizada en forma extensa en pacientes PCOS para tratar las disfunciones menstruales y aumentar la fertilidad en pacientes anovuladoras que deseaban concepción (13-18). Al día de hoy, sólo estudios no-randomizados han evaluado los efectos de los embarazos resultados de la administración de metformina durante el embarazo en pacientes PCOS, sugiriendo que la metformina puede ser también efectiva en reducir la incidencia de abortos en los mismos pacientes (19-24).

Por otro lado, se dispone en la literatura (1) varios estudios randomizados controlados (RCTs) que evalúan el efecto reproductivo de la administración de metformina y reportan las tasas de abortos. Estudios experimentales y clínicos parecen sugerir que la met-

formina podría afectar el riesgo de aborto actuando tanto en la receptividad endometrial como en la calidad del ovocito/embrión antes de la implantación y en la invasión trofoblástica durante la primera fase de anidación. Además, datos no claros y no sustentados apoyan el uso de metformina para la prevención de aborto en pacientes PCOS.

Basándose en estas consideraciones, se realizó una revisión sistemática y un metanálisis de los RCTs para una evaluación más objetiva de la evidencia sobre el efecto de la administración de metformina pregestacional sobre la tasa de aborto en mujeres con PCOS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente protocolo es adecuado a la calidad de reportes de metanálisis (QUOROM) estandarizado en reportes de revisiones sistemáticas de RCTs (25). No se requirió la aprobación de ningún comité de revisión institucional debido a que sólo se analizaron datos publicados.

## ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA

Buscamos artículos y resúmenes que muestren datos sobre las tasas de aborto en pacientes PCOS tratados con metformina, publicados hasta junio de 2008. La búsqueda incluyó la combinación de los siguientes temas médicos encabezados con las palabras claves: "PCOS", "polycystic ovary syndrome", "metformin", "biguanides", "insulin-sensitizing drugs", "insulin-sensitizers", "assisted reproduction", "clomiphene citrate", "ovulation induction", "gonadotropins", "controlled ovarian stimulation," "in-vitro fertilization",

“intrauterine insemination”, “abortion”, “miscarriage”, “pregnancy”, “pregnancy loss”, “infertility”, “reproduction”, and “sterility”.

Varias fuentes de búsqueda fueron utilizadas. Buscamos en MEDLINE (a través de PubMed) desde el año 1966; una base de datos electrónica incluyendo artículos de 8700 revistas y abstracts de reuniones realizadas por varias sociedades; sitios Web de registro de RTCs (U. S. National Institutes of Health Registry, Australian New Zealand Clinical Trials Registry, the National Research Register; UMIN Clinical Trial Registry, Netherlands Trial Register); Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility Group trials register; y the Cochrane Central Register of Controlled Trials (ambos buscados a partir de diciembre de 2007). Además, se realizaron búsquedas manuales en las bibliografías de los libros, artículos recuperados, artículos de revisión de opiniones de expertos y bibliografías revisadas de expertos en la materia. Para evitar el sesgo de publicación, dos expertos fueron contactados para la búsqueda de literatura gris. Cuando fue posible, se solicitó los datos faltantes a los investigadores de los estudios.

No se aplicó límite de lenguajes en nuestra búsqueda. Para identificar nuevos artículos, la búsqueda se realizó cada mes entre marzo de 2007 y junio de 2008.

Se cribó títulos y abstracts para identificar el potencial relevante de los artículos. Se buscó también artículos candidatos en la bibliografía de los estudios. Por lo tanto, los artículos identificados fueron revisados para criterios de inclusión y exclusión. Dos revisores independientes (A. F. y F. O.), quienes no fueron segados a los nombres de los investigadores o a las fuentes de publicación, identificaron y seleccionaron las RCTs que juntaron los criterios de inclusión. Los revisores trabajaron independientemente y en duplicado. Los desacuerdos entre ellos fueron discutidos y resueltos por consenso o arbitraje (S. P.).

Incluimos RCTs que evalúan los efectos reproductivos de la administración de metformina en una población de mujeres con PCOS en este meta-análisis. Consideramos elegibles todos los estudios en los cuales el diagnóstico de PCOS fue basado en una oligoanovulación crónica e hiperandrogenismo clínico/bioquímico (26), o la presencia de dos o tres de los siguientes criterios: oligoanovulación crónica, hiperandrogenismo clínico/bioquímico y morfología ovárica al ultrasonido (27), u otros criterios no validados.

Estudios en los cuales las tasas de aborto no fueron aportados por los datos publicados o disponibles por contacto vía E-mail con el investigador correspondiente fueron excluidos. En casos de datos no pu-

blicados, se realizaron contactos personales con los investigadores.

## **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población consistió en pacientes PCOS que recibieron metformina pregestacional. En todos los estudios, las características demográficas de la población de estudio, los criterios utilizados para el diagnóstico de PCOS, dosis y protocolo de administración de metformina, uso de tratamiento(s) actual o previo para inducción de ovulación, presencia de otros factores de fertilidad y/o subfertilidad, y presencia de enfermedades concomitantes que pudieran influenciar en el riesgo de aborto (ej: anatómica, autoinmune, endocrinológica, o anomalías cromosómicas) fueron grabados.

## **INTERVENCIONES**

Todos los pacientes de interés recibieron hidrocloruro de metformina.

## **RESULTADOS DE INTERES**

Las tasas de aborto fueron el objetivo primario de nuestro meta-análisis. Aborto se definió como la pérdida involuntaria de embarazo antes de las 20 semanas de gestación. Las tasas de aborto fueron calculadas como el número total de abortos por el número total de embarazos obtenidos bajo tratamiento.

## **CALIDAD DE ESTUDIO**

La calidad de los trabajos incluidos fue evaluada utilizando las guías Cochrane (28). En particular, enmascaramiento de asignación, ciego, análisis de intención de tratar (ITT), y seguimiento fueron analizados por cada estudio. Específicamente el enmascaramiento de asignación fue graduado como adecuado (A), no claro (B), o inadecuado (C) de acuerdo al criterio provisto por el Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility Group (29). El ciego fue reportado como Sí, No, o No Reportado por los investigadores, pacientes, asesores de resultados, o datos de analistas. El uso del análisis del ITT fue grabado e indicado como Sí o No. Finalmente, se reportó el período de seguimiento.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se mostraron como efectos generales de la metformina en las tasas de aborto por embarazo.

Un subanálisis fue también realizado agrupando los estudios en tasas de aborto de acuerdo al protocolo de estudio para definir el efecto de la metformina, administrada como monoterapia o como cotratamiento con otras drogas de infertilidad.

Los resultados medidos, definidos como datos dicotomizados, fueron la proporción de abortos de pacientes reportados. Se realizaron dos análisis del efecto del tratamiento: [1] "ITT basal" consideró las bajas y datos perdidos como fallos de tratamiento y recalculó los resultados para mantener el principio de ITT; [2] "basal por protocolo" consideró los resultados de los pacientes evaluados por separado.

Los resultados de cada estudio fueron expresados como riesgo relativo (RR) con un 95% de intervalo de confianza (CI) y combinado por meta-análisis para calcular una estimación de los efectos del tratamiento para las tasas de aborto entre los estudios.

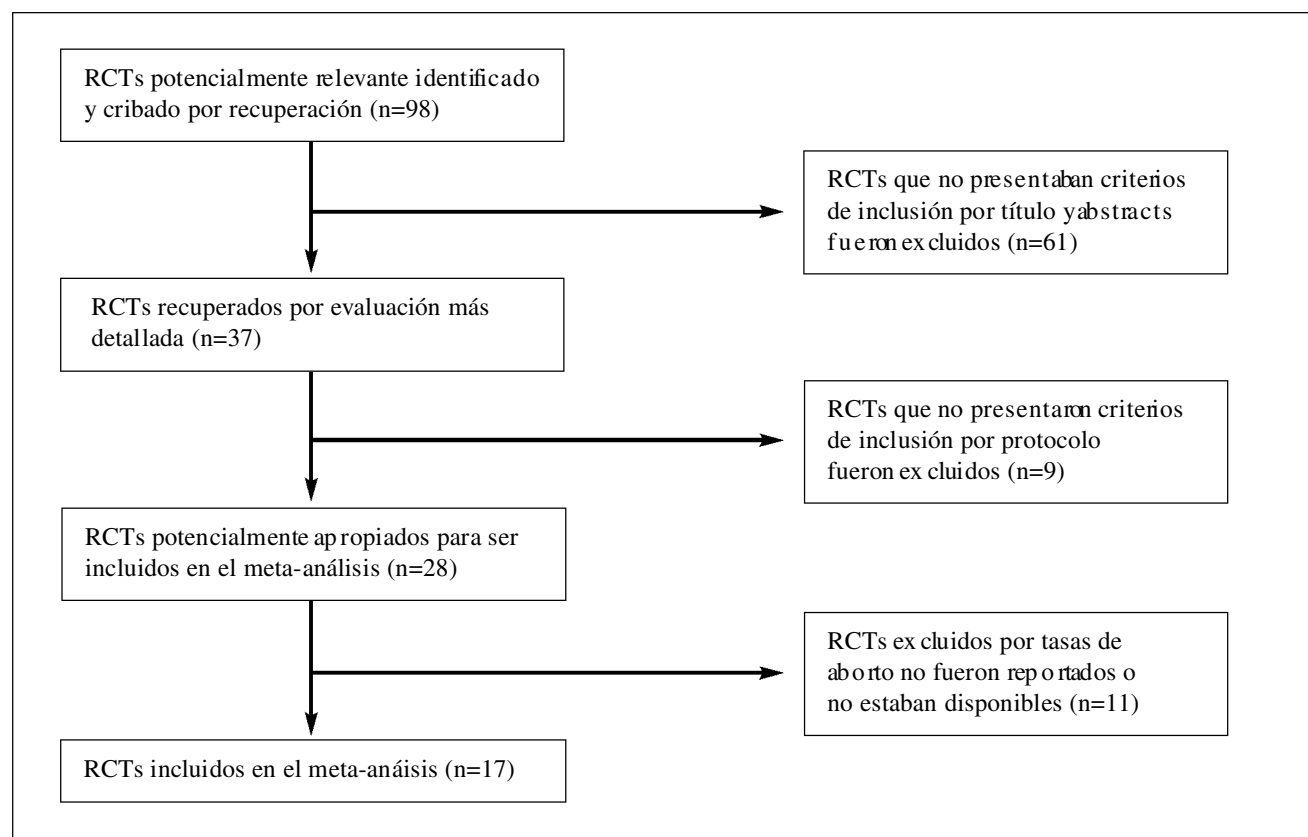
El test-Q Cochrane fue utilizado para medir la heterogeneidad entre los estudios, y se calculó como el peso de la suma de las diferencias al cuadrado entre los efectos de estudio individual y los efectos acumu-

lados entre los estudios, con los métodos de acumulación de pesos. Un Q-test Cochrane  $P < .05$  representa una homogeneidad estadística. Para los datos con homogeneidad estadística se utilizó el método Mantel-Haenszel para calcular la suma de pesos de RR bajo los modelos de efectos fijos. Por otro lado, los modelos de efectos randomizados de meta-análisis fueron utilizados en la presencia de heterogeneidad estadística inexplicada.  $P < .05$  de 95% CI que no contenía 1.0 de RR fue considerado como estadísticamente significativo.

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software StatsDirect (release 2.6.2; StatsDirect Ltd, Altrincham, Cheshire, United Kingdom).

## RESULTADOS

El organigrama de la selección de estudios de acuerdo a las guías QUORUM (25) es mostrado en Figura 1. Un total de 28 RCTs resultaron potencialmente para la inclusión en el meta-análisis (22, 30-56), pero de estos,



**Figura 1**  
*Esquema de la selección de estudios*

11 estudios fueron excluidos. En particular, las tasas de aborto no fueron evaluadas en dos estudios (35, 50), los datos de las tasas de aborto no estaban disponibles en las revistas y no se pudieron obtener de los investigadores después de contactarlos vía E-mail en cinco estudios (30, 37, 44, 53, 54), y no fue posible el contacto con los investigadores correspondientes en cuatro estu-

dios (31, 33, 47, 49). De este modo un total de 17 RCTs (22, 32, 34, 36, 38-43, 45, 46, 48, 51, 52, 55, 56) fueron incluidos en el final de análisis.

La Tabla 1 resume la calidad de las RCTs incluidos en el análisis. Las características más importantes de la población y las intervenciones recibidas en las RCTs están resumidas en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Calidad de los ensayos randomizados controlados					
Estudio	País	Enmascaramiento de asignación A: Adecuado B: no dato C: Inadecuado	Ciego A: Investigadores B: Pacientes C: Asesores de resultados	ITT	Periodo de estudio
Ng et al. (32)	China	A	A: Sí B: Sí C: Not reported	No	3 meses de pretratamiento seguido de 1 ciclo de coadministración
Vandermolen et al. (34)	United States	A	A: Sí B: Sí C: Not reported	No	7 semanas de pretratamiento seguido de 6 ciclos de coadministración
Yarali et al. (36)	Turkey	A	A: Sí B: Sí C: Not reported	No	6 semanas
Fedorcsak et al. (38)	Norway	A	A: No B: No C: No	No	1 mes de metformina coadministración de metformina durante FIV o ICSI
George et al. (39)	India	A	A: No B: No C: No	Yes	6 meses de pretratamiento seguido de 3 ciclos de coadministración
Kjøtrød et al. (40)	Norway	A	A: No B: No C: No	No	2 semanas de pretratamiento seguido por 1 ciclo de FIV o ICSI
Palomba et al. (41)	Italy	A	A: No B: Sí C: Not reported	No	6 meses más una extensión de 9 meses de seguimiento
Sahin et al. (43)	Turkey	B	A: No B: No C: No	No	3 meses de pretratamiento seguido de 6 ciclos de coadministración
Hwu et al. (45)	Taiwan	B	A: No B: Sí C: Not reported	No	12 días de pretratamiento seguido de 1 ciclo de coadministración
Öralan et al. (46)	Turkey	A	A: Sí B: Sí C: Not reported	No	8 semanas de pretratamiento seguido por 1 ciclo de ICSI
Palomba et al. (22)	Italy	A	A: Sí B: Sí C: Not reported	No	3 meses de pretratamiento más tres pruebas de EOC

Polombo: Metformin and abortion risk in PCOS. Fertil Steril 2009.

**TABLE 1**

Continuación					
Studio	País	Enmascaramiento de asignación A: adecuado B: no claro C: inadecuado	Ciego A: Investigadores B: Pacientes C: Asesores de resultados	ITT	Periodo de estudio
Palomba et al. (42)	Italy	A	A: Si B: Si C: Not reported	No	6 meses más una extensión de 9 meses por paciente embarazada
van Santbrink et al. (48)	Nederland	A	A: Si B: Si C: Not reported	No	1 mes de pretratamiento seguido de 1 ciclo de coadministración
Moll et al. (51)	Nederland	A	A: Si B: Si C: Not reported	No	6 meses
Rouzi et al. (52)	Arabia	A	A: Not reported B: Not reported C: Not reported	No	3 meses
Legro et al. (55)	United States	A	A: Si B: Si C: Si	Si	6 meses más una extensión de 9 meses por paciente embarazada
Zain et al. (56)	Malaysia	A	A: No B: No C: Not reported	No	6 meses más extensión por paciente embarazada hasta una documentación sonográfica de viabilidad de embarazo

Nota: EOC: Estimulación Ovárica Controlada; ICSI: Inyección Intracitoplasmática de Semen; ITT: Intención de Tratar; FIV: Fecundación In Vitro

Palomba. Metformin and abortion risk in PCOS. *Fertil Steril* 2009.

Ningún estudio incluido en el análisis tuvo tasas de aborto como objetivo primario, y ninguno fue impulsado a detectar diferencias en la incidencia de abortos. Además no se examinaron otras causas posibles de aborto en ningún estudio. Las poblaciones estudiadas en los diferentes RCTs fueron heterogéneas para varias características demográficas y bioquímicas/metabólicas. En ningún RCTs se administró metformina durante el embarazo; su administración fue siempre continuada hasta alcanzar el test de embarazo positivo (22, 32, 34, 41, 42, 46, 51, 52, 55, 56) o interrumpida al indicar la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) (36, 38, 40,

43, 45, 48). Sin embargo, un estudio no aportó ningún dato correspondiente en este sentido (39).

**Meta-análisis**

El análisis de los efectos del tratamiento fue realizado tanto en el ITT basal, como basal por protocolo. Además, no se detectó diferencia entre ellos, por lo que sólo se mostró el meta-análisis sobre por protocolo. En todas las comparaciones, no se detectó heterogeneidad estadísticamente significativa, y se mostró el efecto fijo.



**TABLA 2**

**Características de las poblaciones del estudio**

Estudio	Muestra (n)	Diagnóstico de PCOS	Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Resistencia a la insulina	Resistencia al CC	Exclusión de otras causas de infertilidad/subfertilidad
Ngel et al. (32)	20	Oligo/amenorrea Ovarios poliquísticos	Med: 30.5 (27-33) Control: 32.0 (29-34)	Med: 24.1 (19.8-34.2) Control: 23.8 (17.9-30.8)	No definido	All patients were CC resistant	Infertilidad/subfertilidad por factor tubárico y masculino
Vandermolen et al. (34)	27	Oligo/amenorrea Hiperaandrogenismo	Med: 29.0 ± 1.2 Control: 30.0 ± 1.0	Med: 37.5 ± 4.3 Control: 38.4 ± 2.2	No definido	Todos los pacientes eran resistentes al CC	Sospecha de infertilidad por factor peritoneal, infertilidad/subfertilidad por factor tubárico y masculino. Sospecha de infertilidad por factor peritoneal, infertilidad/subfertilidad por factor tubárico y masculino.
Yarali et al. (35)	32	Oligo/amenorrea Hiperaandrogenismo Ovarios poliquísticos	Not reported	Med: 28.5 ± 4.0 Control: 29.5 ± 4.8	No definido	Todos los pacientes eran resistentes al CC	No evaluación de otros factores de infertilidad/subfertilidad
Fedorcsak et al. (38)	17	Ovarios poliquísticos y por lo menos dos de siguientes: - oligo/amenorrea - hirsutismo - hiperaandrogenismo	Overall: 31 (23-35)	31.5 (27.1-40.7)	Todos los pacientes eran resistentes a insulina	No definido	No evaluación de otros factores de infertilidad/subfertilidad
George et al. (39)	50	Oligo/amenorrea Hirsutismo y/o ratio LH/FSH elevada LH elevada Ovarios poliquísticos	Med: 25.1 ± 3.0 Control: 26.0 ± 2.9	Med: 25.5 ± 3.7 Control: 24.5 ± 2.5	No definido	No definido	Infertilidad/subfertilidad por factor tubárico y masculino

Riorda. Metformin and abortion risk in PCOS. Fertil Steril 2009

**TABLA 2**

**Continuación**

Estudio	Muestra (n)	Diagnóstico de PCOS	Edad (Años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Resistencia a la insulina	Resistencia al CC	Exclusión de otras causas de infertilidad/subfertilidad
Kjotved et al. (40)	73	Oligo/amenorrea Ovarios poliquísticos Y al menos uno de los siguientes: - niveles de T elevados - SHBG disminuida - ratio LH/FSH elevado - C-peptido elevado - hirsutismo	Met: 28.9 (27.5-30.2) Control: 30.2 (29.0-31.5)	Met: 28.5 (28.9-30.4) Control: 29.9 (27.9-31.9)	No definido	No definido	Enfermedades tubarías y masculinas inciertas
Palomba et al. (41)	120	Criterios NIH (28)	Met: 26.8 ± 2.2 Control: 27.5 ± 2.4	Met: 28.1 ± 1.7 Control: 27.5 ± 1.5	No definido	Todos los pacientes eran resistentes a CC	Sospecha de infertilidad por factor peritoneal, infertilidad/subfertilidad por factor tubárico masculino
Sáhin et al. (43)	21	Al menos tres de las siguientes: - Oligo/amenorrea - Ovarios poliquísticos - Hirsutismo - Hiperandrogenismo - Brevada - Ratio LH/FSH	Met: 27 (21-31) Control: 24.5 (19-28)	Met: 30.4 (24.5-33.9) Control: 25.7 (23.1-35.7)	No definido	No definido	Infertilidad/subfertilidad por factor tubárico, uterino y masculino
Hwu et al. (45)	80	Oligo/amenorrea Clínica y/o bioquímicos hiperandrogenismo Ovarios poliquísticos	Met: 29.1 ± 4.5 Control: 27.8 ± 3.8	Met: 25.3 ± 3.3 Control: 24.1 ± 3.5	No definido	Todos los pacientes eran resistentes a CC	No evaluación de otros factores de infertilidad/subfertilidad
Öndan et al. (48)	110	Oligo/amenorrea Clínica y/o bioquímicos hiperandrogenismo	Met: 29.3 ± 3.9 Control: 29.8 ± 5.3	Met: 25 (19-41) Control: 23.5 (19-34)	No definido	No definido	Causa concomitante de infertilidad/subfertilidad

*Palomba. Metformin and abortion risk in PCOS. Fertil Steril 2009*

**TABLA 2**

**Continuación**

Estudio	Muestra (n)	Diagnóstico de PCOS	Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Resistencia a la insulina	Resistencia a CC	Exclusión de otras causas de infertilidad/subfertilidad
Palomba et al. (22)	70	Criterios NIH (29)	Met: 26.2 ± 2.7 Control: 26.9 ± 2.8	Met: 28.5 ± 2.7 Control: 28.4 ± 2.5	Todos los pacientes eran resistentes a insulina	Todos los pacientes eran resistentes a CC	Sospecha de infertilidad por factor peritoneal, infertilidad/subfertilidad por factor tubárico y masculino
Palomba et al. (42)	100	Criterios NIH (29)	Met: 26.4 ± 2.9 Control: 25.9 ± 2.7	Met: 27.0 ± 2.9 Control: 28.7 ± 2.8	No definido	Pacientes no resistentes a CC	Sospecha de infertilidad por factor peritoneal, infertilidad/subfertilidad por factor tubárico y masculino
van Santbrink et al. (48)	20	Oligo/amenorrea u ovulación normogonadotrópica	Met: 28 {22-32} Control: 28 {24-34}	Met: 38 {28-51} Control: 34 {27-44}	Todos los pacientes eran resistentes a insulina	Todos los pacientes eran resistentes a CC-iracundo	No evaluación de otros factores de infertilidad/subfertilidad
Moll et al. (51)	225	ESHRE/ASRM (27)	Met: 27.9 ± 3.7 Control: 28.4 ± 4.7	Met: 28.5 ± 7.1 Control: 27.8 ± 6.7	No definido	No definido	Factor masculino de infertilidad/subfertilidad, no evaluación de permeabilidad tubaria
Rouzi et al. (52)	25	Oligo/amenorrea u hirsutismo u Ovarios poliquísticos y/o hiperandrogenismo	Met: 27.4 ± 4.3 Control: 28.6 ± 3.7	Met: 32.0 ± 7.7 Control: 30.9 ± 3.7	No definido	Todos los pacientes eran resistentes a CC	Enfermedad tubaria incierta pero todos los otros factores de infertilidad/subfertilidad excluidos
Legro et al. (55)	828	Oligomenorrea u hiperandrogenismo	Met: 28.1 ± 4.0 Control: 27.9 ± 4.0	Met: 35.6 ± 8.5 Control: 36.0 ± 8.9	No definido	No definido	Infertilidad/subfertilidad por enfermedades de cavidad uterina, tubaria y factor masculino
Zain et al. (59)	115	ESHRE/ASRM (27)	Met: 27.8 ± 3.6 Control: 29.6 ± 4.35	Met: 33.9 ± 3.6 Control: 32.9 ± 4.2	No definido	Pacientes no resistentes a CC	Factor masculino de infertilidad/subfertilidad, no evaluación de permeabilidad tubaria

Notas: Los datos son reportados como media ± desviación estándar o mediana (rango). Met: pacientes que recibieron metformina; control= pacientes quienes no recibieron metformina. IMC: Índice de Masa Corporal; CC: Citrato de Clomifeno; ESHRE/ASRM: European Society for Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine; FSH: Hormona Folículoestimulante; LH: Hormona Luteinizante; NIH: U.S. National Institutes of Health; SHBG: globulina de unión de hormonas sexuales; T: testosterona

Palomba, Metformin and abortion risk in PCOS. *Fertil Steril* 2005

**TABLA 3**

Intervenciones del estudio			
	Comparaciones	Protocolo	Duración
Ng et al. {32}	Pretratamiento con Met versus placebo y coadministración durante la inducción de la ovulación con CC	Met: dosis fija de 500 mg tid CC: dosis fija de 100 mg diario	3 meses de tratamiento seguido de 1 ciclo de coadministración
Vandermolen et al. {34}	Pretratamiento con Met versus placebo y coadministración durante la inducción de la ovulación con CC	Met: dosis fija de 500 mg tid Placebo: un tab tid CC: dosis creciente hasta 150 mg diario	7 semanas de tratamiento seguido de 6 ciclos de coadministración
Yarali et al. {36}	Pretratamiento con Met versus placebo y coadministración durante COS	Met: dosis fija de 850 mg bid rFSH: protocolo de dosis crecientes bajas	6 semanas de tratamiento seguido de coadministración
Fedorcsak et al. {38}	Coadministración de Met versus no tratamiento durante un ciclo de FIV o ICSI	Met: dosis fija de 500 mg tid rFSH: protocolo de dosis crecientes bajas	Un ciclo
George et al. {39}	Pretratamiento con Met y coadministración con CC versus hMG	Met: dosis fija de 500 mg tid CC: dosis creciente a 200 mg diario	6 semanas de tratamiento seguido de 3 ciclos de coadministración
Kjotgard et al. {40}	Pretratamiento con Met versus placebo y coadministración durante un ciclo de FIV o ICSI	Met: dosis creciente hasta 2000 mg diario Placebo: dos tabs bid GnRH agonista rFSH: protocolo de dosis crecientes bajas	2 semanas de tratamiento seguido de un ciclo de coadministración
Palomba et al. {41}	Met versus LOD	Met: dosis fija de 850 mg bid Placebo: un tab bid	6 meses
Sahin et al. {43}	Pretratamiento con Met y coadministración versus no pretratamiento en inducción de ovulación con CC	Met: dosis fija de 850 mg bid CC: dosis fija de 100 mg diario	3 meses de tratamiento seguido de 6 ciclos de coadministración
Hwu et al. {45}	Pretratamiento con Met y coadministración versus no pretratamiento en inducción de ovulación con CC	Met: dosis fija de 500 mg tid CC: dosis creciente hasta 150 mg/diario	1 ciclo
Ónalan et al. {46}	Pretratamiento con Met versus placebo antes de un ciclo de ICSI	Met: dosis fija de 850 mg bid for BMI < 28 kg/m <sup>2</sup> o dosis fija de 850 mg tid de BMI > 28 kg/m <sup>2</sup> Placebo GnRH agonista rFSH: protocolo de dosis crecientes bajas	8 semanas de tratamiento seguido de 1 ciclo de coadministración

Palomba, Palomba, Arias-Vasquez, et al. / Fertil. Steril. 2009.

**TABLA 3**

Continuación			
	Comparaciones	Protocolo	Duración
Palomba et al. (22)	Pretratamiento de Met versus placebo y coadministración en COS más TI o IUI	Met: dosis fija de 850 mg bid Placebo: polyvitamin bid hpFSH: protocolo de dosis crecientes bajas	3 meses de pretratamiento seguido de 3 ciclos de coadministración
Palomba et al. (42)	Met versus OC	Met: dosis fija de 850 mg bid OC: dosis fija de 150 mg diarios	6 meses
van Santbrink et al. (48)	Pretratamiento de Met versus placebo y coadministración en COS	Met: dosis fija de 850 mg bid Placebo: una tableta bid rFSH: protocolo de dosis crecientes bajas	Un ciclo de pretratamiento seguido por un ciclo de coadministración
Moll et al. (51)	Met más OC versus placebo más OC	Met: Aumento dosis alta a 2000 mg diario OC: Aumento dosis alta a 150 mg/diario	6 meses
Rouzi et al. (52)	Met más OC versus rosiglitazona más OC	Met: dosis fija de 500 mg tid Rosiglitazona: 4 mg bid OC: dosis fija de 100 mg diario	3 ciclos
Legro et al. (55)	Met versus OC versus met más OC	Met: Aumento dosis alta a 2000 mg diario OC: aumento dosis alta a 150 mg diario	6 meses
Zain et al. (56)	Met versus OC versus met más OC	Met: aumento dosis alta a 1500 mg diario OC: aumento dosis alta a 200 mg diario	6 meses

Notas: bid: dos veces al día; IMC: índice de masa corporal, OC: citrato de clomifeno, COS: estimulación ovárica controlada; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, hMG, gonadotropina menopáusica humana, hpFSH: FSH altamente purificada; ICSI: inyección intracitoplasmática de espermia; IUI: inseminación artificial; FIV: fecundación in vitro; LGD: drilling ovárico laparoscópico; Met: metformina; rFSH: FSH recombinante; TI: tiempo de relaciones sexuales, tid: tres veces por día

Palomba, Metformin and abortion Act In PCOS. Fertil Steril 2009

**Resultados generales**

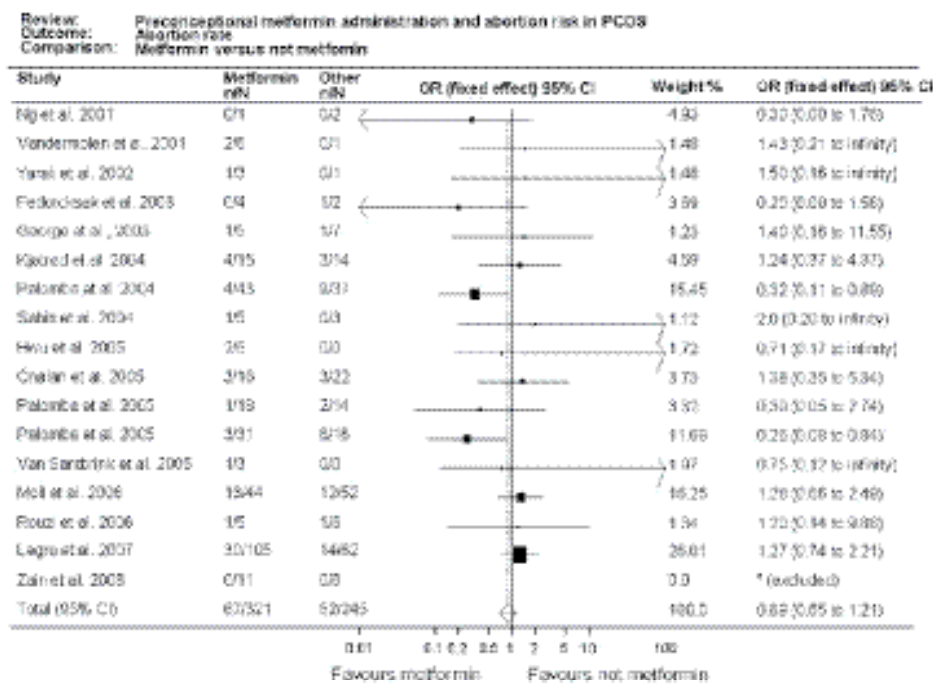
No se detectó un efecto estadísticamente significativo en la administración de metformina en las tasas de aborto con respecto a la población de PCOS (OR 0,89; 95% CI, 0,65-1,21; P1/4,452) (Fig. 2).

**Metformina vs citrato de clomifeno**

No se observó un efecto estadísticamente significativo en las tasas de aborto cuando se comparó con citrato de clomifeno (OR 1,02; 95% CI, 0,59-1,75; P1/4,941).

**FIGURA 2**

**Efecto global de la administración de metformina preconcepcional sobre el riesgo de aborto en pacientes con SOP**



Palomba. Metformin and abortion risk in PCOS. *Fertil Steril* 2008.

**Metformina versus no tratamiento o placebo durante ciclos estimulados con citrato de domifeno**

La administración de metformina no fue mas efectiva que el no tratamiento o placebo en reducir las tasas de aborto en pacientes PCOS tratados con citrato de clomifeno, quienes no respondían al tratamiento (OR 0,76; 95%CI, 0,21-2,81, p 1/4,683) o tenían resistencia a citrato de clomifeno OR 1,43, IC 95%, 0,91-2,25, P1/4 .125).

**Metformina en pacientes tratados con gonadotropinas para estimulación ovárica controlada**

No se detectó ningún efecto de metformina estadísticamente significativo en el riesgo de aborto (OR 0,84; 95% CI, 0,24-2,95; P1/4 .784) en pacientes que recibieron gonadotropinas como inductores de ovulación.

**Co-administración de metformina en pacientes tratados con gonadotropinas en ciclos de fertilización In Vitro**

No se mostró ningún efecto de la metformina esta-

dísticamente significativo en las tasas de aborto en ciclos de fertilización in Vitro (OR 0,96; 95% CI, 0,40-2,34; P1/4.935).

**DISCUSIÓN**

Para nuestro conocimiento, esta es la primera revisión sistemática y meta-análisis de RCTs realizado para establecer el efecto potencial de la metformina, administrada durante el período pregestacional en el riesgo de aborto en pacientes con PCOS.

Los abortos representan un importante problema médico y social en la población general, y se convierte en crucial para pacientes infértiles como los PCOS. No se puede dar una explicación unívoca para el riesgo potencial incrementado de aborto en la población de PCOS. Los niveles elevados de LH, hiperinsulinemia, hiperandrogenismo, y hipofibrinólisis mediada por la actividad del inhibidor activador del plasminógeno (PAI) pueden estar implicados tanto solos como en combinación en la patogénesis de la alta incidencia de aborto en mujeres con PCOS (57).

Datos experimentales recientes han mostrado que las pacientes PCOS tienen significativamente menores concentraciones de glicodelina sérica y Proteína de unión del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGFBP) durante el primer trimestre de embarazo, lo que sugiere un deficiente ambiente endometrial para implantación y mantenimiento del embarazo. Además, las pacientes PCOS quienes han abortado, cuando se comparan con pacientes que no lo han hecho, mostraron niveles séricos de glicodelina e IGFBP-1 significativamente menores durante las semanas 3<sup>o</sup> a 8<sup>o</sup> y de la 9<sup>o</sup> a la 11<sup>o</sup> de embarazo, respectivamente (58). Basado en estas consideraciones y en acuerdo con otros investigadores (19-23), la administración de metformina podría tener un rol beneficioso en reducir el riesgo de aborto.

Los mecanismos para explicar este efecto potencial podrían relacionarse tanto con la acción local como sistémica de la propia metformina. De hecho, la metformina emplea las acciones sistémicas reduciendo los niveles de insulina y PAI-1 (19, 59-61), endotelina plasmática-I, andrógenos, y concentraciones de LH (62, 63), y aumentando los niveles séricos de IGFBG-1 y glicodelina. Por otro lado, la metformina parece actuar localmente en la mayoría de factores influenciados en el suceso de implantación en reproducción humana, el endometrio, ovocitos, y factores embrionarios (64).

Nuestros datos previos demostraron que la metformina aumenta varios marcadores subrogados a la receptividad endometrial (65, 66) y vascularización ovárica (67). En particular, la metformina aumenta el flujo sanguíneo arterial. De esta manera, metformina puede inducir un desarrollo folicular similar al observado en mujeres jóvenes, evitando el daño hipóxico y los desordenes citoplasmáticos y cromosómicos relacionados a la pobre vascularización (68, 69).

Los datos experimentales han demostrado que la metformina también actúa activando la 5'adenosinmonofosfato (AMP)-proteína quinasa activada (AMPK), una llave reguladora de balance de energía a nivel central y periférico, a nivel de las células de la granulosa (70). Los datos clínicos han mostrado que con metformina 15 días pretratamiento con una dosis de 2000 mg diario, se incrementa las tasas de embriones de alta calidad (37,8% vs 24,3%), las tasas de implantación (15,3% vs 6,2%), y las de embarazos (38,2% vs 16,7%) en pacientes PCOS resistentes a CC quienes hicieron tratamiento de maduración ovocitaria in Vitro (IVM) (71).

Finalmente, un estudio experimental excelente (72) demostró que la metformina indujo la activación de AMPK, también dentro de blastocitos, conduciendo a

la mejora de señalización de insulina y resultados de embarazo sobre embriones de murines cultivados.

No obstante estos datos, la metformina administrada solo o en combinación con otros tratamientos de infertilidad para inducir ovulación en pacientes PCOS, no parece tener efecto en la prevención de abortos. De hecho, nuestros datos demostraron la no reducción del riesgo de aborto en pacientes quienes recibieron metformina en comparación con aquellos quienes no la recibieron, para un riesgo relativo de aborto de 0,89 (95% CI, 0,65-1,21). Estos descubrimientos fueron también confirmados por estudios categorizados de acuerdo al tratamiento recibido. Sin embargo todos los estudios incluidos fueron muy heterogéneos por protocolos, dosis de metformina administrada y por las características de la población estudiada, se detectó una homogeneidad estadística de los resultados.

Se pueden dar pocas explicaciones de la discrepancia entre los efectos benéficos de la metformina sobre factores locales/sistémicos en pacientes PCOS, al ser evaluados por estudios experimentales, y la falta de su efectividad clínica en el riesgo de aborto. Es posible hipotetizar que la metformina retirada antes (en la inyección  $\beta$ -hCG) o al diagnóstico de embarazo, como en los RCTs incluidos (22, 32, 34, 36, 38-43, 45, 46, 48, 51, 52, 55, 56), puede afectar su potencial beneficio. Además, ningún RCT incluido en nuestro meta-análisis tenía tasas de aborto como objetivo primario, por ello, no se estudiaron (excluyeron) otras posibles causas de aborto en ningún estudio.

Actualmente, muy pocos datos controlados están disponibles acerca los efectos de la metformina en el riesgo de aborto en pacientes PCOS embarazadas quienes recibieron la droga durante el embarazo (19, 20, 59, 73). Además, la metformina ha mostrado ser efectiva en las mujeres PCOS insulino resistentes con aborto a repetición (23), y también se ha encontrado que la terapia con metformina aumenta las probabilidades de embarazo exitoso en pacientes PCOS con un test de tolerancia a la glucosa anormal y una historia de abortos recurrentes (74). Metformina es clasificada por la U. S. Food and Drug Administration bajo la categoría B de embarazo, y no se ha demostrado efecto teratogénico en humanos (75-77). Además, no obstante los datos preliminares tranquilizadores (19, 20, 23, 59, 73, 74), en la práctica clínica, la administración es usualmente discontinuada durante el embarazo en mujeres quienes conciben durante el tratamiento.

En el presente, dos protocolos diseñados para evaluar los efectos de la administración de metformina en mujeres embarazadas con PCOS están en fase de reclutamiento (78, 79). De esta manera, antes de dibu-

jar las conclusiones definitivas en el riesgo de aborto en pacientes PCOS tratadas con metformina, se necesitan los resultados de este último RCTs (78, 79).

Nuestra revisión sistemática y meta-análisis de RCTs no demuestra un beneficio estadísticamente significativo de la administración de metformina pregestacional en el riesgo de aborto en paciente PCOS quienes reciben la droga como monoterapia o combinada con otras drogas de fertilidad. Así, por el momento, no hay evidencia tipo I que sugiera que la administración de metformina reduce el riesgo de aborto en mujeres con PCOS.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS.:** A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 673-83.
2. **Homburg R, Armar NA, Eshel A, Adams J, Jacobs HS.:** Influence of serum luteinising hormone concentrations on ovulation, conception, and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *BMJ* 1988; 297: 1024-6.
3. **Sagle M, Bishop K, Ridley N, Alexander FM, Michel M, Bonney RC, et al.:** Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *BMJ* 1988; 297: 1027-8.
4. **Balen AH, Tan SL, MacDougall J, Jacobs HS.:** Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum Reprod* 1993; 8: 959-64.
5. **Regan L, Braude PR, Trembath PL.:** Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989; 299: 541-5.
6. **Gray RH, Wu LY.:** Subfertility and risk of spontaneous abortion. *Am J Public Health* 2000; 90: 1452-4.
7. **Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L.:** An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 1994; 9: 1328-32.
8. **Regan L, Owen EJ, Jacobs HS.:** Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet* 1990; 336: 1141-4.
9. **The ESHRE Capri Workshop Group.** Nutrition and reproduction in women. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 193-207.
10. **Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC.:** Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril* 1998; 69: 682-90.
11. **Tian L, Shen H, Lu Q, Norman RJ, Wang J.:** Insulin resistance increases the risk of spontaneous abortion after assisted reproduction technology treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1430-3.
12. **Wang JX, Norman RJ, Wilcox AJ.:** Incidence of spontaneous abortion among pregnancies produced by assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2004; 19: 272-7.
13. **Costello MF, Eden JA.:** A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 79: 1-13.
14. **Lord JM, Flight IH, Norman RJ.:** Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 327: 951-3.
15. **Kashyap S, Wells GA, Rosenwaks Z.:** Insulin-sensitizing agents as primary therapy for patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2004; 19: 2474-83.
16. **Siebert TI, Kruger TF, Steyn DW, Nosarka S.:** Is the addition of metformin efficacious in the treatment of clomiphene citrate-resistant patients with polycystic ovary syndrome? A structured literature review. *Fertil Steril* 2006; 86: 1432-7.
17. **Moll E, van der Veen F, van Wely M.:** The role of metformin in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 527-37.
18. **Palomba S, Pasquali R, Orio F jr, Nestler JE.:** Clomiphene citrate, metformin or both as first-step approach in treating anovulatory infertility in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review of head-to-head randomized controlled studies and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Published online August 7, 2008.
19. **Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P.:** Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril* 2001; 75: 46-52.
20. **Glueck CJ, Wang P, Kobayashi S, Phillips H, Sieve-Smith L.:** Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002; 77: 520-5.
21. **Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE.:** Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 524-9.
22. **Palomba S, Falbo A, Orio F Jr, Manguso F, Russo T, Tolino A, et al.:** A randomized controlled trial evaluating metformin pre-treatment and co-administration in non-obese insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome treated with controlled ovarian stimulation plus timed intercourse or intrauterine insemination. *Hum Reprod* 2005; 20: 2879-86.
23. **Palomba S, Falbo A, Orio F Jr, Russo T, Tolino A,**



- Zullo E:** Metformin hydrochloride and recurrent miscarriage in a woman with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85: 1511. e3-5.
24. **Thatcher SS, Jackson EM.:** Pregnancy outcome in infertile patients with polycystic ovary syndrome who were treated with metformin. *Fertil Steril* 2006; 85:1002-9.
  25. **Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF.:** Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. *Quality of Reporting of Meta-analyses. Lancet* 1999; 354: 1896-900.
  26. **Zawadzki JK, Dunaif A.:** Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, eds. *Polycystic ovary syndrome*. Boston: Blackwell Science, 1992: 337-84.
  27. **The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group.** Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19: 41-7.
  28. **Higgins J, Green S, eds.:** *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions* version 4.2.6. Chichester: Wiley/The Cochrane Collaboration, 2006. Available from [www.cochrane-handbook.org](http://www.cochrane-handbook.org).
  29. **Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility Group.** *Trials register* (September 2005). Available at [www.fmhs.auckland.ac.nz/som/obsgynae/research/cochrane/default.aspx](http://www.fmhs.auckland.ac.nz/som/obsgynae/research/cochrane/default.aspx)
  30. **De Leo V, la Marca A, Ditto A, Morgante G, Cianci A.:** Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999; 72: 282-5.
  31. **El-Biely MM, Habba M.:** The use of metformin to augment the induction of ovulation in obese infertile patients with polycystic ovary syndrome. *Middle East Fertil Soc J* 2001; 6: 43-9.
  32. **Ng EH, Wat NM, Ho PC.:** Effects of metformin on ovulation rate, hormonal and metabolic profiles in women with clomiphene-resistant polycystic ovaries: a randomized, double-blinded placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2001; 16: 1625-31.
  33. **Singh MA, Bedaiwy A, Hatwal A, Kumar A.:** Increased pregnancy rates with metformin and domiphen citrate in non-obese patients with polycystic ovary syndrome: prospective randomized study. *Fertil Steril* 2001; 76: S94.
  34. **Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE.:** Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil Steril* 2001; 75: 310-5.
  35. **Fleming R, Hopkinson ZE, Wallace AM, Greer IA, Sattar N.:** Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 569-74.
  36. **Yarali H, Yildiz BO, Demiroglu A, Zeyneloglu HB, Yigit N, Bükülmez O, et al.:** Co-administration of metformin during rFSH treatment in patients with domiphen citrate-resistant polycystic ovarian syndrome: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2002; 17: 289-94.
  37. **Kocak M, Caliskan E, Simsir C, Haberal A.:** Metformin therapy improves ovulatory rates, cervical scores, and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002; 77: 101-6.
  38. **Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Abyholm T, Tanbo T.:** The effect of metformin on ovarian stimulation and in vitro fertilization in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: an open-label randomized cross-over trial. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17: 207-14.
  39. **George SS, George K, Irwin C, Job V, Selvakumar R, Jeyaseelan V, et al.:** Sequential treatment of metformin and clomiphene citrate in clomiphene-resistant women with polycystic ovary syndrome: a randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 2003; 18: 299-304.
  40. **Kjøtrød SB, von Düring V, Carlsen SM.:** Metformin treatment before IVF/ICSI in women with polycystic ovary syndrome; a prospective, randomized, double blind study. *Hum Reprod* 2004; 19: 1315-22.
  41. **Palomba S, Orio F Jr, Nardo LG, Falbo A, Russo T, Corea D, et al.:** Metformin administration versus laparoscopic ovarian diathermy in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome: a prospective parallel randomized double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4801-9.
  42. **Palomba S, Orio F Jr, Falbo A, Manguso F, Russo T, Cascella T, et al.:** Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first-line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4068-74.
  43. **Sahin Y, Yirmibes U, Kelestimur F, Aygen E.:** The effects of metformin on insulin resistance, clomiphene-induced ovulation and pregnancy rates in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113: 214-20.
  44. **Tasdemir S, Ficioglu C, Yalti S, Gurbuz B, Basaran T, Yildirim G.:** The effect of metformin treatment to ovarian response in cases with PCOS. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 269: 121-4.
  45. **Hwu YM, Lin SY, Huang WY, Lin MH, Lee RK.:**

- Ultra-short metformin pretreatment for clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 90: 39-43.
46. **Onalan G, Pabuccu R, Goktolga U, Ceyhan T, Bagis T, Cincik M.:** Metformin treatment in patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2005; 84: 798-801.
  47. **Raja A, Hashmi SN, Sultana N, Rashid H.:** Presentation of polycystic ovary syndrome and its management with clomiphene alone and in combination with metformin. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2005; 17: 50-3.
  48. **Van Santbrink EJ, Hohmann FP, Eijkemans MJ, Laven JS, Fauser BC.:** Does metformin modify ovarian responsiveness during exogenous FSH ovulation induction in normogonadotrophic anovulation? A placebo-controlled double-blind assessment. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 611-7.
  49. **Kocak I, Ustün C.:** Effects of metformin on insulin resistance, androgen concentration, ovulation and pregnancy rates in women with polycystic ovary syndrome following laparoscopic ovarian drilling. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32: 292-8.
  50. **Khorram O, Helliwell JP, Katz S, Bonpane CM, Jaramillo L.:** Two weeks of metformin improves clomiphene citrate-induced ovulation and metabolic profiles in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85: 1448-51.
  51. **Moll E, Bossuyt PM, Korevaar JC, Lambalk CB, van der Veen F.:** Effect of clomifene citrate plus metformin and clomifene citrate plus placebo on induction of ovulation in women with newly diagnosed polycystic ovary syndrome: randomised double blind clinical trial. *BMJ* 2006; 332: 1485.
  52. **Rouzi AA, Ardawi MS.:** A randomized controlled trial of the efficacy of rosiglitazone and clomiphene citrate versus metformin and clomiphene citrate in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85: 428-35.
  53. **Tang T, Glanville J, Hayden CJ, White D, Barth JH, Balen AH.:** Combined lifestyle modification and metformin in obese patients with polycystic ovary syndrome. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicentre study. *Hum Reprod* 2006; 21: 80-9.
  54. **Tang T, Glanville J, Orsi N, Barth JH, Balen AH.:** The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 2006; 21: 416-25.
  55. **Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, Carr BR, Diamond MP, Carson SA, et al.:** Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2007; 356: 551-66.
  56. **Zain MM, Jamaluddin R, Ibrahim A, Norman RJ.:** Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction, achievement of pregnancy, and live birth in Asian women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. Published online March 3, 2008.
  57. **Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F.:** Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev* (Accepted for publication).
  58. **Jakubowicz DJ, Essah PA, Seppälä M, Jakubowicz S, Baillargeon JP, Koistinen R, et al.:** Reduced serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome during first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 833-9.
  59. **Schachter M, Raziel A, Friedler S, Strassburger D, Bern O, Ron-El R.:** Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome is associated with elevated plasma homocysteine. *Hum Reprod* 2003; 18: 721-7.
  60. **Palomba S, Orio F Jr, Falbo A, Russo T, Tolino A, Zullo F.:** Plasminogen activator inhibitor 1 and miscarriage after metformin treatment and laparoscopic ovarian drilling in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2005; 84: 761-5.
  61. **Palomba S, Falbo A, Russo T, Manguso F, Tolino A, Zullo F, et al.:** Insulin sensitivity after metformin suspension in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3128-35.
  62. **Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A, Creasas G.:** Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 37-43.
  63. **Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, De Simone B, Manguso F, Savastano S, et al.:** Improvement in endothelial structure and function after metformin treatment in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome: results of a 6-month study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6072-6.
  64. **Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S, Rodriguez-Armas O, Rivas-Santiago A, Koistinen H, et al.:** Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1126-33.
  65. **Schwartz LB, Chiu AS, Courtney M, Krey L, Schmidt-Sarosi C.:** The embryo versus endometrium controversy revisited as it relates to predicting pregnancy outcome in in-vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 1997; 12: 45-50.
  66. **Palomba S, Russo T, Orio F Jr, Falbo A, Manguso F, Cascella T, et al.:** Uterine effects of metformin administration in anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2006; 21: 457-65.

67. **Palomba S, Orio F Jr, Falbo A, Russo T, Tolino A, Zullo F:** Effects of metformin and clomiphene citrate on ovarian vascularity in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 86: 1694-701.
68. **Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R.:** The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047-55.
69. **Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P.:** Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 1998; 13: 2857-2868.
70. **Coyral-Castel S, Tosca L, Ferreira G, Jeanpierre E, Rame C, Lomet D, et al.:** The effect of AMPK activation on GnRH secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *J Neuroendocrinol*. Published online January 17, 2008.
71. **Wei Z, Cao Y, Cong L, Zhou P, Zhang Z, Li J.:** Effect of metformin pretreatment on pregnancy outcome of in vitro matured oocytes retrieved from women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. Published online November 15, 2007.
72. **Eng GS, Sheridan RA, Wyman A, Chi MM, Bibee KP, Jungheim ES, et al.:** AMP kinase activation increases glucose uptake, decreases apoptosis, and improves pregnancy outcome in embryos exposed to high IGF-I concentrations. *Diabetes* 2007; 56: 2228-34.
73. **Khattab S, Mohsen IA, Foutouh IA, Ramadan A, Moaz M, Al-Inany H.:** Metformin reduces abortion in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22: 680-4.
74. **Zolghadri J, Tavana Z, Kazerooni T, Soveid M, Taghieh M.:** Relationship between abnormal glucose tolerance test and history of previous recurrent miscarriages, and beneficial effect of metformin in these patients: a prospective clinical study. *Fertil Steril*. Published online November 12, 2007.
75. **Coetzee EJ, Jackson WP.:** Metformin in management of pregnant insulin-independent diabetics. *Diabetologia* 1979; 16: 241-5.
76. **Coetzee EJ, Jackson WP.:** Oral hypoglycaemics in the first trimester and fetal outcome. *S Afr Med J* 1984; 65: 635-7.
77. **Coetzee EJ, Jackson WP.:** Pregnancy in established noninsulin-dependent diabetics. A five-and-a-half year study at Groote Schuur Hospital. *S Afr Med J* 1980; 58: 795-802.
78. **U.S. National Institutes of Health ClinicalTrials.gov Identifier:** NCT00159536. Norwegian University of Science and Technology. Metformin in pregnant PCOS women. Accessed on September 5, 2008. Available at <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00159536>.
79. **U.S. National Institutes of Health ClinicalTrials.gov Identifier:** NCT00466622. Norwegian University of Science and Technology. Uterine artery blood flow in pregnant women with polycystic ovary syndrome treated with metformin (FlowMet). Accessed on September 5, 2008. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00466622>.