

Reproducción Asistida

Estudio comparativo entre dos protocolos de supresión hipofisaria en hiperestimulación ovárica controlada para fecundación in vitro

Comparative study between two pituitary suppression protocols in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization

Moraga R, Saucedo E, García-Gimeno T, Rodenas JJ, Monzó A, Romeu A

Servicio de Ginecología (Reproducción Humana). Hospital Universitari La Fe. Valencia

Resumen

Introducción. *El uso de fármacos agonistas de GnRH ha supuesto una importante mejora en la efectividad de los protocolos de estimulación ovárica utilizados para fecundación in vitro, aumentando las tasas de recuperación de ovocitos totales y metafase II y las tasas de embarazo, y disminuyendo la tasa de cancelación por pico prematuro de LH. Los antagonistas de GnRH han surgido como una alternativa en la prevención de picos endógenos de LH, con un mecanismo de acción distinto, atribuyéndose algunas ventajas, como necesidad de menores dosis de gonadotropinas y menor incidencia de síndrome de hiperestimulación ovárica, sin cambios significativos en las tasas de embarazo.*

Objetivos. *Comparar los resultados de la administración de nafarelina en protocolo largo con cetorelix en hiperestimulación ovárica controlada para fecundación in vitro.*

Material y métodos. *351 pacientes que iniciaron una hiperestimulación ovárica controlada para fecundación in vitro. 250 pacientes recibieron 200 mcg cada 12 horas de nafarelina por vía intranasal desde la fase lútea media del ciclo anterior hasta la administración de hCG. 101 pacientes recibieron cetorelix a dosis de 0.25 mg diarios por vía subcutánea desde que se observó al menos un folículo mayor de 14 mm hasta el día de la administración de hCG. Estimulación ovárica con 150-450 UI/día de FSH recombinante en 263 pacientes o con una combinación de FSH+hMG en 88 casos, individualizando dosis en función de las características de la paciente y de la respuesta ovárica. Comparación de características clínicas, de los protocolos de estimulación ovárica (dosis total de FSH, días de estimulación, número de folículos) y de los resultados de la estimulación ovárica: número y calidad de los ovocitos obtenidos, características del semen, tasas de fecundación y gestación*

Resultados. *No se observó diferencias significativas en las características clínicas de las pacientes, ni en los parámetros seminales. Los días de estimulación, la dosis total de FSH, número de folículos, ovocitos totales y ovocitos metafase II fueron significativamente mayores en los ciclos en que se utilizó nafarelina. No se observó diferencias significativas en las tasas de fecundación en FIV o en ICSI entre los dos grupos. La tasa de gestación fue de 33,5% en las pacientes tratadas con nafarelina y de 29,3% en las pacientes tratadas con cetorelix ($p=0,290$).*

Correspondencia: Dr. Alberto Romeu
Servicio de Ginecología (Reproducción Humana)
Hospital Universitari La Fe
Avda. Campanar, 21
46009, Valencia
E-mail: romeu_alb@gva.es

Conclusión: La supresión hipofisaria con cetorelix para la prevención de un pico prematuro de LH en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada proporciona resultados similares a la supresión con nafarelina en cuanto a tasas de fecundación y gestación.

Palabras clave: Antagonistas de la GnRH. Análogos de la GnRH. Fecundación in Vitro.

Summary

Introduction: The use of GnRH agonist is very important in the ovarian stimulation protocols effect for in vitro fertilization, to increase the oocyte and metaphase II(MII) recover and pregnancy rates and decreasing the cancelation rate in early LH surge. Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) antagonist, appears as an alternative to prevent endogenous LH surge with a different action and with some advantages such as less gonadotrophin doses, less ovarian hiperestimulation syndrome and without significant changes in pregnancy rates.

Objetivo: To compare Nafarelin administration results in large protocol with cetorelix in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization.

Material and Methods: 351 patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. 250 patients with Nafarelin 200 mcg every 12 hours, intranasal administration since last luteal phase in previous cycle until hCG day administration. 101 patients with 0,25 mg of cetorelix subcutaneous daily since at least a follicle bigger than 14 mm of diameter was measured until hCG day administration. Ovarian stimulation with 150-450 UI/day FSH recombinant (FSHr) in 263 patients or a combination of FSH-hMG in 88 patients, according to patient characteristics and ovarian response. Comparing clinic characteristics, ovarian stimulation protocols (total FSH doses, stimulation days, follicles number) and ovarian stimulation results: number and quality recovered oocytes, seminal parameters and fertilization and pregnancy rates.

Results: No significant difference was observed in clinic characteristics or seminal parameters. Stimulation days, total FSH doses, follicles number, oocytes number and MII number was significantly higher in Nafarelin cycles. No significant differences in fertilization and pregnancy rates in FIV or ICSI between both groups. Pregnancy rate was 33,5% in patients with Nafarelin and 29,3% in patients with cetorelix (p=0,290).

Conclusión: Pituitary suppression with cetorelix to prevent early LH surge in controlled ovarian hyperstimulation cycles is similar to nafarelin supresión in order to fertilization and pregnancy rates.

Key words: Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) antagonist. GnRH agonist. IVF.

INTRODUCCIÓN

La estimulación farmacológica del desarrollo folicular ha sido uno de los mayores avances en el tratamiento de la esterilidad en la segunda mitad del siglo XX.

Un aspecto de la estimulación folicular sobre el que se ha de prestar gran atención es la posibilidad de que ocurra durante la misma elevaciones de LH de forma prematura antes de que los folículos alcancen el desarrollo óptimo para inducir la maduración ovocitaria y la luteinización con inyección de hCG, lo que conlleva un impacto negativo en la calidad de los ovocitos y embriones, y consecuentemente en la tasa de embarazos. (1,2)

La aparición de los agonistas GnRH y su aplica-

ción en los ciclos de estimulación ovárica ha jugado un importante papel en la reducción de la incidencia de los picos prematuros de LH por el bloqueo reversible que producen, de la secreción de gonadotrofinas por la hipófisis. Como resultado, la tasa de cancelaciones de ciclos de estimulación han disminuido y la de embarazos ha aumentado. (3)

Estos agonistas, inicialmente, inducen un aumento en la liberación de LH y FSH desde la hipófisis y un aumento en el número de receptores LHRH en la misma. Posteriormente, si la administración se mantiene, se produce un efecto contrario por internalización del complejo agonista-receptor, y se produce un descenso del número de receptores, y como consecuencia de estos efectos, ocurre una supresión paradójica de la

síntesis y liberación de gonadotrofinas hipofisarias (desensibilización). (4)

Administrados solos, la hipófisis llega a ser refractaria al efecto estimulador de la GHRH, y el decreciente nivel de LH y FSH lleva a un frenado en el desarrollo folicular. (4)

Esta supresión en la liberación de gonadotrofinas es seguida de una disminución de los niveles de hormonas sexuales a rangos de hipogonadismo, siendo este fenómeno la base del uso clínico de los agonistas GnRH.

El bloqueo hipofisario persiste durante el tratamiento con agonistas GnRH, pero es completamente reversible tras el cese del tratamiento, restableciéndose un ciclo menstrual normal tras un intervalo aproximado de 6 semanas. (5)

Es importante tener en cuenta que el efecto supresor del tratamiento continuo con agonista GnRH, siempre está precedido de una fase estimuladora inicial en la que la LH y FSH son secretadas en niveles suprafisiológicos. Durante un período de 12 horas se produce un aumento de 5 veces los niveles circulantes de FSH, 10 veces los de LH y 4 veces los de estradiol, para, posteriormente, producirse una disminución continua de los niveles hormonales. (6)

A pesar de su efecto indeseable de "flare up" los agonistas GnRH han llegado a ser el tratamiento indispensable en aquellas condiciones en las que una continua o limitada situación terapéutica de hipogonadismo está indicada, como ocurre en el tratamiento de la endometriosis, miomas uterinos, carcinoma de mama con receptores estrogénicos positivos, carcinoma de próstata, pubertad precoz y para el tratamiento de infertilidad. También han demostrado su utilidad en determinados tratamientos de la esterilidad. (4)

Antes de la aplicación de los agonistas GnRH, aproximadamente el 20% de los ciclos de estimulación para fecundación in vitro (FIV) eran cancelados debido a picos prematuros de LH, consiguiéndose con su aplicación una reducción de este porcentaje a un 2% de cancelaciones y un aumento de la eficacia en términos de tasa de fertilización y embarazos. (7)

Sin embargo, el uso de los agonistas no esta libre de desventajas. El protocolo largo de administración de análogo GnRH, que es el más eficaz (8), necesita 2-3 semanas para la desensibilización y conlleva relativamente un mayor coste debido al mayor requerimiento de inyecciones de gonadotrofinas y de determinaciones hormonales y ecográficas en el control del ciclo de estimulación. (9)

Los antagonistas GnRH han emergido como una alternativa en la prevención de los picos prematuros de LH en los ciclos de estimulación ovárica. Su mecanismo de acción es distinto al del agonista.

Algunos autores han sugerido que se requiere una curva de aprendizaje para poder llegar a contrastar resultados entre diferentes estudios. (10)

Mientras el agonista GnRH actúa tras administración crónica a través de un agotamiento de la acción hormona-receptor y desensibilización de las células gonadotrópicas, el antagonista se une competitivamente a los receptores y así previene el efecto estimulador de la GnRH endógena en las células hipofisarias. El bloqueo competitivo de los receptores conlleva una inmediata anulación de la secreción de gonadotrofinas. (7)

Este mecanismo de acción es dependiente del equilibrio entre el GnRH endógeno y el antagonista aplicado.

El efecto antagonista es altamente dosis dependiente en contraste con el agonista. (11)

La primera generación de los antagonistas, se caracterizaba principalmente por modificaciones en las posiciones 2 y 3 en la secuencia de aminoácidos de la LHRH nativa, pero eran necesarias altas dosis para conseguir una caída en las gonadotrofinas y hormonas sexuales in vivo. (12)

Posteriormente se realizaron modificaciones en las posiciones 1 y 6, introduciéndose más tarde la D-arginina en posición 6, aumentando la actividad inhibitoria de estas moléculas. Sin embargo, aparecieron efectos adversos de tipo alérgico que variaban desde un eritema local e induraciones hasta la formación de un edema generalizado y reacciones anafilactoides, con lo que se impidió su uso clínico. (13)

Estos efectos alérgicos eran atribuidos a la liberación de histamina, debido a la existencia de receptores de LHRH en granulocitos, los cuales degranulaban tras la interacción con los antagonistas básicos. (14)

El antagonista ideal debería tener gran potencia, larga duración de acción y no tener efectos adversos relevantes. A estas características se aproximan las últimas generaciones de antagonistas, como el ganirelix y el cetorelix, que han sido autorizados recientemente para su uso clínico. (15)

Aplicando el antagonista GnRH en el ciclo de estimulación ovárica en reproducción asistida, se produce una reducción importante en la duración del tratamiento con análogos GnRH y reduce la cantidad de gonadotrofina necesaria para la estimulación. Otros beneficios teóricos incluirían un menor riesgo para desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica y síntomas de privación estrogénica como frecuentemente se observa en la fase previa a la estimulación de un protocolo largo con análogo GnRH. (16)

En un metaanálisis reciente (16), en el que se realizó una revisión sistemática de múltiples estudios

randomizados, con la finalidad de valorar la eficacia del régimen con antagonista y compararlo con el protocolo largo con agonista en estimulación ovárica controlada para reproducción asistida, se ha llegado a una serie de resultados importantes. Por una parte se concluyó que no hay diferencias estadísticas entre el agonista de GnRH y el antagonista en la prevención del pico prematuro de LH; ocurre lo mismo con respecto a la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica severo. Se observa, además, una ligeramente menor tasa de de embarazo con el uso de antagonista, que no alcanza significación estadística.

El objetivo principal del presente estudio es comparar los resultados del uso de un antagonista de última generación: Cetrorelix (cetrotide, Lab. Serono-Madrid) con los obtenidos con el uso de un agonista GnRH: Synarel® (nafarelina, Lab. Seid, Barcelona) en protocolos largos de estimulación ovárica para reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo y comparativo realizado en pacientes sometidas a fecundación in vitro (FIV) y/o inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) en el Servicio de Reproducción del Hospital Universitario "La Fe" de Valencia.

El grupo de población estudiado lo constituían 351 mujeres, las cuales fueron sometidas a técnicas de reproducción asistida (FIV o ICSI), distinguiendo dos subgrupos en esta población:

- a) 250 pacientes que recibieron: nafarelina (Synarel®), Lab. Seid) con protocolos largo: 200 mcg cada 12 horas comenzando en la fase lútea tardía del ciclo anterior y prolongando su administración hasta la administración de la HCG.
- b) 101 pacientes que recibieron cetrorelix (Cetrotide®), Lab Serono) , a dosis de 0.25 mg al día comenzando la administración cuando se observó un folículo de al menos 14 mm, finalizando asimismo al administrar la HCG.

Se compararon los siguientes parámetros:

- a) Características de las mujeres estudiadas: Edad, Talla, Peso, Índice de masa corporal (IMC), duración de la esterilidad.
- b) Características de los protocolos de estimulación ovárica: Tipo de inductor de la ovulación utilizado, dosis y duración del tratamiento.
- c) Resultado de la estimulación ovárica: Número y tamaño de los folículos, niveles séricos de estra-

diol, espesor y calidad endometrial. Todos ellos evaluados el día de la administración de la HCG. Cantidad de folículos puncionados, número y calidad de los ovocitos obtenidos. Características del semen utilizado en FIV y/o ICSI: Concentración y motilidad precapacitación y recuento de espermatozoides móviles (REM) post-capacitado.

- d) Resultados de FIV/ICSI: Número de ovocitos inseminados ó microinyectados, tasas de fertilización y embarazo.
- e) Estimación de costos de la medicación empleada.

Se utilizó el programa PIERA para la recuperación de los datos de las pacientes y la versión 10 de SPSS para análisis estadístico. Se realizó un estudio descriptivo y, posteriormente, se utilizó el test de T de Student para comparar variables cuantitativas y el test de chi-cuadrado para variables cualitativas.

El procedimiento de reproducción asistida aplicado fue el siguiente:

Un grupo de pacientes fueron sometidas a un protocolo de supresión hipofisaria con nafarelina (Synarel, Lab. Seid, Barcelona) a dosis de 200 microgramos cada 12 horas, por vía intranasal, iniciándolo el día 22 del ciclo anterior; al otro grupo se le administró el antagonista cetrorelix (Cetrotide, Lab. Serono, Madrid) cuando tras estimular el ovario, se conseguía que uno de los folículos alcanzara los 14 mm de diámetro. Se estimuló el desarrollo folicular con diferentes protocolos de gonadotropinas: 263 casos con FSHr con dosis inicial dependiendo de las características de la paciente, que fue modificándose según comportamiento y 88 casos con combinación FSH-HMG a dosis inicial dependiendo de las características de la paciente, que fue modificándose según la respuesta del ovario.

Se realizaron mediciones del número y tamaño folicular así como determinaciones séricas de estradiol. Cuando se observó al menos 4 folículos mayores de 16 mm se administró 10,000 UI de HCG y se realizó aspiración folicular 35-36 horas después. Tras la aspiración y clasificación de los ovocitos se realizó la fecundación in vitro o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Se valoró la fecundación y se realizó la transferencia de 2 ó 3 embriones al segundo día de la aspiración. Se suplementó la fase lútea con 400 mg de progesterona vaginal.

Los criterios de cancelación fueron una baja respuesta, caracterizada por obtener menos de 3 folículos tras haber sido estimulado el ovario, o riesgo de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica, con cifras de estradiol sérico de mas de 3500 pg/mL.

RESULTADOS

Los dos grupos estudiados eran comparables por la edad, con una media de edad en el grupo de Synarel® de 33,2±3,3 años y de 33,5±3,6 en el grupo del Cetorelix®, por la talla, peso e índice de masa corporal (IMC).

No se observó diferencias en cuanto a los años de esterilidad de las parejas en estudio en los dos subgrupos valorados, encontrando una media de 7±3 años en el grupo del agonista y de 6.8±3.2 años en el grupo del antagonista, con un valor de p=0,605.

Las variables estudiadas sobre el ciclo de estimulación nos mostraron la existencia de diferencias significativas entre los dos subgrupos comparados:

Los días de estimulación ovárica y la dosis total de FSH en UI utilizadas en el ciclo de estimulación ovárica fueron significativamente menores cuando se utilizó cetorelix para el frenado hipofisario (Tabla 1).

No se observaron diferencias en cuanto al diámetro máximo de los folículos el día de administración de HCG, aunque el número total de folículos mayores de 16 mm fue significativamente superior en los grupos en que se utilizó nafarelina (Tabla 2).

Tabla 1

Comparación entre días de estimulación y total de gonadotropinas en UI. Entre los dos grupos

	Nafarelina N=231	Cetorelix N=86	P
Días de estimulación	9,5±2,3	8,5±1,7	0,001
Total de gonadotropinas	2185±1194	1358±1329	0,001

Tabla 2

Comparación entre número de folículos y diámetro folicular entre los dos grupos

	Nafarelina N=227	Cetorelix N=85	P
Número folículos > 16mm	8,6±3,6	6,9±3,4	P=0,001
Diámetro folicular	21,5±1,9	21,8±2,1	P=0,293

También se evidenció diferencia en cuanto a los niveles séricos de estradiol y en el grosor del endometrio el día de la administración de la HCG (Tabla 3).

Valorando el número de folículos puncionados, ovocitos aspirados y en metafase II, también se observó diferencias significativas a favor del grupo del nafarelina (Tabla 4).

Tabla 3

Comparación del estradiol el día de HCG y del grosor endometrial

	Nafarelina	Cetorelix	P
Estradiol día HCG	1755,2±1015,3	1230,7±536,6	P=0,001
Grosor endometrial	12,2±2,4	11,4±1,8	P=0,008

Tabla 4

Comparación de número de folículos aspirados y ovocitos recuperados dentro de los dos grupos

	Nafarelina	Cetorelix	P
Folículos puncionados	12,9±5,9	10,1±10,0	P=0,001
Ovocitos totales	10,8±6,1	8,2±5,6	P=0,001
Ovocitos Metafase II	6,7±4,8	5,1±4,1	P=0,007

Se observó diferencias significativas en cuanto a los ovocitos inseminados en un grupo u otro, pero no se evidenciaron diferencias en cuanto al número de ovocitos microinyectados en los dos grupos (Tabla 5).

No se encontró diferencias en las tasas de fecundación para FIV y para ICSI entre ambos grupos (Tabla 6).

Los dos subgrupos de población también eran comparables en cuanto a las características del semen, no evidenciándose diferencias en los valores de

Tabla 5

Diferencias entre ovocitos inseminados o microinyectados en los dos grupos

	Nafarelina	Cetorelix	P
Ovocitos inseminados	2,6±4,4	1,0±2,5	P=0,002
Ovocitos microinyectados	5,8±4,4	4,9±3,4	P=0,105

Tabla 6

Tasas de fecundación en FIV e ICSI, comparación entre ambos grupos

	Nafarelina	Cetorelix	P
Tasa fecundación FIV	60,4±41,2	35,0±37,4	P=0,099
Tasa fecundación ICSI	85,9±23,1	86,3±25,7	P=0,920

concentración de espermatozoides, motilidad en fresco de los mismos y en cuanto al REM y en cuanto al número de embriones transferidos (Tabla 7).

No se encontraron diferencias entre los dos grupos en lo que respecta al esquema de estimulación utilizado FSH recombinante sólo o asociada a HMG (Tabla 8).

Y finalmente, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la tasa de embarazos entre los dos grupos (Tabla 9). Ningún ciclo fue cancelado por el desencadenamiento de un pico prematuro de LH.

Tabla 7

Comparación de parámetros seminales y embriones transferidos en los dos grupos

	Nafarelina	Cetrorelix	
Concentración semen	32,7±29,1	29,6±31,9	P=0,432
Motilidad progresiva fresco	15,1±12,2	13,2±9,8	P=0,201
REM	22,2±22,3	24,0±21,9	P=0,690
Embriones transferidos	2,8±0,9	2,7±0,7	P=0,263

Tabla 8

Comparación de los protocolos de estimulación entre los dos grupos

	Nafarelina	Cetrotide	Total	
FSH	N=187*	N=76*	263	
FSH más hMG	N=45*	N=10*	55	
Total	232	86	318	P=0,069

* N= n° de casos

Tabla 9

Tasas de embarazo en ambos grupos

	Embarazo	N° Embarazo	Total
Nafarelina	N=75* 33,48%	N=149* 66,52%	224
Cetrotide	N=24* 29,26%	N=58* 70,74%	82
Total	99	207	306

P=0,290

* N=n° de casos

DISCUSIÓN

Uno de los principales motivos de cancelación de ciclos de estimulación ovárica es la posibilidad de que ocurra durante el mismo un pico de LH de forma prematura, antes de que los folículos alcancen el diámetro óptimo para inducir su ovulación con inyección de HCG, lo que conlleva un impacto negativo en la calidad de los ovocitos y embriones, y consecuentemente en la tasa de embarazos.(16)

En la actualidad disponemos de dos tipos de fármacos con los cuales se ha conseguido reducir el riesgo del pico prematuro de LH. Estos son los agonistas y los antagonistas de la GnRH. Y como consecuencia han sido múltiples los estudios que han surgido para comparar las ventajas e inconvenientes en la utilización de uno u otro, principalmente con los de más reciente introducción (13, 15), que son los antagonistas de la GnRH y entre ellos el cetrorelix.

En los múltiples trabajos realizados (9, 15, 16) se ha observado que la introducción del antagonista, tanto con un protocolo de dosis única alta (3mg) el día 6° ó 7° del ciclo de estimulación o de múltiples bajas dosis de 0.25mg/día desde el día 6° de estimulación hasta el día de la inducción de la ovulación con HCG, ha conllevado una reducción en el número de días necesarios de estimulación ovárica para obtener unos folículos adecuados para su punción y en la dosis total de gonadotropinas, resultado al que también se ha llegado en este estudio, con un número medio de días y de UI totales similar a lo descrito en la literatura (16).

En lo que respecta al objetivo principal del uso de estos agonistas y antagonistas, que es evitar la aparición de un pico prematuro de LH, nuestro estudio viene a apoyar lo que otros muchos ya han aportado, y sobre todo un metanálisis reciente (16), y es la falta de diferencias en cuanto a la capacidad de prevención del pico prematuro de LH entre los antagonistas y los agonistas de la GnRH, ya que no se llegó a cancelar ningún ciclo por este motivo en ninguno de los dos grupos.

En nuestro estudio también se observa un menor número de folículos, ovocitos aspirados y metafases II obtenidos en los ciclos en los que se utilizó el antagonista de GnRH. Lo que crea una tendencia a favor de los agonistas GnRH por el mayor número de ovocitos y embriones obtenidos, que junto con las menores concentraciones séricas de estradiol alcanzadas durante la estimulación ovárica con el antagonista, puede apoyar la hipótesis de que el Cetrotide(®) interacciona a nivel de la foliculogénesis, formación de blastómeras y el desarrollo endometrial (17).

Como se ha podido demostrar, existen receptores de la GnRH en el ovocito y en el espermatozoide cuya estimulación por un agonista GnRH facilita su interacción y la fecundación (18), lo que podría contribuir a explicar el resultado obtenido en nuestro estudio, donde se observa que el número de ovocitos que se logra inseminar para FIV fue menor en el grupo del antagonista, diferencia que no se da cuando se salta el paso de la interacción ovocito-espermatozoide para la fertilización como ocurre en la ICSI donde el espermatozoide es microinyectado en el citoplasma del ovocito.

Al igual que en otros estudios (16), no se encuentran diferencias en la tasa de fecundación ni en la tasa de embarazos clínicos conseguidos en uno u otro grupo, aunque existan una pequeña diferencia en la tasa de embarazo a favor de los agonistas que no alcanza significación estadística.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Stanger JD, Yovich JL.:** Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet. Gynaecol* 1985; 92: 385-93.
2. **Loumaye E.:** The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1990; 5:357-76.
3. **Albano C, Smitz J, Camus M et al.:** Hormonal profile during the follicular phase in cycles stimulated with a combination of human menopausal gonadotrophin and gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix). *Hum Reprod* 1996; 11(10):2114-8.
4. **Reissmann Th, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally A.M, Schally A.V.:** Developmente and applicationas of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Hum Reprod* 1995; 18(8):1974-81.
5. **Gordon K, Danforth D.R, Williams R.F, Hodgen G.D.:** The combined use of GnRH antagonist with gonadotrophins or pulsatile GnRH in ovulation induction . London: 1993: 239.
6. **Lemay A, Maheux R, Faure N, Jean C, Fazekas A.T.A.:** Reversible hypogonadism induced by a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonists (Buserelin) as a new therapeutic approach for endometriosis. *Fertil Steril* 1984; 41: 863-71.
7. **Diedrich K, Diedrich C, Santos E et al.:** Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994; 9:788-91.
8. **Daya S.:** Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst. Rev* 2000; 2: CD001299.
9. **Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P et al.:** The single or dual administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril* 1994; 62:468-76.
10. **Kol S.:** Embryo implantation and GnRH antagonist: GnRH antagonist: GnRH antagonists in ART: lower embryo implantation? *Hum Reprod* 2000; 15:1881-2.
11. **Felberbaum RE, Reissmann T, Kupker W et al.:** Preserved pituitary response under ovarian stimulation with HMG and GnRH antagonist (Cetrorelix) in women with tubal infertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 1995; 61:151-5.
12. **Rivier JE.:** Novel antagonist of GnRH: A compendium of their physiochemical properties, activities, relative potencies and efficacy in humans. London: 1993: 13.
13. **Hahn DW, McGuire JL, Vale WW, Rivier J.:** Reproductive endocrine and Anaphylactoid Properties of an LHRH antagonist (OFR-18260). *Life Sci* 1985; 37:505-14.
14. **Kiesel L, Runnebaum B.:** Gonadotrophin.releasing hormon and Analoga. *Physiologic und Pharmakologie* 1992; 32:22-30.
15. **Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R.:** The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2mg. *Hum Reprod* 1998; 13:2411-4.
16. **Al-Inany H, Aboulghar M.:** GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17(4):874-85.
17. **Hernández E.:** Embryo implantation and GnRH antagonist: the Rubicon for GnRH antagonist. *Hum Reprod* 2000; 15:1211-6.
18. **Casan EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML.:** Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1377-81