



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

Androgênios em más respondedoras[☆]

Rejane Cristina Malavazzi Casare^{a,*}, Gilberto da Costa Freitas^a e Lídio Jair Centa^b

^a Projeto Alfa – Infertilidade Conjugal e Reprodução Assistida, São Paulo, SP, Brasil

^b Disciplina de Reprodução Humana, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 20 de maio de 2013

Aceito em 29 de setembro de 2013

On-line em 6 de novembro de 2013

Palavras-chave:

Indução da ovulação

Androgênios

Testosterona

Fertilização in vitro

Gonadotrofinas

Estimulação ovariana

R E S U M O

O tratamento de estímulo ovariano das pacientes más respondedoras é um desafio na medicina reprodutiva.

Objetivo: Avaliar o efeito sinérgico dos androgênios na foliculogênese ao promover um aumento na sensibilidade ovariana ao hormônio foliculo estimulante (FSH) e resposta folicular às gonadotrofinas.

Método: Revisão de literatura que avaliou a resposta ovariana com o uso de androgênios previamente ao início do estímulo ovariano de pacientes más respondedoras que se submeteriam a ciclo de FIV (fertilização in vitro).

Resultados: A maioria dos artigos mostrou um aumento na resposta ovariana com maior número de óocitos recuperados e maduros em mulheres que usaram a testosterona transdérmica. Além disso, houve aumento de taxas de gestações clínicas e nascidos vivos. Mulheres que receberam dehidroepiandrosterona (DHEA), inibidores da aromatase, hormônio luteinizante recombinante (LHR) ou hormônio gonadotrófico humano recombinante (hCGr) não tiveram diferenças dos parâmetros estudados.

Conclusão: O tratamento prévio com testosterona transdérmica parece melhorar a resposta ovariana nas pacientes más respondedoras. Ela aumentou a taxa de gestação clínica e de nascidos vivos. Não houve prova de benefícios com o uso de DHEA, inibidores da aromatase, LHR ou hCGr.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

Androgens in poor responders

A B S T R A C T

Treatment of poor-responder patients to controlled ovarian stimulation is a challenge in reproductive technology.

Objective: To evaluate some synergistic effects in folliculogenesis by improving the ovarian sensitivity to FSH (Follicle Stimulating Hormone) and follicular response to gonadotrophins.

Method: A literature review that evaluated the use of androgens in ovarian response of pretreatment of ovarian stimulation on low-responder IVF (In Vitro Fertilization) patients.

Results: The most articles showed an increase on ovarian response in patients who used transdermic testosterone before ovarian stimulation. Those women achieved greater

Keywords:

Ovulation induction

Androgens

Testosterone

Fertilization in vitro

Gonadotrophins

Ovarian stimulation

[☆] Trabalho realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e no Projeto Alfa, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: rejane.casare@hotmail.com (R.C.M. Casare).

number of recovered oocytes and more mature ones in women who used transdermal testosterone. In addition, it increased clinical pregnancy and live birth rates. Women who received DHEA (dehydroepiandrosterone), aromatase inhibitors, rLH (recombinant luteinizing hormone) or rhCG (recombinant gonadotropin releasing hormone) showed no significant differences in studied parameters.

Conclusion: Pretreatment with transdermal testosterone seems to be beneficial to ovarian response on poor-responder patients. It has increased clinical pregnancy and live birth rates. There were no benefits with use of rLH, hCG, DHEA or aromatase inhibitors proved in those studies.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

Introdução

A resposta ao estímulo ovariano é uma das peças-chave na reprodução assistida. Apesar dos recentes avanços das técnicas, as pacientes más respondedoras ainda representam um desafio para os médicos da especialidade.^{1,2} A incidência de baixa resposta ovariana varia de 9% a 24% da população estudada³ e acontece principalmente em mulheres com idade acima de 40 anos, hormônio folículo estimulante (FSH) basal elevado (níveis maiores do que 10 mUI/ml, preferencialmente dosado no terceiro dia do ciclo menstrual), inibina B baixa, hormônio anti-Mülleriano (AMH) reduzido (independentemente da fase do ciclo), baixa contagem de folículos antrais (menor do que seis) e volume ovariano menor do que 3 cc. Além do baixo número de oócitos recuperados, a qualidade também pode estar comprometida, o que leva a menor taxa de implantação e de gravidez clínica, assim como a maior taxa de abortamentos em relação a mulheres com a mesma idade e com melhor resposta.⁴

Foram documentadas evidências da ação dos androgênios em altas doses em humanos. Spinder (1989)⁵ descreveram mudanças morfológicas em ovários de mulheres transexuais que faziam terapia hormonal com altas doses de testosterona exógena. Elas tiveram um aumento significativo de folículos antrais, que lembrou o padrão policístico. É importante lembrar que a síndrome dos ovários policísticos (SOP) não é considerada causa de hiperandrogenismo, como a hiperplasia congênita da adrenal ou os tumores produtores de androgênios. Pensando assim, os níveis de androgênios surgem como um possível marcador de correlação positiva com o número de folículos antrais.^{6,7}

Posteriormente, estudos experimentais feitos em macacos Rhesus sugeriram que os androgênios poderiam ampliar o efeito do FSH na foliculogênese.⁸ O uso de testosterona ou dehidrotestosterona (DHEA) nesses animais aumentaria o número de receptores do FSH nas membranas das células da granulosa.^{9,10} Assim, estimularia o crescimento inicial do folículo, faria um recrutamento precoce dos folículos primordiais⁴ e desenvolveria um maior número de folículos pré-antrais e antrais.¹¹

De acordo com a “teoria das duas células”, os androgênios exercem função crítica na regulação adequada da esteroidogênese.¹² Eles servem de substrato para a ação da aromatase nas células da granulosa, nas quais eles são convertidos em estrogênios. Além disso, podem exercer efeito direto na regulação da foliculogênese. Alguns receptores específicos

para androgênios que mediam a ação desses esteróides foram isolados por imuno-histoquímica no ovário humano.^{13,14} Também foi demonstrado que esses receptores androgênicos desaparecem progressivamente conforme a maturação folicular.¹⁵

Pensando nisso, foram feitos alguns estudos com o uso de androgênios antes da indução ovariana com o intuito de melhorar a resposta à estimulação ao FSH exógeno em pacientes classificadas anteriormente como “má respondedoras” ou com baixa reserva. Essas intervenções incluíram: pré-tratamento com testosterona transdérmica,¹⁶ pré-tratamento com DHEA,¹⁷ adição de inibidores da aromatase,¹⁸ associação de hormônio luteinizante recombinante (LHr)¹⁹ e adição de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na estimulação ovariana.^{20,21}

Os androgênios são produtos derivados do metabolismo do colesterol nas células da teca folicular pela ação do hormônio luteinizante (LH), convertido em estrogênio pela ação do FSH nas células da granulosa. Eles exercem função reguladora na maturação folicular e podem estimular o crescimento ou causar a atresia do folículo.²²⁻²⁵ A produção de estrogênios é limitada pela quantidade de receptores para os androgênios produzidos pela teca, que servem de substrato para a aromatização induzida pelo FSH.

Estudos clínicos têm demonstrado que o tratamento conjunto de androgênios poderia aumentar tanto a quantidade quanto a qualidade dos oócitos e embriões, aumentar as taxas de gestação de mulheres com baixa reserva ovariana e até causar falência ovariana precoce (FOP).^{2,26} Resultados melhores de estímulo ovariano e até melhores taxas de gestação após o uso de inibidores da aromatase poderiam ser consequência do aumento de níveis androgênicos intrafoliculares pela indução dos receptores de FSH nas células da granulosa.^{18,27} Além disso, eles estão envolvidos no recrutamento dos folículos antrais e pré-antrais, promovem o crescimento e desenvolvimento folicular e aumentam a expressão do IGF 1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) no ovário primata, que também exerce papel essencial no desenvolvimento folicular.^{4,11}

Os inibidores da aromatase poderiam causar aumento nos níveis intrafoliculares de androgênios e impedir a aromatização para estrogênios. Porém, Mitwally e Casper (2002),¹⁸ Kashyap et al. (2005)²⁸ e Ozmen et al. (2009)²⁹ não encontraram resultado significativo.

A ação do LHr também é fundamental para manter a concentração adequada de androgênios intrafoliculares e promover a esteroidogênese e o crescimento folicular. Também foi sugerido que o uso de análogos agonistas do hormônio

liberador de gonadotrofina (GnRH) com supressão do eixo hipotálamo-hipófise levaria a níveis extremamente baixos do LH endógeno e comprometeria a chance de gestação.^{30,31} Embora se acredite que o tratamento prévio com LHR³² ou a adição do LHR juntamente com as gonadotrofinas³³ possa trazer benefício para as más respondedoras,³⁴ seu uso ainda é controverso.

Foram estudados exaustivamente os efeitos biológicos dos androgênios, inclusive a modulação da aromatase nas diversas fases do desenvolvimento folicular. É vista uma ação estimulante em folículos pequenos, enquanto que em folículos pré-ovulatórios a aromatase é modulada negativamente.^{35,36} O excesso de androgênios na foliculogênese geralmente leva à atresia dos folículos em desenvolvimento em roedores.^{23,37}

Vendola (1998)¹¹ observaram em primatas sinergismo dos androgênios com o FSH, que aumentou o recrutamento folicular. Doses altas administradas por pouco tempo induziram mudança morfológica importante nos ovários, que passaram a ter aspecto policístico. A contagem de folículos antrais aumentou de 2,5 para 4,5, mas o número de folículos em desenvolvimento permaneceu inalterado.⁹ Weil (1999) mostraram o efeito benéfico no crescimento folicular dos androgênios, com aumento do número de receptores celulares de FSH nas células da granulosa. Junto com Vendola (1998)¹¹ sugeriram apoptose celular induzida por androgênios. Entretanto, estudos posteriores feitos por Zeleznik (2004)³⁸ não conseguiram comprovar relação positiva dos androgênios em ovários de primatas com o uso de modelo mais fisiológico.

Sabe-se que o pico de LH causado pela administração do hCG é capaz de promover o crescimento e completar o amadurecimento dos folículos pré-ovulatórios.^{39,40} Questiona-se, agora, se o uso do hCG durante o período de estímulo poderia trazer benefícios às más respondedoras. O objetivo deste estudo é buscar evidências na literatura sobre o uso de androgênios e a resposta ovariana à indução com gonadotrofinas exógenas previamente a ciclo de reprodução assistida de alta complexidade em fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

Método

Trata-se de revisão narrativa da literatura com consulta à base de dados do Medline/Pubmed e Cochrane, com o uso dos seguintes DeCS/MeSH: “fertilization in vitro”, “androgens”, “ovulation induction”, “testosterone” e “gonadotrophin/ovarian stimulation”.

Os artigos foram selecionados a partir da leitura dos seus títulos e resumos. Procurou-se priorizar estudos que mostrassem o impacto do uso dos androgênios em ciclos de reprodução assistida e foram considerados elegíveis os artigos publicados nas duas últimas décadas. Nos critérios de seleção estavam grupos de mulheres a serem submetidas a ciclo de FIV/ICSI com análogos do GnRH cujo uso de androgênios (testosterona, DHEA) ou seus moduladores (LHR, hCG, inibidores da aromatase) formava o grupo de intervenção.

Foram avaliados estudos quanto à gravidez clínica (presença de saco gestacional, com embrião com atividade cardíaca presente) e nascidos vivos. Consideraram-se a duração temporal do estímulo e a dose total de gonadotrofinas usadas,

oócitos recuperados na aspiração folicular, oócitos maduros, número de embriões fertilizados e transferidos e taxa de cancelamento.

Resultados

Bahceci et al. (2007)⁴¹ estudaram níveis hormonais séricos e intrafoliculares de hormônios sexuais, fator de crescimento epidermal (EGF) e IGF-1 em mulheres submetidas a ciclo de FIV com resposta ovariana baixa (menos do que cinco oócitos) e normal (10 ou mais oócitos). Foram analisadas 48 mulheres em estudo prospectivo, pareadas conforme idade. Dosaram-se níveis de FSH, LH, estradiol, progesterona e testosterona séricos e foliculares, assim como EGF e IGF-1 intrafoliculares nos dois grupos. Mulheres com má resposta tiveram menores níveis de estradiol e progesterona, a T folicular estava mais baixa nas más respondedoras, mas sem significância estatística. Apesar de o FSH sérico ser sabidamente maior nas mulheres com menor resposta, não houve diferença intrafolicular de gonadotrofinas nos dois grupos, assim como o EGF. Já o IGF-1 esteve notadamente menor nas mulheres com resposta ruim. Este estudo sugere que a redução da expressão do IGF-1 acarretaria esteroidogênese ovariana comprometida.

Testosterona transdérmica hormônio luteinizante recombinante

No primeiro ensaio clínico prospectivo randomizado controlado com placebo, Fábregues et al.,⁴² na Espanha, em 2008, incluíram 62 casais inférteis cujo ciclo anterior de FIV fora cancelado por má resposta. Foram randomizadas em dois grupos com protocolo de agonista de GnRH (acetato de leuprolida – aplicação diária). No grupo 1 usaram testosterona transdérmica, 2,5 mg/dia por cinco dias antes do início do estímulo com dose padrão de gonadotrofinas (somente FSH recombinante), enquanto que no grupo 2 FSH recombinante associado a gonadotrofinas combinadas (75 UI FSH com 75UI LH). Nas pacientes com FSH baixo (menor do que 10 mUI/ml), a suplementação com testosterona reduziu a duração do estímulo ovariano e a dose total de gonadotrofinas administrada e ocasionou menor taxa de baixa resposta. O número de oócitos recuperados foi semelhante nos dois grupos.

Resultado compartilhado por Kim et al. (2011),⁴³ que usaram 12,5 mg de testosterona transdérmica por 21 dias previamente à indução de 111 pacientes más respondedoras com antagonista em ensaio clínico prospectivo randomizado. Eram mulheres que haviam tido três ou menos folículos menores ou iguais a 16 mm, ou com menos de três oócitos recuperados, apesar do uso de mais de 2.500 UI de gonadotrofinas em ciclo prévio de FIV/ICSI. O grupo que usou testosterona necessitou de menor dose de FSHr e menos dias de indução. Além disso, alcançou maior número de oócitos recuperados e oócitos maduros, maior taxa de fertilização, além de embriões de melhor qualidade do que o grupo controle. O mais importante é que teve maior taxa de implantação embrionária e gravidez por ciclo. Nenhuma paciente relatou efeito adverso com o uso da T.

Esses primeiros estudos não levavam em consideração os níveis basais séricos de testosterona. Pensando nisso,

Yingying et al. (2011)⁴⁴ reuniram em estudo retrospectivo 1.260 mulheres chinesas para avaliar os níveis de testosterona basal em pacientes com reserva ovariana normal e diminuída. Excluídas pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) e endometriose, formaram-se dois grupos: baixa reserva ovariana FSH > 10 (n = 187) e reserva normal FSH < 10 (n = 1.073). Usou-se análogo agonista de GnRH (acetato de triptorelina 0,1 mg/dia) em ciclo longo e FSH recombinante (FSHr) conforme resposta individual. Níveis maiores de testosterona estavam ligados à maior taxa de gestação em mulheres com baixa reserva, assim como maior número de folículos no dia do hCG. O nível basal de testosterona de 47,85 ng/dL foi capaz de prever com 52,8% de sensibilidade e 65,3% de especificidade a chance de gestação em mulheres com FSH > 10.⁴⁴

Dehidroepiandrosterona

De acordo com metanálise publicada por Bosdou et al. (2012),⁴⁵ foram incluídos e analisados estudos sobre os androgênios relatados a seguir. Wiser et al. (2010),⁴⁶ em estudo com 33 pacientes, usaram dose de 75 mg/dia de dehidroepiandrosterona (DHEA) por seis semanas antes da estimulação. Usaram como definição de má resposta menos de cinco folículos recuperados, embriões de baixa qualidade, número de oócitos recuperados e ciclo anterior cancelado por má resposta ou alta dose inicial de gonadotrofina, mais de 300 UI/dia. Com o uso de protocolo longo com 450 UI de FSHr associado a 150 UI de LHr, não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação a folículos recuperados, gravidez clínica ou nascidos vivos.⁴⁵

Inibidores de aromatase

O letrozol foi usado por Ozmen et al. (2009)²⁹ na dose de 2,5 mg, duas vezes ao dia, a partir do terceiro dia de estímulo. Eles usaram como critério de má resposta ciclo anterior cancelado por estrogênio, com estradiol E2 menor do que 130 pg/ml no sexto dia, ou E2 menor do que 450 pg/mL no dia do hCG, ou menos de quatro oócitos recuperados. Conseguiu-se redução na quantidade de gonadotrofinas e não houve diferença entre oócitos recuperados ou gravidez clínica. No entanto, a taxa de nascidos vivos não pôde ser avaliada.⁴⁵

Hormônio gonadotrófico humano recombinante (hCGr)

Berkkanoglu et al. (2007)²¹ fizeram estudo com o uso de hCG 75 UI/dia do sétimo dia de estímulo até a punção em 99 mulheres. O critério de definição de resposta pobre foi a contagem de folículos antrais (CFA) menor do que 12 e menor do que três folículos no sétimo dia de estímulo. Conseguiram-se menor dose de FSH e estímulo mais curto.⁴⁵

Discussão

No geral, os estudos mostram uma associação positiva no uso da testosterona nos ciclos de indução para FIV em mulheres más respondedoras. Bosdou et al (2012),⁴⁵ em metanálise publicada recentemente, concluíram, após analisar vários ensaios clínicos sobre o uso de diversos androgênios,

que somente a testosterona transdérmica obteve resultados promissores. Elas conseguiram obter ciclos de indução mais curtos com menor dose de gonadotrofinas. Alguns autores conseguiram demonstrar embriões de melhor qualidade com maior taxa de implantação, gravidez clínica e nascidos vivos. Esses benefícios devem ser vistos com cuidado, pois são estudos geralmente com amostras reduzidas e grupos heterogêneos.

Além disso, a metanálise esbarra na heterogeneidade de definições e de protocolos. A iniciar pela definição de *poor responder*, sobre a qual não existe consenso sobre a baixa resposta ovariana.⁴⁷ Os parâmetros dos critérios de elegibilidade de má resposta variam conforme o grupo e não são padrões homogêneos. A exemplo do FSH, que para alguns autores tem como linha de corte para boa resposta níveis menores do que 12 mUI/mL e para outros é de 10 mUI/mL. A maioria considera que má respondedora é a paciente com resposta menor do que a esperada. Parte dessas mulheres teve seu primeiro ciclo cancelado justamente por resposta abaixo do esperado. Novamente os critérios para cancelamento de ciclo também sofrem pequenas alterações, conforme o protocolo de cada serviço.

Entende-se como resposta inadequada: a) quantidade de oócitos menor ou igual a três ou quatro recuperados na punção ovariana; b) níveis de estradiol menores do que 300 ou 500 ng/L no dia da aplicação do hCG; c) uso diário de gonadotrofinas superior a 300 UI/dia ou 3.000 UI durante o todo o estímulo; d) indução prolongada por mais de 15 dias ou cancelamento de ciclo anterior por baixa resposta.⁴⁸

Os critérios de inclusão também devem ser questionados: alguns estudos excluíram mulheres que tinham endometriose ovariana,⁴⁹ porém não especificaram se as pacientes com endometriose em outros sítios foram incluídas e não citaram qual o critério de discriminação para endometriose ovariana (clínico ou cirúrgico).

O análogo usado não foi escolha homogênea entre os autores. Alguns preferiram ciclo com agonista e outros com antagonista, até dentro do mesmo trabalho.⁴⁹ Houve variação de doses de gonadotrofinas entre o grupo tratamento e o controle. Também não houve especificação sobre a inclusão ou não de mulheres com diagnóstico ou suspeita de SOP, o que poderia causar um viés.

As doses e o tempo de uso da testosterona transdérmica não obedeceram a padrão. Alguns autores usaram doses de 10 mg/dia por 15 a 20 dias prévios ao estímulo,⁴⁹ enquanto outros usaram 12,5 mg/dia por 21 dias previamente ao ciclo.⁴³ A maioria dos trabalhos também não pareou as pacientes de acordo com o FSH.

Em reação aos inibidores de aromatase, a dose total de gonadotrofinas usada realmente foi menor com significância estatística, apesar de o número de oócitos recuperados não ter apresentado diferença. A associação de hCG foi relacionada ao encurtamento do ciclo de estímulo. Já o uso de LHr não trouxe diferenças significativas entre os dois grupos comparados em termos de dose total de FSHr, duração do ciclo e número de oócitos recuperados.

Esses resultados discordantes abrem espaço para o questionamento se esses diferentes métodos de uso de androgênios teriam o mesmo efeito ou se agiriam pelo mesmo mecanismo. Alguns parâmetros importantes também deixaram de ser

avaliados em alguns estudos, como o tempo de uso, o tipo de substância usada e a dose. A falta desses dados torna os resultados obtidos de difícil avaliação pela impossibilidade de reprodução em maior escala.

Outro fator de extremo valor das substâncias a serem estudadas é a sua segurança. Inibidores da aromatase usados no estímulo ovariano já estiveram associados ao aumento de incidência de malformações congênicas.⁵⁰ Entretanto, estudo posterior pareceu não demonstrar resultados alarmantes.⁵¹ Identificar a segurança desses compostos nos estudos avaliados é difícil, uma vez que nenhum deles reporta dados relevantes nesse sentido. O uso da testosterona tópica e do DHEA é considerado seguro, já que nenhum estudo descreveu efeitos adversos^{43,46,49} ou malformações congênicas.⁴³

Conclusão

A testosterona transdérmica prévia à indução ovariana, além de resultar em estímulo mais curto e menor dose de gonadotrofinas, parece aumentar a taxa de gestação clínica e de nascidos vivos nas pacientes más respondedoras, submetidas a ciclo de terapia de reprodução assistida de alta complexidade. Por ser um método seguro, de fácil manuseio e aplicação, a princípio sem potencial teratogênico, pode ser ponderado como terapia adjuvante em pacientes não responsivas ao tratamento convencional, sem prejuízo para o ciclo. Ainda faltam estudos maiores e mais homogêneos sobre o comportamento dos androgênios em mulheres com má resposta em ciclos de reprodução assistida.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Verhagen TE, Hendriks DJ, Bancsi LF, Mol BW, Broekmans FJ. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2008;14:95-100, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmn001>.
- McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the unity of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod*. 2007;22:778-85, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del435>.
- Surrey ES, Schoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 2000;73:667-76.
- Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod*. 1999;61:353-7, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.2.353>.
- Spinder T, Spijkstra JJ, van den Tweel JG, Burger CW, van Kessel H, Hompes PG, et al. The effects of long term testosterone administration on pulsatile luteinizing hormone secretion and on ovarian histology in eugonadal female to male transsexual subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69:151-7, <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-69-1-151>.
- Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C, Dewailly D. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod*. 2003;18:598-603, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deg115>.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, et al. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5957-62, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-030727>.
- Hugues JN, Torresani T, Herve F, Martin-Pont B, Tamboise A, Santarelli J. Interest of growth hormone-releasing administration for improvement of ovarian responsiveness to gonadotropins in poor responder women. *Fertil Steril*. 1991;55:945-51.
- Weil SJ, Vendola K, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, Okafor J, et al. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2479-85, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.83.7.2479>.
- Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2951-6, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.84.8.2951>.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest*. 1998;101:2622-9, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI2081>.
- Ryan KJ, Petro Z, Kaiser J. Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1968;28:355-8.
- Horie K, Takakura K, Fujiwara H, Suginami H, Liao S, Mori T. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to estrogen and progesterone receptor expression. *Hum Reprod*. 1992;7:184-90.
- Suzuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, et al. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod*. 1994;9:1589-95.
- Hillier SG, Tetsuka M. Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1997;11(2):249-60.
- Balasch J, Fábregues F, Peñarrubia J, Carmona F, Casamitjana R, Creus M, et al. Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Hum Reprod*. 2006;21:1884-93, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del052>.
- Casson PR, Lindsay MS, Pisarska MD, Carson SA, Buster JE. Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Hum Reprod*. 2000;15:2129-32, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/15.10.2129>.
- Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fertil Steril*. 2002;77:776-80, [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)03280-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03280-0).
- Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, D'Angelo A, Farfalli V, Montanaro N. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril*. 2004;82:1521-6.
- Ferrari B, Barusi L, Coppola F. Clinical and endocrine effects of ovulation induction with FSH and hCG supplementation in low responders in the midfollicular phase. A pilot study. *Reprod Med*. 2002;47:137-43.
- Berkkanoglu M, Isikoglu M, Aydin D, Ozgur K. Clinical effects of ovulation induction with recombinant follicle-stimulating

- hormone supplemented with recombinant luteinizing hormone or low-dose recombinant human chorionic gonadotropin in the midfollicular phase in microdose cycles in poor responders. *Fertil Steril*. 2007;88:665-9.
22. Zeleznik AJ, Hillier SG, Ross GT. Follicle stimulating hormone-induced follicular development: an examination of the role of androgens. *Biol Reprod*. 1979;21:673-81, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod21.3.673>.
 23. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133:2204-12, <http://dx.doi.org/10.1210/en.133.5.2204>.
 24. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:349-63, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>.
 25. Pradeep PK, Li X, Peegel H, Menon KM. Dihydrotestosterone inhibits granulosa cell proliferation by decreasing the cyclin D2 mRNA expression and cell cycle arrest at G1 phase. *Endocrinology*. 2002;143:2930-5, <http://dx.doi.org/10.1210/en.143.8.2930>.
 26. Barad D, Brill H, Gleicher N. Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24:629-34, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-007-9178-x>.
 27. Goswami SK, Das T, Chattopadhyay R, Sawhney V, Kumar J, Chaudhury K, et al. A randomized single-blind controlled trial of letrozole as a low-cost IVF protocol in women with poor ovarian response: a preliminary report. *Hum Reprod*. 2004;19:2031-5, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh359>.
 28. Kashyap S, Wells G, Davis O, Williams-Pittman MA, Rosenwaks Z. Aromatase inhibitors improve IVF outcomes in poor responders: a randomized controlled pilot study. *J Soc Gyn Invest*. 2005;2:709.
 29. Ozmen B, Sönmezer M, Atabekoglu CS, Olmus H. Use of aromatase inhibitors in poor-responder patients receiving GnRH antagonist protocols. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:478-85.
 30. Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2000;15:1003-8, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/15.5.1003>.
 31. Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Andersen CY. Ovarian response and pregnancy outcome related to mid-follicular LH levels in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and recombinant FSH stimulation. *Hum Reprod*. 2002;17:2016-21, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/17.8.2016>.
 32. Durnerin CI, Erb K, Fleming R, Hillier H, Hillier SG, Howles CM, et al. Effects of recombinant LH treatment on folliculogenesis and responsiveness to FSH stimulation. *Hum Reprod*. 2008;23:421-6, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dem388>.
 33. Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Yding Andersen C. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod Biomed Online*. 2004;8:635-43.
 34. Mochtar MH, Van der V, Ziech M, van Wely M. Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;18:CD005070.
 35. Harlow CR, Shaw HJ, Hillier SG, Hodges JK. Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity. *Endocrinology*. 1988;122:2780-7, <http://dx.doi.org/10.1210/endo-122-6-2780>.
 36. Shaw HG, Hillier SG, Hodges JK. Developmental changes in luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin steroidogenic responsiveness in marmoset granulosa cells: effects of follicle-stimulating hormone and androgens. *Endocrinology*. 1989;124:1669-77, <http://dx.doi.org/10.1210/endo-124-4-1669>.
 37. Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology, and intraovarian progesterone concentrations in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol Reprod*. 1979;20:261-8, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod20.2.261>.
 38. Zeleznik AJ, Little-Ihrig L, Ramasawamy S. Administration of dihydrotestosterone to rhesus monkeys inhibits gonadotropin-stimulated ovarian steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:860-6, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-031292>.
 39. Filicori M, Cognigni GE, Tabarelli C, Pocognoli P, Taraborrelli S, Spettoli D, et al. Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1156-61.
 40. Filicori M, Cognigni GE, Gamberini E, Parmegiani L, Troilo E, Roset B. Efficacy of low-dose human chorionic gonadotropin alone to complete controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 2005;84:394-401.
 41. Bahceci M, Ulug U, Turan E, Akman MA. Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins, and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;130:93-8.
 42. Fábregues F, Peñarrubia J, Creus M, Manau D, Casals G, Carmona F, et al. Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. *Hum Reprod*. 2009;24:349-59, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den428>.
 43. Kim CH, Howles CM, Lee HA. The effect of transdermal testosterone gel pretreatment on controlled ovarian stimulation and IVF outcome in low responders. *Fertil Steril*. 2011;95(2):679-83.
 44. Qin Y, Zhao Z, Sun M, Geng L, Che L, Chen ZJ. Association of basal serum testosterone levels with ovarian response and in vitro fertilization outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;20:9, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-9-9>.
 45. Bosdou JK, Venetis CA, Kolibianakis EM, Toulis KA, Goulis DG, Zepiridis L, et al. The use of androgens or androgenmodulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012;18:127-45, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmr051>.
 46. Wiser A, Gonen O, Ghetler Y, Shavit T, Berkovitz A, Shulman A. Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: a randomized prospective study. *Hum Reprod*. 2010;25:2496-500, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq220>.
 47. Thurhan NO. Poor response – The devil is in the definition. *Fertil Steril*. 2006;86:777.
 48. Karande CV. Managing and predicting low response to standard in vitro fertilization therapy. *Treat Endocrinol*. 2003;2:257-72.
 49. Massin N, Cedrin-Durnerin I, Coussieu C, Galey-Fontaine J, Wolf JP, Hugues JN. Effects of transdermal testosterone application on the ovarian response to FSH in poor responders undergoing assisted reproduction technique – A prospective, randomized, double-blind study. *Hum Reprod*. 2006;21:1204-11, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dei481>.
 50. Mitwally MF, Biljan MM, Casper RF. Pregnancy outcome after the use of an aromatase inhibitor for ovarian stimulation. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192:381-6.
 51. Tulandi T, Martin J, Al-Fadhli R, Kabli N, Forman R, Hitkari J, et al. Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate. *Fertil Steril*. 2006;85:1761-5.