

Estudio comparativo de dos tratamientos de androgenización en mujeres con baja respuesta en FIV <40 años: Parche de testosterona en protocolo largo versus Letrozole en protocolo con antagonistas

Comparative study of two androgenizing treatments in poor-responder IVF patients ≤ 40 years: transdermal testosterone in long protocol versus letrozole in protocol with antagonists

Francisca Martínez^{1,2}, Rosa Tur¹, Ignacio Rodríguez¹, Marta Devesa¹, Buenaventura Coroleu¹

¹ Salud de la mujer Dexeus, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Dexeus. Barcelona.

RESUMEN

El objetivo de este estudio es comparar dos protocolos de tratamiento de las mujeres con antecedente de Baja Respuesta en FIV: estimulación de la ovulación con gonadotropinas en protocolo largo y parche de testosterona versus gonadotropinas en protocolo corto con antagonista y letrozole.

Material y métodos: estudio piloto comparativo en el que se incluyeron de manera prospectiva 26 pacientes ≤ 40 años y FSH basal <11U/L, 13 en cada grupo de tratamiento. Resultados: no se observaron diferencias entre ambos grupos respecto a los niveles de Estradiol el día de hCG, número de ovocitos recuperados o número y calidad de los embriones transferidos. Antes de iniciar la estimulación, los niveles de Testosterona plasmática fueron significativamente más elevados en el Grupo-Parche, mientras que los niveles de LH fueron significativamente más elevados en el Grupo-Letrozole en el día 1 y 5 de estimulación. La tasa de embarazo fue significativamente superior en el Grupo-Parche $p=0,045$ (46,2% vs 7,7% por paciente y 50% vs 9,1% por transfer, respectivamente). No hubo diferencias en la tasa de implantación (11,1% vs 30,4%) ($p=0,25$). Estos resultados preliminares en esta pequeña muestra de pacientes con Baja Respuesta animan a continuar investigando la eficacia del parche de testosterona en el manejo de estas pacientes

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2013; 30; xxx-xxx © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana

Palabras Clave: *Baja respuesta, FIV, Testosterona, Letrozole, Protocolo largo, protocolo corto.*

Aceptado definitivamente: 23/11/12

Francisca Martínez, Salud de la mujer Dexeus, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción. Institut Universitari Dexeus. Barcelona. pacmar@dexeus.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: contacto@editorialmedica.com

SUMMARY

The purpose of this study was to compare two treatment protocols of women with a history of poor response (PR) in IVF: ovarian stimulation with gonadotropins in long protocol and transdermal testosterone patches versus short protocol with antagonists and letrozole. A total of 26 patients \leq 40 years and basal FSH <11 U/L were included, 13 in each group of treatment. No differences were found between both groups in the estradiol levels on hCG day, number of oocytes retrieved or number and mean quality of the transferred embryos. Plasma testosterone levels were significantly higher in the Patch group before starting ovarian stimulation, and LH levels were significantly higher in the Letrozole group on days 1 and 5 of ovarian stimulation with gonadotropins. The pregnancy rate was significantly higher in the Patch group, $p=0.045$ (46.2% vs 7.7% per patient and 50% vs 9.1% per transfer, respectively) and no significant difference was found in the implantation rate (11.1% vs 30.4%) ($p=0.25$). These preliminary results in a small sample of poor responder patients and normal ovarian reserve by FSH levels, encourage us to continue investigating the efficacy of the testosterone patch in the management of PR.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2013; 30; xxx-xxx © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *Low response, FIV, Testosterone, Letrozole, long Protocol, short protocol*

INTRODUCCIÓN

La baja respuesta (BR) a la estimulación en Fecundación in Vitro (FIV) continúa siendo uno de las mayores preocupaciones, pues limita considerablemente las posibilidades de conseguir un embarazo mediante Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Se estima una incidencia de BR del 5,6-35,1% de todos los ciclos de estimulación (1, 2, 3) comprendiendo un grupo heterogéneo de mujeres, en el que los tests de reserva ovárica no predicen de manera fiable y consistente la baja respuesta, en algunos casos .

Generalmente se atribuye la BR a la disminución de la reserva ovárica (RO) y a la edad materna avanzada. No obstante, algunas mujeres con edad < 40 años y niveles basales de FSH normales pueden presentar BR a una estimulación intensa con gonadotropinas, siendo la respuesta al tratamiento de estimulación el test definitivo (4, 5). Se han propuesto numerosas estrategias ante la BR para aumentar el número de ovocitos y las posibilidades de embarazo (6, 7) aunque ninguna con resultados incuestionables (8). Una dificultad importante de los diversos meta-análisis realizados sobre estrategias para tratar la BR radica en la heterogeneidad de los criterios utilizados para definir las poblaciones incluidas en los estudios (9) que ha motivado una propuesta de unificación recientemente (10).

En los últimos años se viene proponiendo la androgenización ovárica como estrategia para abordar la BR.

Los andrógenos juegan un papel como reguladores positivos del desarrollo folicular con efectos sinérgicos con la FSH en la foliculogénesis (11) y al aumentar las concentra-

ciones intraováricas de andrógenos en pacientes con BR se contribuiría a aumentar el número y la madurez de los ovocitos obtenidos tras la estimulación ovárica. En FIV, se puede obtener el aumento de andrógenos mediante la inhibición de la aromataasa con letrozole (12, 13) que permitiría el acúmulo de andrógeno intrafolicular, o mediante la administración sistémica de testosterona (14, 15). También se ha utilizado la suplementación con DHEA (16), aunque éste es un tratamiento no autorizado en muchos países de la Comunidad Europea.

El objetivo de este estudio es comparar dos protocolos de tratamiento de las mujeres con antecedente de BR en el Programa de FIV del Institut Universitari Dexeus: estimulación de la ovulación con gonadotropinas en protocolo largo y parche de testosterona versus gonadotropinas en protocolo corto con antagonista y letrozole.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre enero 2009 y Junio 2011, se ha realizado un estudio piloto, prospectivo, comparativo en mujeres que habían presentado BR en un ciclo de FIV anterior en nuestro centro con un protocolo largo y dosis alta de gonadotropinas (> 3000 IU). Se definió como BR la recuperación de <4 ovocitos o cancelación por mala respuesta. Se incluyeron las mujeres con edad ≤ 40 años, ciclos regulares, FSH basal < 11 U/L, y se excluyeron las pacientes con endocrinopatía, $IMC > 30$, Endometriosis; >2 ciclos FIV previos cancelados. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Cátedra

de Investigación en Obstetricia y Ginecología del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción, Institut Universitari Dexeus, Barcelona. Las pacientes incluidas en el estudio, tras proporcionar el correspondiente consentimiento informado firmado, fueron asignadas de manera aleatoria, según tabla de generada por ordenador por la Unidad de Epidemiología, a uno de los dos grupos de tratamiento.

PROTOCOLO DE TRATAMIENTO

Grupo Parche: Supresión desde la fase lútea media del ciclo anterior, durante 14 días, con Leuprolide (Procrin®, Abbott Laboratorios, Madrid) 1 mg/día hasta hipofisectomía (estradiol < 50 pg/ml y ausencia de folículos > 10mm de diámetro) y 0.5 mg/día hasta día de HCG; tras confirmar supresión, se administró testosterona en parche, a razón de 1200µg/día (Testopatch® Pierre Fabré Ibérica, Barcelona), durante 5 días, antes de iniciar la estimulación con FSHr (Gonal F®, Serono, Madrid, Spain) s.c., a dosis de 450 IU y 300IU los días 1 y 2, y 150 IU los días 3 y 4, y luego según respuesta (15).

Grupo Letrozole: Las pacientes fueron pre-tratadas con anticonceptivo (Microdiol®, Organon, Madrid, Spain) 15-20 días. Tras 5 días sin tratamiento se comprobó la supresión mediante estradiol plasmático y ecografía y se inició la estimulación: Día 1 a Día 4 con 225 FSHr+150 HMG (Menopur®, Ferring, Madrid, Spain) y Letrozole (Femara®, Novartis, Barcelona, Spain) 2,5mg/día, 5 días; a partir del 5º día, la dosis de gonadotropinas se ajustó según la respuesta, y se inició la administración diaria de antagonista (Cetrotide®, Serono, Madrid, Spain) hasta cumplir los criterios para la administración de HCG (13).

Se administró una dosis de 250 mcg de hCG recombinante (Ovitrel®, Serono, Madrid, Spain) cuando se observaron al menos 2 folículos ≥18 mm. Se cancelaron los ciclos cuando se observaron < 4 folículos <14mm tras 14 días de estimulación intensa, y/ o no aumento de los niveles de estradiol y/o no crecimiento folicular en 3 días consecutivos.

Se realizaron los procedimientos habituales de punción, aspiración de ovocitos, inseminación según las características de la muestra de semen, y transferencia de un máximo de 3 embriones, 2-3 días después de la extracción (17). El apoyo de la fase lútea se realizó con progesterona vaginal, (Utrogestan®, Seid, Barcelona, Spain) 600 mg/día desde el día siguiente a la punción durante catorce días después, o tres semanas más si el resultado de beta-hCG fue positivo. La confirmación de embarazo se realizó mediante la presencia de saco gestacional y latido cardíaco en la ecografía.

Para las determinaciones hormonales se utilizaron electro-

chemiluminescence immunoassays, con reactivos y analizador automático Elecsys 1010 de la casa Roche Diagnostics.

Se determinaron los valores plasmáticos de Estradiol, FSH, LH, Progesterona y Testosterona el día de control de frenación, antes de iniciar la estimulación con gonadotropinas, y cada dos días, hasta el día de hCG.

La variable principal fue la incidencia de BR.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete IBM SPSS STATISTICS 20 análisis descriptivo de todas las variables cuantitativas utilizando su media y desviación típica. Para el análisis principal de eficacia se utilizó el Test exacto de Fisher e. Para los análisis secundarios se utilizaron pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) Todas las pruebas fueron bilaterales con un nivel de significación $\alpha=0.05$

RESULTADOS

En total se incluyeron 26 pacientes, 13 en cada grupo de tratamiento. Se descartaron 2 pacientes en el Grupo Letrozole (15,4%) y 1 en el Grupo Parche (7,7%). Ambos grupos de pacientes fueron homogéneos para la edad ($36,6\pm 3,1$ frente a $36,2\pm 1,8$), el IMC ($24,5\pm 2,0$ frente a $22,2,2\pm 3,8$), y los niveles de FSH basal ($7,95\pm 1,7$ IU/l vs $7,6 \pm 1,7$ IU/l).

No hubo diferencias en las características de la respuesta observada en ambos grupos de tratamiento en cuanto a niveles de estradiol el día de HCG y número de ovocitos recuperados. Las dosis de gonadotropinas utilizadas fueron significativamente mayores en el grupo del parche, a expensas probablemente del mayor número de días de tratamiento en el protocolo largo, aunque no alcanzó significación estadística (Tabla). Los niveles de Testosterona plasmática fueron significativamente más altos en el grupo del parche, antes de iniciar la estimulación (al 5º día de tratamiento con el parche de testosterona), y los niveles de LH significativamente más elevados en el grupo de Letrozole los días 1º y 5º de estimulación con gonadotropinas, antes del inicio del antagonista.

No hubo diferencias en el número ni en la calidad media de los embriones transferidos. Se realizaron 23 punciones y transferencias embrionarias y se obtuvieron 6 embarazos en el grupo del parche y 1 embarazo en el grupo de Letrozole. La tasa de embarazo fue significativamente superior en el grupo del parche, $p= 0.045$ ($46,2\%$ vs $7,7\%$ por paciente y 50% vs $9,1\%$ por transfer, respectivamente) y no hubo diferencia significativa en la tasa de implantación, ($11,1\%$ vs $30,4\%$) ($p=0.25$). Se observó un aborto en la semana 7ª de gestación en el grupo del parche ($16,7\%$). (Tabla)

TABLA		
Características generales de las pacientes y resultados del tratamiento		
	Grupo Letrozole N=13	Grupo Parche N=13
Edad	36,55±3,078	36,17±1,850
IMC	24,5±2	22,2±3,8
FSH	7,95±1,7	7,6±1,7
RFA	6,8±2,1	9,1±2,8
Ciclos previos	1,4±0,6	1,3±0,9
Cancelación	2(15,4%)	1(7,7%)
Dosis total gonadotropinas IU	2252±575	3400±1257*
Días de estimulación	9,82±2,09	11,25±2,21
Estradiol (pg/ml) Día +1	61,11±66,36	15,38 ±8,71
Día HCG	1782,24±1324,83	1267,10±734,48
Testosterona basal (ng/ml)	0,69±0,65	0,70±0,56
Día +1	0,40±0,24	5,83±5,55*
Día HCG	1,33±0,47	1,09±0,97
LH basal (IU/l) Día +1	3,20±2,94	1,94±0,66
Día +5	6,48±2,69*	1,66±0,46
Día HCG	2,42±2,37	2,56±1,22
Número de ovocitos recuperados	6,73±4,35	5,08±2,02
Número de ovocitos Fecundados	3,73±2,15	2,75±1,54
Embriones evolutivos	2,82±1,78	2,33±1,07
Embriones transferidos	1,64±0,81	1,92±0,67
Calidad embrionaria	6.92±1.60	6.32±1.76
Embarazos	1	6
% paciente	7,7%	46,2%
% transfer	9,1%	50%

DISCUSIÓN

Este estudio comparativo de dos protocolos de androgenización ovárica en estimulación para FIV en pacientes con antecedente de baja respuesta y Reserva Ovárica normal, muestra un efecto beneficioso de la administración de testosterona transdérmica en protocolo largo respecto a un inhibidor de la aromatasa en protocolo con antagonista, permitiendo obtener una tasa de embarazo significativamente mayor.

No se observaron diferencias significativas en las características generales de la respuesta obtenida con cualquiera de los dos protocolos.

Este estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar el pequeño tamaño de la muestra, pero fue concebido como estudio piloto previo al diseño de un estudio prospectivo, y tras el análisis preliminar de estos resultados se planteará continuar con la androgenización exógena para mejorar la respuesta en la BR. No se dispone de información de los ni-

veles previos de AMH, pues en el momento del inicio no se realizaba de manera rutinaria en nuestro centro. El Recuento total de Folículos Antrales (RFA) no fue significativamente diferente, aunque en el Grupo Letrozole fue $6,8 \pm 2,1$ que en nuestra experiencia se correlaciona con menor probabilidad de embarazo (18).

Decidimos incluir en el estudio comparativo sólo las pacientes ≤ 40 años con niveles de FSH < 11 IU/l porque había sido observado un efecto beneficioso claramente evidente en este grupo (15). En nuestro estudio, las pacientes sólo habían presentado un antecedente de BR. Según Peñarrubia y cols (5), el antecedente de mala respuesta es el mejor predictor de BR en un ciclo posterior que la edad o la FSH basal. Aunque se ha descrito que la posibilidad de una nueva BR en el segundo ciclo es del 62,4% es decir, que casi un 40% podría responder con normalidad.(19)

En esta población con RO normal y antecedente de BR, los dos protocolos permitieron alcanzar niveles de estradiol el día de hCG >1200 pg/ml. La duración del tratamiento con gonadotropinas y la dosis total fue significativamente mayor en el grupo del parche, probablemente por tratarse de un protocolo largo, pero similares a los observados por Fábregues y cols (15), así como el número de ovocitos totales obtenidos.

No se incluyeron pacientes con RO claramente reducida, o que hubieran mostrado BR repetidamente. Se considera que pacientes de FIV con RO normal deben responder con 8-10 ovocitos tras estimulación con protocolo estándar, y que las mejores probabilidades de embarazo se dan cuando se obtienen entre 15 y 20 ovocitos (20). En nuestra población se obtuvieron 5-6 ovocitos de promedio tras unas dosis de 2200-3400 IU, lo que sugiere que se trata verdaderamente de una población de BR.

Lo más llamativo de este estudio fue la diferencia observada en la tasa de embarazo clínico. No se detectaron características de la respuesta que contribuyan a explicar esta diferencia, particularmente en cuanto al número de ovocitos y el número y la calidad de los embriones transferidos. Creemos que esta diferencia no está relacionado con el tipo de gonadotropina utilizada, FSHr o FSH+HMG, ya que en un metanálisis reciente no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la tasa de embarazo/nacido-vivo, entre las dos gonadotropinas (21)

Sin embargo podría estar relacionada con dos aspectos. Por un lado con el efecto beneficioso de los niveles de testosterona alcanzados en el grupo del Parche tras 5 días de impregnación, al inicio de la estimulación. Apuntaría hacia un efecto más beneficioso sobre el proceso de crecimiento folicular del tratamiento con esta dosis y duración del tratamiento con testosterona exógena, antes de iniciar la estimulación, que del aumento de andrógeno intraovárico

inducido por el Letrozole durante el tratamiento con gonadotropinas. Este efecto ya fue postulado (14,15), y reconocido en un estudio posterior (22) y corroborado en un metanálisis reciente (23) aunque cuestionado por otros (24, 25). Por otro lado, también podría estar relacionado con los efectos beneficiosos de una mejor supresión de los niveles de LH obtenida con el protocolo largo comparado con los niveles más altos observados en el grupo de Letrozole antes del inicio del tratamiento con el antagonista, junto con la breve impregnación androgénica. La impregnación androgénica habría contribuido al reclutamiento de una población de folículos “más sanos” y la obtención de un endometrio “más receptivo”, explicando así un efecto beneficioso del tratamiento con agonista en el protocolo largo frente al protocolo con antagonistas (26). Además, los elevados niveles séricos de LH en la fase precoz de la estimulación observada en el grupo de letrozole podrían ser responsables de la maduración avanzada del endometrio, que induciría un cierre temprano de la ventana de implantación a través de la expresión precoz de receptores de progesterona en la fase folicular y a la regulación a la baja de los receptores de E2 por la exposición a niveles suprafsiológicos de hormonas esteroideas (27). Se ha atribuido a los cambios muy pronunciados (ya sea en aumento o disminución) en los niveles de LH, el impacto en la probabilidad de embarazo clínico durante la administración de GnRH-ant (28). Aunque más recientemente se ha demostrado que no hay diferencias en las tasas de embarazo obtenidas con ambos tipos de análogos de la GnRH (29). En nuestro estudio no se confirmaron los resultados reportados previamente para el tratamiento con letrozole (13).

La principal limitación de este estudio es que se comparan dos formas de androgenización, y dos protocolos con filosofías diferentes (protocolo largo versus antagonistas, y FSHr vs FSH+HMG) en un pequeño número de pacientes, caracterizadas por haber presentado baja respuesta, y RO normal según los niveles de FSH, pero no se dispone de datos del RFA ni de los niveles de AMH. Sin embargo, consideramos destacables estos resultados preliminares tan prometedores, ya que nos animan a continuar investigando la eficacia del parche de testosterona en el tratamiento de la baja respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Biljan MM, Buckett WM, Dean N, Phillips SJ, Tan SL. The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Hum Reprod.* 2000 Oct;15(10):2140-4.
2. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2003 Jan-Feb;9(1):61-76. Review
3. Devesa M, Coroleu B, Martínez F, Tur R, Rodríguez I, Barri PN.

- Poor prognosis for ovarian response to stimulation: results of a prospective randomized trial comparing the flare-up GnRH agonist protocol vs. the antagonist protocol. *Gynecol Endocrinol*, 2010 ; 26 (7):509-15.
4. **Klinkert ER, Broekmans FJM, Looman CWN, te Velde ER.** A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril*, 2004; 81:1247-1253
 5. **Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Carmona F, Casamitjana R, Vanrell JA, Balasch J.** Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod* 2005; 20: 622-628
 6. **Barri PN, Coroleu B, Martínez F, Veiga A.** Stimulation protocols for poor responders and aged women. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166 (1):15-16
 7. **Surrey E.** Management of the poor responder: the role of GnRH agonist and antagonists. *J Assist Reprod Genet*, 2007; 24:613-619
 8. **Kyrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanicolaou EG, Bontis J, Tarlatzis BC.** How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 2009; 91:749-66
 9. **Polyzos NP, Devroey P.A.** Systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1058-61.e7.
 10. **Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L.** ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011 Jul;26 (7):1616-24. Epub 2011 Apr 19.
 11. **Fanchin R, Frydman N, Even M, Berwanger da Silva AL, Grynberg M, Ayoubi JM.** Androgens and poor responders: are we ready to take the plunge into clinical therapy? *Fertil Steril*. 2011 Nov; 96 (5):1062-5. Review.
 12. **Casper RF, Mitwally MF.** Review: aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(3):760-71
 13. **Garcia-Velasco JA, Moreno L, Pacheco A, Guillén A, Duque L, Requena A, Pellicer A.** The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril*. 2005 Jul; 84 (1): 82-7.
 14. **Balasch J, Fábregues F, Peñarrubia J, Carmona F, Casamitjana R, Creus M, Manau D, Casals G, Vanrell JA.** Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Hum Reprod* 2006; 21 (7): 1884-93.
 15. **Fábregues F, Peñarrubia J, Creus M, Manau D, Casals G, Carmona F, Balasch J.** Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. *Hum Reprod*, 2009; 24:349-359
 16. **Barad D, Gleicher N.** Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF. *Hum Reprod* 2006; 21:2845-9
 17. **Coroleu B, Carreras O, Veiga A et al.** Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* ;2000; 15:616-620
 18. **Barri Soldevila PN, Carreras O, Tur R, Coroleu B, Barri PN.** Sonographic assessment of ovarian reserve. Its correlation with outcome of in vitro fertilization cycles. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23:206-12
 19. **Klinkert ER, Frank JM, Broekmans FJ, Casper WN, Looman M, Te Velde ER.** A poor response in the first cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1247-1253
 20. **Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A.** Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod*. 2011 Jul;26(7):1768-74. Epub 2011 May 10.
 21. **Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar MA, Manssur RT, Seirour GI.** Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25:372-8
 22. **Kim C-H, Howles CM, Lee H-A.** The effect of transdermal testosterone gel pretreatment on controlled ovarian stimulation and IVF outcome in low responders. *Fertil Steril*, 2011; 95:679-683
 23. **Bosdou JK, Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Zepiridis L, Tarlatzis BC.** The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012 Mar;18(2):127-45. Epub 2012 Feb 3.
 24. **Massin N, Cedrin-Durnerin I, Coussieu C, Galey-Fontaine J, Wolf JP, Hughes JN.** Effects of transdermal testosterone application on the ovarian response to FSH in poor responders undergoing assisted reproductive-technique- a prospective randomized, double blind study. *Hum Reprod* 2006, 21:1204-1211
 25. **Sipe CS, Thomas MR, Stegmann BJ, Van Voorhis BJ.** Effects of exogenous testosterone supplementation in gonadotrophin stimulated cycles. *Hum Reprod*. 2010 ;25(3):690-6.
 26. **Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M.** Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jul 19;3:CD001750. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jul 19;3:CD001750.
 27. **Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P.** Initiation of gonadotropin-releasing hormone antagonist on day 1 as compared to day 6 of stimulation: effect on hormonal levels and follicular development in in vitro fertilization cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(12):5632-5637.
 28. **Huirne JA, van Loenen AC, Schats R, McDonnell J, Hompes PG, Schoemaker J, Homburg R, Lambalk CB.** Dose-finding study of daily GnRH antagonist for the prevention of premature LH surges in IVF/ICSI patients: optimal changes in LH and progesterone for clinical pregnancy. *Hum Reprod* 2005, 20(2):359-36
 29. **Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM.** Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 May 11;(5):CD001750.