



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
SUBESPECIALISTA EN  
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

**PRESENTA:  
DR. JAIME LEÓN CABRERA**

**TUTOR:  
DR. JULIO CESAR ROSALES DE LEÓN  
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN A 27 DE FEBRERO DEL 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**Índice**

<b>Tema</b>	<b>Página</b>
1.0 Justificación	4
2.0 Marco teórico	6
3.0 Planteamiento del problema	17
4.0 Hipótesis	18
5.0 Objetivo	18
5.1 Objetivo principal	
5.2 Objetivo secundario	
6.0 Materiales y métodos	19
6.1 Diseño del estudio	
6.2 Población y muestra	
7.0 Criterios de selección	27
7.1 Criterios de inclusión	
7.2 Criterios de exclusión	
7.3 Criterios de eliminación	
8.0 Instrumentos y procedimientos	28
9.0 Resultados	31
10.0 Discusión	46
11.0 Conclusiones	50
12.0 Bibliografía	52

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **“Gracias”**

*Del lat. “gratia” – “favor, simpatía, estima” proveniente de la raíz indoeuropea \*gwer- “elogiar, dar la bienvenida”*

*Sin mas no sería posible llegar a este día sin pensar en mi familia; Papá, Mamá y Rosy; siempre han sido y serán los pilares en mi vida tanto personal como académica, gracias por todo ese impulso, aliento y comprensión, gracias por mostrarme al día a día el querer siempre una superación constante y un amor hacia esta profesión.*

*Gracias a cada uno de mis Maestros y Amigos del Centro de Fertilidad, son parte angular de mi formación académica y profesional, tendré siempre en cuenta cada una de sus enseñanzas y espero poder poner muy en alto la escuela de la cual egreso. Son una gran familia*

*Gracias a ti Dios por ponerme frente a todas estas personas.*

*Me siento muy contento y agradecido.*

*Gracias.....*

# **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

## **1.0 JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, las técnicas de reproducción asistida (TRA) representan una opción más para las parejas con infertilidad que buscan formar una familia.

Alrededor de 80 millones de parejas sufren problemas de infertilidad en todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo, y se calcula que a nivel mundial nacen aproximadamente 350 mil niños al año mediante TRA.<sup>1</sup>

Las nuevas tecnologías de reproducción asistida no se encuentran disponibles en todos los países y en general, son tratamientos muy costosos para la mayor parte de la población, siendo complejo que las pacientes reciban el tratamiento adecuado.

La estimulación ovárica es determinante para la obtención de resultados favorables en reproducción asistida. Las opciones disponibles actualmente varían desde ciclo natural y ciclos de estimulación “amigable” o mínima estimulación, hasta la estimulación convencional con altas dosis de gonadotropinas en asociación con análogos de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).

Se han descrito efectos indeseados asociados al tratamiento, en algunos casos dependientes de la dosis de gonadotropinas administradas, tales como anomalías en el ovocito y embrión, alteración de la receptividad endometrial y en el proceso de implantación embrionaria.<sup>2,7</sup>

La tendencia es regresar a esquemas más amigables y así evitar complicaciones y los efectos adversos propios de la estimulación ovárica; así mismo, que la estimulación sea cómoda y accesible sin que se sacrifique la efectividad, para obtener estos resultados hay que hacer una buena selección de casos y diseñar esquemas terapéuticos a la medida de cada paciente.<sup>2,3</sup>

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Con este trabajo se pretende demostrar si dentro de nuestro medio, la utilización de protocolos de estimulación ovárica “amigable” con gonadotropinas y antagonistas de la GnRH para ciclos de FIV-ICSI presentan resultados similares a los que se observan con el empleo de los protocolos convencionales a altas dosis de gonadotropinas exógenas.

# **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

## **2.0 MARCO TEÓRICO**

En los últimos años, se considera que ha existido un aumento en los casos de infertilidad asociada a diferentes etiologías, por lo que se ha observado un incremento exponencial en la solicitud de tratamientos de fertilidad.

Se estima que el 15% de la población en edad reproductiva puede llegar a tener problemas de infertilidad, donde una evaluación adecuada de la pareja infértil forma un papel fundamental para establecer las estrategias adecuadas para conseguir el objetivo de lograr un nacido vivo sano. <sup>4</sup>

Dentro de las estrategias que se tiene disponibles es el uso de la estimulación ovárica controlada; ya sea durante tratamientos de baja o alta complejidad, donde se utilizan gonadotropinas exógenas con la finalidad de aumentar el número de folículos en desarrollo y de esa manera aumentar las posibilidades de embarazo.

Durante los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad, la estimulación ovárica se utiliza con la finalidad de aumentar el número de ovocitos disponibles para su contacto con el espermatozoide en un laboratorio especializado y de esa manera generar embriones que posteriormente puedan ser transferidos a la cavidad endometrial y lograr un embarazo. <sup>5</sup>

### **Fisiología**

La maduración ovocitaria es un proceso complejo, que fundamentalmente requiere ser comprendido para la realización de cualquier tratamiento en reproducción

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

asistida y para entenderlo es necesario conocer los sucesos endocrinos que rodean a la ovulación y al control de esteroidogénesis durante el crecimiento folicular.

En el ciclo menstrual se divide en dos fases: la fase folicular y la fase lútea.

Durante la primera fase, las señales hormonales son orientadas al desarrollo de un folículo único, usualmente este proceso puede durar de 10 a 14 días y la modificación de su duración es la responsable de las alteraciones del ciclo menstrual.

La segunda fase, la fase lútea, es el tiempo que transcurre a partir de la ovulación hasta la presentación de la siguiente menstruación en caso de no existir embarazo, siendo esta la fase más estable con una duración de 14 días.

Los eventos hormonales que nos llevan a la selección de un folículo dominante y que se presentan durante la fase folicular es lo que se busca durante la estimulación ovárica controlada en cualquier tratamiento de reproducción asistida.<sup>1, 6,8</sup>

### **Fisiología Del Desarrollo Folicular**

El desarrollo folicular, toma 220 días, durante el desarrollo del folículo preantral, los receptores de FSH son detectables en las células de la granulosa. Aunque el folículo en esta etapa, no se ve afectado por la ausencia de gonadotropinas, su crecimiento puede ser estimulado por la FSH si se encuentra presente.

En contraste, en las etapas tempranas del desarrollo folicular, la FSH es indispensable para el desarrollo y crecimiento de un folículo antral, funcionando también como un factor de sobrevivencia, ya que rescata a los folículos de la atresia.

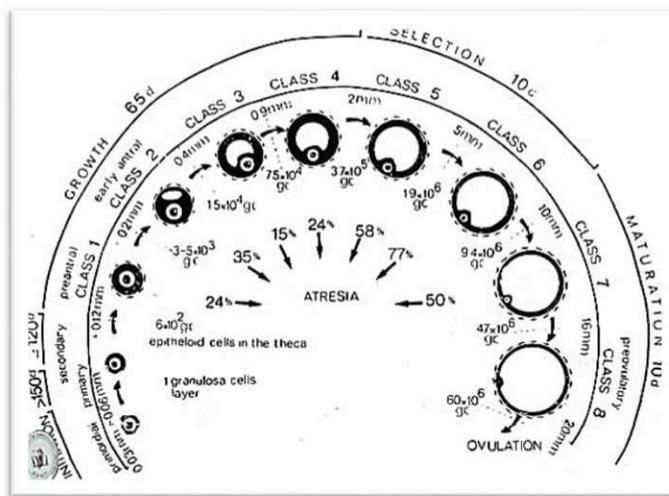
Cada folículo que entra en crecimiento, tiene el mismo potencial de lograr una maduración completa, solo aquellos que continúan su crecimiento constante en los estadios más avanzados del desarrollo folicular (a partir de los 2.5 mm de diámetro)

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

lo lograrán, cuando los niveles de FSH superen el umbral durante la transición lúteo-folicular.

Después del aumento inicial, la FSH presenta una meseta durante la fase folicular temprana, y posteriormente presenta una disminución al final de la fase folicular, como consecuencia de la retroalimentación negativa de la Inhibina B y los esteroides ováricos. <sup>1,6</sup>

La disminución de la FSH, limita el tiempo en el que la concentración de FSH está por encima del umbral, lo cual es esencial para la selección de un folículo dominante.



**Figura 1. Stages of folliculogenesis in the adult human ovary and level of atresia in the eight classes of growing follicles.**

Otro concepto importante para entender la estimulación ovárica controlada es el umbral y la ventana de FSH.

La administración de gonadotropinas a niveles por debajo del umbral de FSH no ofrecerá ninguna respuesta ovárica aunque la terapia se utilice de manera prolongada.

## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

La duración de la elevación de FSH por arriba de los niveles del umbral se auto limitan a mitad del ciclo por los niveles altos de estrógenos producidos por los folículos en crecimiento, siendo esta una retroalimentación negativa.<sup>1, 2, 6</sup>

La ventana de FSH, toma en cuenta el tiempo de estimulación más que la magnitud de la elevación de la FSH. Este concepto enfatiza la importancia de un aumento transitorio de FSH por encima del umbral, a fin de obtener la selección del folículo dominante único. Es aquí en donde la estimulación ovárica adquiere su función, evitando la disminución de la FSH, con el objetivo de obtener múltiples folículos “dominantes”.<sup>1, 6</sup>

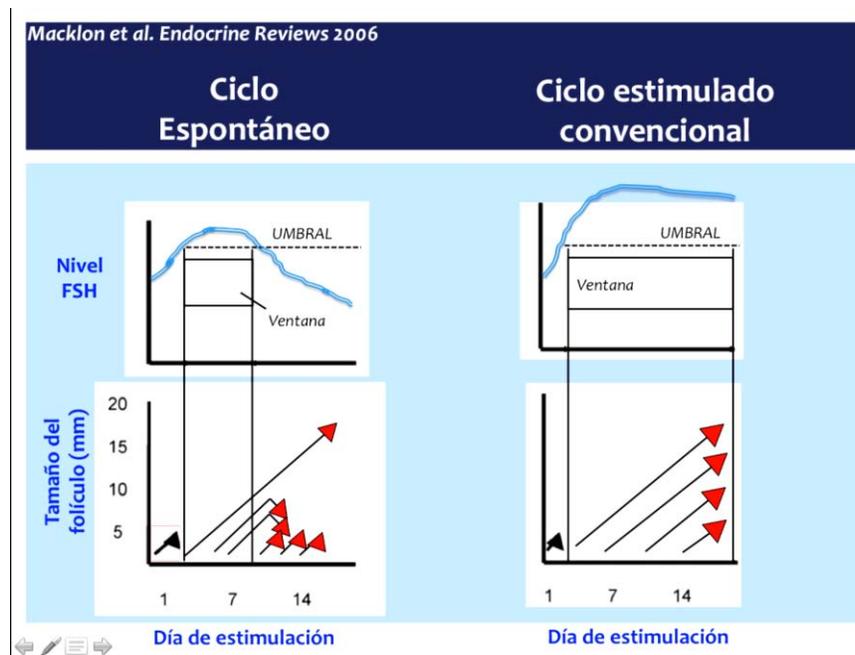


Figura 2. Representación del desarrollo folicular durante ciclo espontáneo y estimulado. Macklon et al. Endocrine Reviews 2006

## Estimulación ovárica para FIV.

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

El primer embarazo humano logrado con FIV fue el resultado de un óvulo recuperado en un ciclo espontáneo o natural (Steptoe & Edwards 1978). Sin embargo, se concluyó que este método presentaba varios inconvenientes; como la necesidad de llevar a cabo múltiples controles ultrasonográficos a cambio de una baja tasa de éxito y alta tasa de cancelación.<sup>1,9</sup>

La incorporación de la Estimulación Ovárica (EO) supuso un gran avance; siendo actualmente una parte integral de las técnicas de reproducción asistida y un factor fundamental y estrechamente ligado al éxito de dichas técnicas.

Las gonadotropinas son los fármacos más utilizados actualmente en nuestro medio para llevar a cabo la EO, con el objetivo principal de inducir un desarrollo folicular múltiple y obtener un mayor número de óvulos u ovocitos maduros, para así bajo las técnicas de alta complejidad en el laboratorio, tener la posibilidad de seleccionar uno o más embriones para la transferencia.

La EO debe cumplir con la condición de alcanzar el mayor grado de eficacia aunado al menor riesgo y mejor relación costo - efectividad.

Esta realidad cada vez más aceptada, junto con la evidencia creciente de que los niveles suprafisiológicos de hormonas esteroideas durante la estimulación ovárica puede afectar a la ovogénesis, la calidad embrionaria y la receptividad endometrial.<sup>10</sup>

Estudios clínicos desde 1995 con Simón et al., y actualmente Labarta et al. 2011, han hecho que actualmente se extienda una corriente que defiende las ventajas de la estimulación ovárica mínima o “amigable” o “mild ovarian stimulation” .Sus objetivos son hacer el énfasis en obtener el mejor resultado con el menor riesgo y costo posible, y argumentando que los resultados reproductivos de estos tratamientos tienen tasas similares a la estimulación ovárica convencional.<sup>1, 9, 10,11</sup>

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Desde hace años, la EO con FSH se realiza conjuntamente con análogos (agonistas o antagonistas) de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) con el fin de evitar picos de hormona luteinizante (LH) que incrementarían el riesgo de ovulación y luteinización temprana.

La dosis media habitual en pacientes en las que se espera obtener una respuesta adecuada podría situarse en torno a 150-225 UI diarias de actividad FSH, aunque lo ideal sería recurrir a modelos de predicción que permitan orientar correctamente la elección de la dosis inicial de la mayoría de pacientes normo respondedoras.<sup>9,12,13</sup>

## **Inducción De La Ovulación Con Gonadotropinas Exógenas**

Las gonadotropinas exógenas se han utilizado durante más de 40 años para inducción de ovulación en los tratamientos tanto de baja como de alta complejidad en reproducción asistida.

Estos fármacos son eficaces, pero también caros, y tienen riesgos, como el embarazo múltiple y el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.<sup>1, 2, 6, 11,14</sup>

Los preparados de gonadotropinas exógenas empleados para la inducción de la ovulación son de tres variedades diferentes: formulaciones urinarias, urinarias purificadas y recombinantes.

Durante casi 30 años, las únicas gonadotropinas exógenas disponibles eran las hMG o menotropinas, un extracto preparado a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas que contiene cantidades equivalentes (75 UI) de hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por ampula.

Hace aproximadamente 20 años se empezaron a desarrollar preparados urinarios más purificados de FSH urinaria (FSHu), eliminando la LH de los extractos urinarios

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

con el empleo de columnas de inmunoafinidad que contenían anticuerpos anti-hCG. Los preparados iniciales de FSHu purificada (75 UI) contenían menos de 1 UI de LH.<sup>1, 11, 14,15</sup>

Hace poco más de 15 años que se consiguió la producción de FSH humana recombinante (FSHr) mediante genotecnología. Los preparados de FSHr (folitropina alfa, folitropina beta) contienen isoformas de FSH menos ácidas, que tienen una semivida más corta que las procedentes de orina humana, pero estimulan el ovario con una eficiencia equivalente o incluso mayor.

Las ventajas de los preparados de FSHr son la ausencia de proteínas urinarias, el suministro constante y la menor variación de la actividad biológica.

También se ha desarrollado una forma recombinante de LH humana (LHr) con actividades fisicoquímica, inmunológica y biológica semejantes a las de la LH hipofisaria humana.<sup>1, 12, 15, 16</sup>

## **Tipos De Estimulación Ovárica Según Terminología ISMAAR**

La Sociedad Internacional de estrategias moderadas en reproducción asistida (ISMAAR: International Society for Mild Approaches in Assisted Reproduction), propuso las siguientes definiciones:<sup>17, 20</sup>

- I. Ciclo natural (CN): El término CN para FIV debe utilizarse para aquellas mujeres en las que el FIV se lleva a cabo en ovocitos procedentes del ciclo natural, sin administración de ningún tipo de medicación en ningún momento del ciclo. El objetivo de este ciclo es obtener un ovocito seleccionado de forma natural y con el mínimo coste posible.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

- II. Ciclo natural modificado (CNM): Este término debe aplicarse cuando se utilizan hormonas exógenas en un ciclo natural espontáneo de la paciente con el objetivo de obtener un único ovocito seleccionado de forma natural pero reduciendo las posibilidades de cancelación del ciclo. Este protocolo puede abarcar dos escenarios diferentes:
- a. Uso de gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir la maduración ovocitaria. El soporte de fase lútea puede o no ser administrado.
  - b. Administración de un antagonista de la GnRH para evitar el pico de LH endógeno con o sin uso concomitante de FSH o gonadotropina menopáusica humana (hMG). En este caso se utiliza hCG y se lleva a cabo un soporte de fase lútea.

III. Estimulación ovárica suave (“mild”) para FIV: Se define como el método en el que se utilizan dosis bajas de FSH o hMG, y/o un tratamiento adyuvante de menor duración con antagonistas de la GnRH; o cuando se utilizan compuestos por vía oral, como por ejemplo antiestrógenos o inhibidores de la aromatasa, bien solos o en combinación con gonadotropinas. Igualmente, se administra la hCG y se lleva a cabo un soporte de fase lútea. El objetivo es obtener entre 2 y 7 ovocitos.<sup>17, 19</sup>

IV. Estimulación ovárica convencional para FIV: Este término se utiliza para definir los siguientes escenarios:

- a. Uso de agonistas de la GnRH desde la mitad de la fase lútea del ciclo previo en protocolo largo para supresión hipofisaria seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
- b. Uso de agonistas de la GnRH seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

c. Uso de antagonistas de la GnRH en un protocolo con dosis convencionales de FSH o hMG iniciadas desde el inicio del ciclo. En todos estos protocolos, se administra la hCG y se lleva a cabo un soporte de fase lútea. El objetivo es obtener más de 8 ovocitos.<sup>17</sup>

## **Ventajas Del Protocolo De Estimulación Suave**

### **Reducción de Aneuploidías en el Embrión**

El proceso de reproducción humana es relativamente ineficaz. La probabilidad de conseguir un embarazo espontáneo es del 20-30%, mucho menor que en otras especies.<sup>1, 6, 14, 21</sup> Además, más de un 30% de los embriones humanos no se desarrollan hacia fetos viables, debido a anomalías cromosómicas.<sup>20</sup> También hay que tener en cuenta que la incidencia de las aneuploidias en el embrión aumenta con la edad materna.<sup>21</sup>

Después de una estimulación ovárica y posterior técnicas de FIV-ICSI, se seleccionan los embriones de mejor calidad para ser transferidos.

Se han realizado estudios con el propósito de conocer cómo afectan los distintos protocolos de estimulación ovárica a la a nivel cromosómico en ovocitos y embriones. En el estudio de Verberbeg 2009, los resultados indican que a pesar de que con el protocolo de estimulación suave se obtiene un número menor de ovocitos y embriones, la proporción de embriones cromosómicamente normales con respecto al protocolo de estimulación clásico está aumentada significativamente.<sup>23</sup>

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

### **Mejor Receptividad Endometrial**

Las tasas de embarazo obtenidas por TRA no son tan altas como se espera. La receptividad endometrial es un importante punto a tener en cuenta, las tasas bajas de implantación en los programas de reproducción asistida, se deben a fallos en la implantación como resultado de la transferencia de embriones en endometrios no receptivos.<sup>23, 24</sup>

Los niveles de estrógenos altos, resultantes de la estimulación ovárica, pueden ser una de las causas de esta falta de receptividad endometrial.

Yu et al, en su estudio que confirman que con niveles bajos de E2, en el periodo preimplantacional; utilizando una estimulación “amigable”, se aumenta la receptividad uterina, así mismo encuentra diferencia significativa en la tasa de embarazo de 16.2% vs 23.7%, en lo que respecta a la transferencia embrionaria en un ciclo posterior sin estimulación ovárica, concluyendo el efecto adverso de los niveles suprafisiológicos de estrógenos secundarios a estimulación ovárica. Sin embargo, también hay estudios que concluyen que la estimulación ovárica no afecta a la receptividad endometrial ni a la tasa de implantación, tal es el caso del grupo de Levi et al en el 2001, donde al comparar dos grupos (estimulación ovárica y posterior transferencia en fresco vs transferencia de embriones congelados) no encontró misma tasa de implantación y embarazo.<sup>23, 25, 30,33</sup>

### **Tasa de Embarazo**

Se ha reservado el uso de la estimulación ovárica amigable a pacientes con buena reserva ovárica; aunque resultados de estudios muestran iguales o incluso mejores resultados que estimulación ovárica convencional en pacientes con pobre reserva ovárica. En el estudio de Pelick et al, en el 2006 realiza una serie de estimulaciones con 150 UI de FSHr, en pacientes pobre respondedoras concluyendo que la

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

estimulación mínima parece ser una buena opción para este tipo de pacientes, con una tasa acumulada de embarazo después de 3 ciclos del 20.8% por paciente.<sup>31, 32</sup>

Se han publicado estudios que muestran los resultados con la aplicación de protocolos de estimulación suave.

García-Yuste, et al, realizan un estudio retrospectivo desde 1995-2007, en el que analizan los resultados de sus ciclos natural modificado, encontrando una aceptable tasa de embarazo (16 % Total) y una tasa modificada a 31.3% (menores de 38<sup>a</sup>).

En el estudio de Heijnen en 2007, en el cual la dosis fue aleatorizada en pacientes que tenían menos de 38 años, se obtuvo una tasa acumulada de recién nacidos vivos al año de tratamiento similar entre las pacientes que siguieron un protocolo de estimulación suave y aquellas con estimulación convencional (43.4 vs 44,7%).<sup>16,17,</sup>

29, 31

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

### **3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el campo de la estimulación ovárica la hormona antimulleriana (HAM) y la cuenta folicular antral (CFA) son los principales parámetros considerados para definir la dosis de gonadotropinas, sin embargo la falta de estandarización de los protocolos de estimulación ovárica y la ausencia de una dosis fija estándar de gonadotropinas exógenas es uno de los grandes obstáculos durante las técnicas de reproducción asistida y está estrechamente asociado los resultados reproductivos.

Creemos que la utilización de una dosis menor o más “amigable” durante los tratamientos de alta complejidad permite garantizar la cantidad precisa de gonadotropinas administradas permitirá obtener mejores resultados reproductivos durante los ciclos de estimulación ovárica controlada

Por lo que se plantea lo siguiente:

¿La utilización de una dosis menor de gonadotropinas en los protocolos de estimulación ovárica controlada permitirá obtener mejores resultados reproductivos

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

durante ciclos de reproducción asistida en pacientes menores de 35 años con buen pronóstico?

## **4.0 HIPÓTESIS**

Una estimulación Ovárica con dosis menores a 187.5 UI de gonadotropinas exógenas ofrecerá mejores resultados reproductivos (tasa de fertilización, tasa de recuperación a blastocisto y tasa de embarazo); en mujeres menores de 35 años con el diagnóstico de infertilidad que cuenten con buen pronóstico.

### **4.1 HIPOTESIS NULA**

Una estimulación ovárica con dosis mayores a 187.5 UI, de gonadotropinas exógenas ofrecerá mejores resultados reproductivos (tasa de fertilización, tasa de recuperación a blastocisto y tasa de embarazo); en mujeres menores de 35 años con el diagnóstico de infertilidad que cuenten con buen pronóstico.

## 5.0 OBJETIVOS

### 5.1 PRINCIPAL

#### **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

El objetivo general fue comparar los resultados de los ciclos de FIV-ISCI y transferencia embrionaria observados en protocolos de estimulación ovárica tras el empleo de dosis bajas y dosis convencionales de gonadotropinas y antagonistas de GnRH en nuestro centro de fertilidad.

### 5.2 SECUNDARIOS

- Determinar el comportamiento de las variables clínicas y demográficas de las pacientes.
- Determinar la tasa de Recuperación a Blastocisto.
- Determinar la tasa de embarazo, clínico y nacido vivo
- Determinar correlación entre la calidad embrionaria con los esquemas de estimulación.
- Determinar en número de embriones excedentes.

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio clínico, observacional, analítico y retrospectivo.

### 6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Todas las pacientes que participen en ciclo de estimulación ovárica controlada con posterior aspiración y transferencia embrionaria en fresco (embriones en estadio de

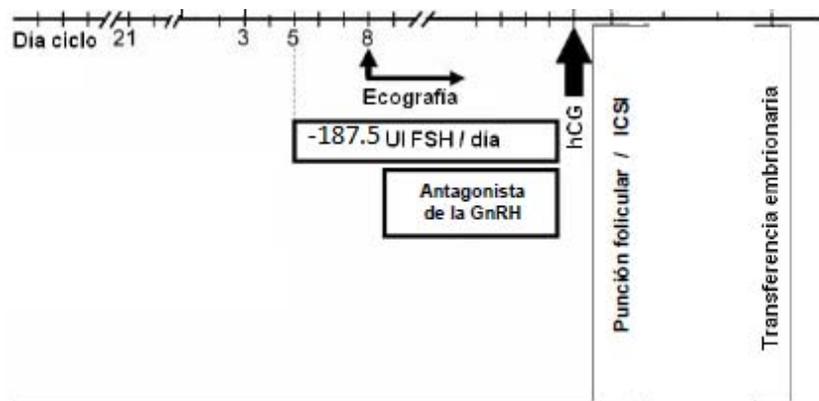
## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

Clivaje y Blastocisto), que cumplan con las características de los criterios de inclusión, en el Centro de Fertilidad IECH de Enero del 2008 a Diciembre 2015.

### 6.3 GRUPOS DE ESTUDIO

Las pacientes fueron asignadas en dos grupos:

- Grupo de estimulación “Amigable” (<187.5 UI de Gonadotropinas): estimulación ovárica para FIV-ICSI y antagonistas de la GnRH.
- Grupo de estimulación convencional (>187.5 UI de Gonadotropinas): estimulación ovárica para FIV-ICSI y antagonistas de la GnRH.



**Figura 3. Representación esquemática del protocolo de estimulación Ovárica.** Pérez Peña E, editor. Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida. 3ª ed. México: McGraw-Hill, 2011.

### Estimulación Ovárica

Se realizó la estimulación ovárica controlada utilizando el protocolo de estimulación según el criterio y elección del médico tratante. La estimulación con dosis variables

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

de FSHr (Gonal®), vía subcutánea (150 a 450 UI/día a partir del segundo día y valoración de la dosis de manera individual durante el resto del tratamiento). La primera revisión ecográfica en consulta para valorar la respuesta folicular se realizó al quinto día del ciclo y a partir de entonces cada dos días.

Se instauró tratamiento con antagonistas de la GnRH (Cetrotide®) a dosis de 0,25 mg/día vía subcutánea, cuando se observó algún folículo  $\geq$  de 14 mm de diámetro por ecografía.

Cuando se visualizaron 4 o más folículos  $\geq$  18 mm de diámetro, se administró una dosis única vía subcutánea de 250 mcg de gonadotropina coriónica (Ovidrel®) o 10 000 UI de hMG (Choragon®) para inducir la maduración ovocitaria final. La recuperación ovocitaria se realizó por punción folicular guiada vía transvaginal 36 horas después de la inyección de hCG.

**Laboratorio De Fertilización In Vitro**

Hoy en día el tratamiento más convencional y conocido en la reproducción asistida es la Fecundación in vitro (FIV). Mediante un previo diagnóstico de la pareja por un médico este recomendará utilizar este procedimiento en las parejas que presenten ciertas indicaciones tales como: un factor masculino no severo ( $5 \times 10^6$  espermatozoides motiles normales /ml), disfunción ovárica, esterilidad de origen inmunológico, endometriosis, patología tubal bilateral (obstrucción) y/o esterilidad desconocida entre otras.

Una vez hecho el diagnóstico correspondiente, la paciente será estimulada de tal forma que podemos conseguir un desarrollo folicular múltiple el cual nos permita obtener un mayor número de óvulos de los cuales podemos seleccionar los de mejor calidad.

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

### **Aspiración Folicular**

Esta se realiza mediante una punción aspiración guiada por ecografía transvaginal de 36-38 hrs. después de la administración de al HGC. El líquido folicular aspirado es depositado en los tubos y llevados al laboratorio, donde se verterá su contenido en placas de Petri (1029 FALCON) que se encuentran en una placa calefactora a 37.0 C para luego proceder a la identificación y captura de los complejos cúmulos-ovocitos mediante la ayuda de un estero microscopio utilizando un pipeta Pasteur todo bajo una campana de flujo laminar para mantener así un ambiente estéril.

### **Captura Ovular**

Una vez obtenidos los óvulos se depositan en caja Petri de 60X15mm (NUNC 150326) que contienen 4 gotas de '0.3 ml de medio HTF CON HEPES (INVITROCARE 2002-5) al 12% de albúmina humana (INVITROCARE 2101). La gota número 1 se realiza el primer lavado, y en las gotas 2, 3, 4 se clasifican los óvulos la incubación no debe de ser mayor a 15 minutos en este medio.

### **Clasificación De Los Óvulos**

Al decumular los óvulos, es posible ver claramente su morfología y su grado de madurez. La clasificación de los óvulos es la siguiente:

**Óvulos MII:** Son óvulos que han concluido su primera división meiótica, la presencia de un cuerpo polar nos indica que estos óvulos están en la metafase de la segunda división meiótica, son óvulos maduros y solo estos se micro inyectan.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**Óvulos MI:** Son óvulos inmaduros, no han concluido su primera división meiótica pero tampoco presentan a vesícula germinal, estos se micro inyectan a las 3 horas después de haber extraído se cuerpo polar.

**Óvulos VG:** Son óvulos pequeños, y oscuros y se caracterizan por la presencia de una vesícula general, estos óvulos son los más inmaduros, pues están detenidos en la profase de la primera división meiótica. Después de 26-29 horas de su captura pueden madurar.

**Óvulos Atrésicos:** Son óvulos degenerados, citoplasma oscuro y su membrana citoplasmática indefinida. También son llamados óvulos post maduros.<sup>34, 35</sup>

### **Evaluación De La Fertilización**

Transcurridas entre 10 y 12 horas después de la inseminación o inyecciones pueden apreciar los signos que indican la fertilización. Si es correcto, se distinguen claramente dos pronúcleos, uno femenino y otro masculino en el ovoplasma. Los pronúcleos aparecen uno junto al otro formando un ocho y, aunque al ser observado con el esteriomicroscopio parecen estar totalmente en contacto, permanecen separados por un estrecho canal citoplasmático.

Los pronúcleos femenino y masculino se forman a partir de la cromatina del óvulo y el espermatozoide. El pronúcleos femenino se forma junto al huso meiótico donde se ha extursionado el segundo cuerpo polar y el masculino junto al punto de la entrada del espermatozoide. Transcurridas 15 a 18 horas desde la inseminación, aquellos se pueden visualizar en el centro de la célula. En el interior de cada pronúcleos se distinguen entre 1 y 9 nucléolos. Como la extrusión del segundo cuerpo polar sucede tras la penetración del óvulo por un espermatozoide,

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

completándose así el proceso de meiosis en el óvulo, la observación en el espacio peri vitelino de dos cuerpos polares es también un signo de fertilización.

El criterio más utilizado en la práctica para comprobar que ha habido fecundación continua siendo la observación de los dos pronúcleos en el óvulo, además de ser un método simple, rápido y poco traumático para comprobar si ha habido fecundación, resultado imprescindible para comprobar el número de pronúcleos del cigoto evitar así la transferencia de embriones poli penetrados. Estos se comportan como embriones diploides, con lo cual, si no establecemos el número de pronúcleos en el periodo de tiempo en los que son visibles, se pueden pasar totalmente desapercibidos. Dentro de las poliploidías, los embriones triploides son los que aparecen con más frecuencia en FIV. Éstos pueden implantarse y, aunque la mayoría son abortados, en ocasiones llegan a nacer fetos con triploidías.

La aparición en el ovoplasma de un solo pronúcleos es otra de las irregularidades que se presentan. El contenido de estos núcleos puede ser tanto haploide como diploide y se desconoce las posibilidades que tienen de desarrollarse más allá del estadio de blastocisto.

### **Evaluación Embrionaria**

La siguiente metodología es tomada del manual de procedimientos del Centro de Fertilidad IECH, que es la forma en que se realiza por protocolo tanto la incubación, evaluación y posterior transferencia embrionaria.

Tras la observación de los dos pronúcleos los pre embriones se incuban a 37.0°C y 5.0% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de la transferencia. Los embriones humanos se dividen cada 12-14 horas. Así, a las 48 - 72 horas post aspiración, momento en el que se transfieren habitualmente los embriones pueden encontrarse en estadios de crecimiento que van de los 2 o 8 blastómeros. Entre 72 y 96 horas los embriones

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

pasan de 8 a 16 células. Iniciado la compactación. El estadio de blastocisto se desarrolla hasta 120 horas aproximadamente. Las sucesivas divisiones mitóticas que se reproducen en el embrión suponen una continua reorganización de las células que lo componen y en este proceso se pueden generar pequeños fragmentos citoplasmáticos. La importancia de estos fragmentos, junto con la morfología que presentan los blastómeros, son los criterios empleados en la evaluación de los embriones. Esta gradación de los embriones se basa en el sistema de clasificación descrito por Veek y consiste en lo siguiente (Veek, 1990).

**Tipo I.** los blastómeros son de igual tamaño, regulares y no hay fragmentos citoplasmático.

Representa la morfología perfecta.

**Tipo II.** Los blastómeros son de igual tamaño, pero aparecen pequeños fragmentos citoplasmáticos que ocupan aproximadamente el 20% del espacio del embrión.

**Tipo III.** Presenta blastómeros de tamaño claramente desigual y no aparecen fragmentos.

**Tipo IV.** Los blastómeros pueden ser de igual tamaño desiguales, pero en cualquier caso de fragmentación es significativa (superior al 40-50%).

**Tipo V.** La fragmentación es total o casi total y los blastómeros son de cualquier tamaño.

### **Transferencia Embrionaria**

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Es importante tener en cuenta la calidad de los embriones, puesto que parece claro que la evolución o no del embarazo está íntimamente relacionada con la transferencia de embriones calificados como embriones de buena o mala calidad (Copperman, 1995). Pero si la calidad de los embriones es importante, el número de los embriones, y la edad de la paciente son factores que se deben tomar en cuenta para valorar las posibilidades de implantación y el riesgo de embarazo múltiple (Svendsen, 1996). De esta forma, valorando los antecedentes reproductivos, la calidad de los embriones que se transfieren y el número total de embriones de que se disponen se decide una transferencia de 2 o 3 embriones.

### **Técnicas De Transferencia.**

La técnica Habitual es la intrauterina y transcervical. Mediante un catéter de plástico se depositan los embriones seleccionados cerca del fondo del uterino, con medio de transferencia al 50% SSS. Volúmenes mayores de líquido favorecen el embarazo ectópico. La técnica se debe realizarse en condiciones estériles. Se aconseja conocer previamente la longitud de la cavidad uterina para situar los embriones lo más cerca del fondo sin llegar a tocar éste.

Es habitual mantener durante 2 horas a la paciente en decúbito supino, y aconsejable reposo relativo durante las siguientes 24 horas.

La transferencia de embriones se realiza en el útero, existiendo otras técnicas de transferencia como son la transferencia tubárica de cigotos (ZIFT) y la transferencia tubárica de gametos (GIFT), y para las cuales se requiere laparoscopia.

El tipo de catéter también varía dependiendo de cada médico, los más comunes son el Fridman, Fet Set de Fridman, Soft-Pass, Sofá-Pass Eco Tip. Los catéteres

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

se diferencian unos de otros por su composición que pueden ser duros o blandos. Se ha comprobado que los catéter blandos tienen mejor éxito debido a que se daña menos a las paredes del útero y evitando con esto que se provoquen contracciones que llegarían a expulsar a los embriones que se transfirieron.

### **Soporte De Fase Lútea**

Establecido según el criterio y elección del médico tratante.

Existieron dos tipos de soporte: el primero a base de óvulos de progesterona de 400 mgs diarios y otro con crema vaginal (Crinone®) y óvulos de progesterona a dosis de 200 mgs.

A los 14 días post transferencia se determinó la cuantificación sérica de las sub Unidad beta de la hormona gonadotropina coriónica humana (AXIM Systems de Abbott).<sup>34</sup>

### **6.4 VARIABLES DE ESTUDIO**

- Edad (años).
- Tipo y Tiempo de infertilidad (años).
- FSH, LH y E<sub>2</sub> basal.
- Dosis total de Gonadotropina empleada (UI/día).
- Días de estimulación necesarios (del inicio de la estimulación hasta la punción folicular).
- Niveles de E<sub>2</sub> sérico el día de administración de la hCG.
- Número de ovocitos obtenidos tras la punción folicular.
- Número de ovocitos maduros (en metafase II de división celular).
- Número de ovocitos Fertilizados bajo las técnicas de FIV-ICSI.
- Número total de embriones obtenidos en estadio de Clivaje y Blastocisto.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

- Número de embriones de buena calidad según la clasificación de ASEBIR
- Número de embriones transferidos.
- Número de embriones congelados.
- Prueba Inmunológica de embarazo bioquímico (considerado como tal cuando el test de embarazo es positivo a los 15-20 días tras la transferencia embrionaria).
- Tasa embarazo (considerado como aquel en el que se produce el nacimiento de un recién nacido mayor a 28 semanas de gestación).

## **7.0 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes que hayan participado en TRA (FIV/ICSI) en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey.
- Pacientes de edad menor a 35 años.
- Diagnóstico de Infertilidad (Factor Tubárico, Factor Uterino, Factor Cervical, Endometriosis e Inexplicable)

### **7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes mayores de 35 años de edad
- Antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias.
- Antecedentes personales de enfermedad sistémica o crónica-degenerativa.
- Realización de ciclos de FIV previos.
- Diagnóstico de Infertilidad Masculina Severa
- Datos incompletos

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Expedientes de pacientes que se atendieron fuera del periodo de evaluación (Enero 2008 a Diciembre 2015)
- Expedientes Extraviados

**8.0 INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS**

**8.1 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN**

Se logró realizar de manera manual la captura de todas las variables en estudio, así como sus características demográficas y clínicas.

Los datos fueron capturados en una base de datos desarrollada en Excel para posteriormente IBM SPSS V.24, R STUDIO 1.0.136-3.3.2°2016, MSO EXCEL 16.0.6925.

**8.2 INSTRUMENTO DE ANÁLISIS**

Se determinaron los valores de tendencia central, desviación estándar y análisis de normalidad para variables cuantitativas y la frecuencia y proporción de frecuencia para variables categóricas. A partir de estos, se analizaron datos demográficos y comportamiento de las variables clínicas de la muestra.

## **ESTADÍSTICA INFERENCIAL**

### **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Se generaron dos grupos a partir de la dosis de gonadotropinas indicadas diariamente, y a partir de estos se determinó normalidad por medio de una prueba de Shapiro-Wilk, se realizaron comparaciones de medias por medio de pruebas paramétricas de t de student y ANOVA de una vía con posthoc de Tukey, ajustadas a normalidad y se consideró significativo un valor de p menor a 0.05. De no resultar los datos normales, se estudiaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis, con mismo nivel de significancia estadística. En caso de requerirse se realizó GLM para múltiples variables para comparar la varianza.

Así mismo, se realizó la prueba exacta de Fisher para la comparación de variables categóricas entre ambos grupos. Se consideró una p menor a 0.05 como estadísticamente significativo. Se realizó correlación de Pearson y medidas de Riesgo Relativo y Coeficiente de Momios.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**9.0 RESULTADOS**

Se obtuvo una muestra de 352 mujeres tratadas por TRA en El Centro de Fertilidad IECH en la ciudad de Monterrey. La muestra total se dividió en dos grupos para análisis y observación, aquellas que recibieron menos de 187.5 UI (n= 141) y aquellas que recibieron más de 187.5 UI (n=211) de gonadotropinas exógenas de manera diaria la para su estimulación folicular.

Tabla 1. Demográfica		<187.5 UI	>187.5 UI		
		Media, DE	Media, DE	p. val	t-test
	N.	141	211		
	EDAD	31.71 ±2.65	31.68 ±2.81	0.743	0.09
	Tiempo de diagnóstico inicial de infertilidad (años)	3.6 ±1.96	4.12 ±2.25	0.04	-2.26
	Laboratorios basales				
	FSH	6.95 ±4.71	6.86 ±3.92	0.288	0.169
	LH	5.14 ±2.99	5.33 ±5.19	0.199	-0.353
	Estradiol	47.89 ±35	49.11 ±5.05	0.289	-1.736

## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

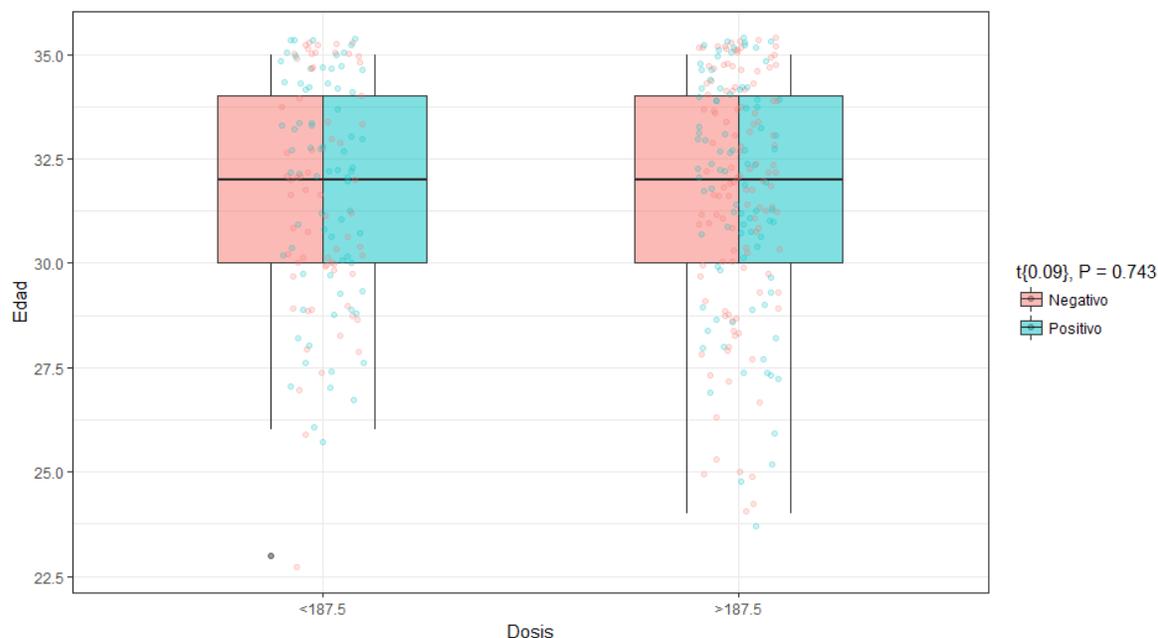


Imagen 1. No diferencias de edad entre grupos.

Al explorar la demografía y antecedentes de ambos grupos no se detectaron diferencias para las medias de edad (M 31.71,  $\pm$ 2.65, P=0.743), y niveles basales de FSH (M 6.95,  $\pm$ 4.71, P=0.288), LH (M 5.14,  $\pm$ 2.99, P=0.199), y Estradiol basal (M 47.89  $\pm$ 35, P=0.289) (Tabla 1).

Por otro lado, se encontraron diferencias entre los grupos al estudiar el tiempo desde diagnóstico de infertilidad expresado en años (M 3.6,  $\pm$ 1.96, P=0.04), y una tendencia elevada a necesitar una dosis mayor a 187.5 UI entre aquellas pacientes que presentaron infertilidad secundaria (Tabla 2).

Tabla 2.		<187.5	>187.5		
		N, %	N, %	p.val	RR
Infertilidad	Primaria	93 (65.96%)	123 (58.29%)	0.18	1.1315
	Secundaria	48 (34.04%)	88 (41.71%)	0.18	0.8162
PIE	Negativo	67 (47.52%)	120 (56.87%)	0.102	0.8355

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

	Positivo	74 (52.48%)	91 (43.13%)	0.102	1.2169
Procedimiento	FIV	42 (29.79%)	63 (29.86%)	0.9999	0.9976
	ICSI	31 (21.99%)	62 (29.38%)	0.1394	0.7482
	FIV-ICSI	68 (48.23%)	86 (40.76%)	0.1886	1.1832

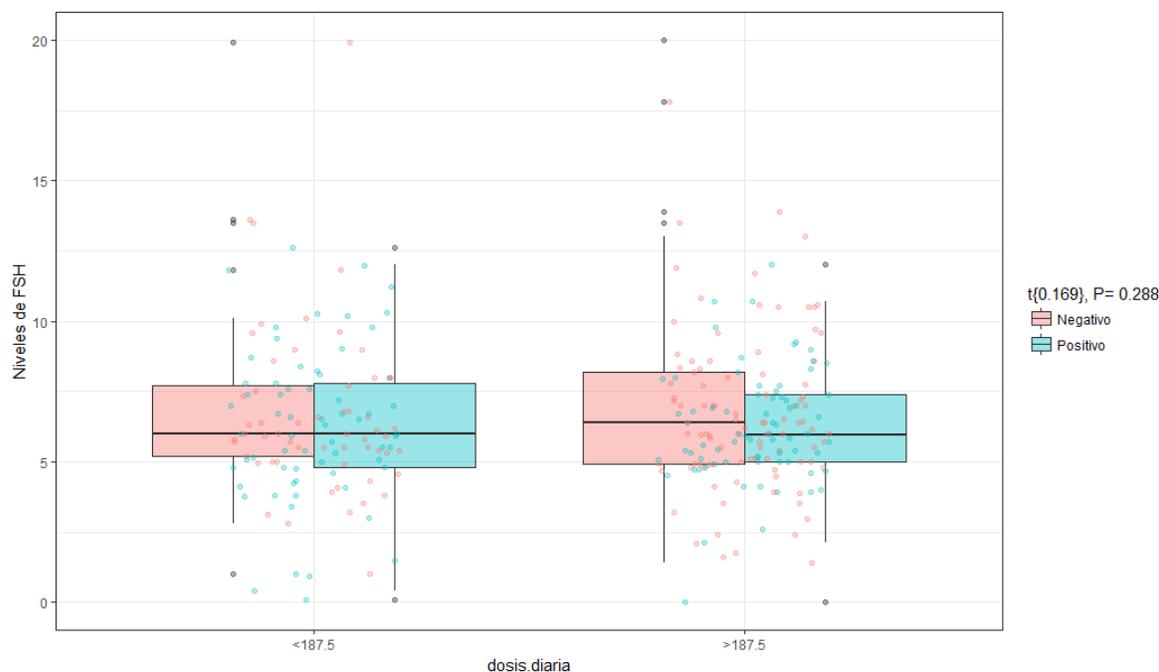


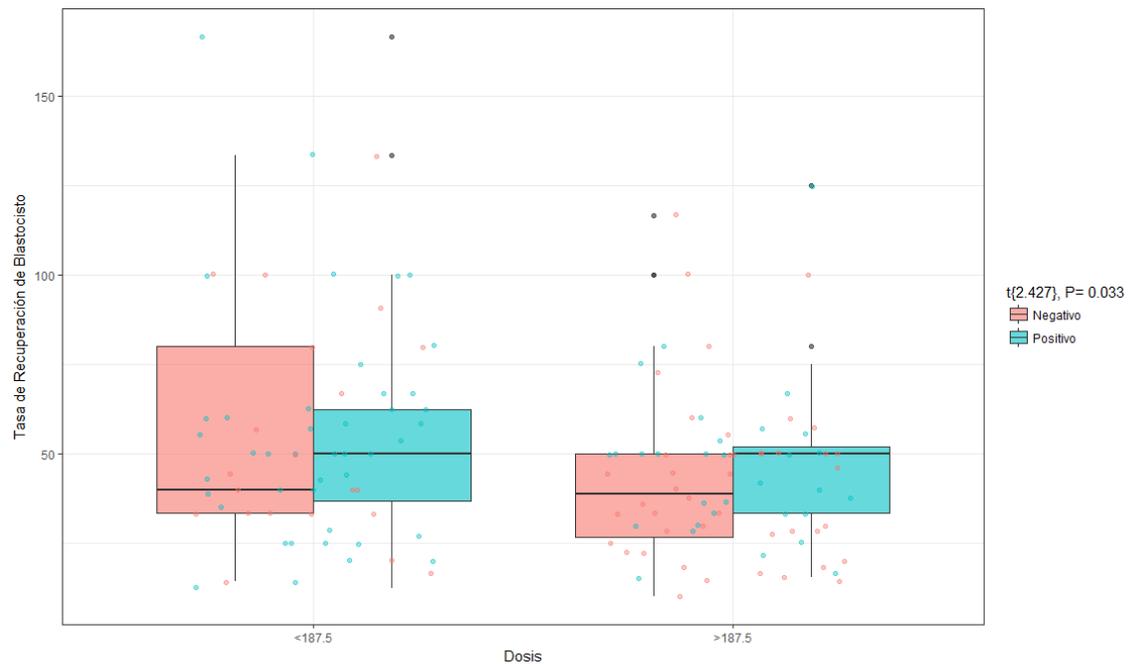
Imagen 2. No existieron diferencias entre las medias de niveles basales de FSH de ambos grupos.

Los parámetros de éxito del tratamiento estudiados entre ambos grupos mostraron importantes diferencias estadísticamente significativas.

Dichos parámetros se desglosan como cantidad de blastocistos generados (M 4.11,  $\pm 2.3$ , P=0.034), tasa de recuperación de blastocisto (M 55.09,  $\pm 31.19$ , P=0.033), y número de embriones transferidos (M 2.18,  $\pm 0.68$ , P=0.049). No se encontraron diferencias en cuanto al número de nacidos vivos (M 1.29,  $\pm 0.53$ , P=0.536). Todos estos parámetros observaron una tendencia hacia obtener un resultado positivo en la prueba de embarazo (Tabla 3).

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Tabla 3.					
	<187.5	>187.5			
	Media, DE	Media, DE	p. val	t-test	
Días de estimulación ovárica	10.21 ±1.05	10.22 ±1.08	0.592	-0.147	
Día de aspiración	12.21 ±1.05	12.22 ±1.08	0.592	-0.147	
Número de óvulos aspirados	10.12 ±5.98	11.11 ±6.34	0.853	1.5	
Número de ovocitos en metafase II	8.73 ±5.31	9.57 ±5.48	0.685	1.966	
Estradiol día HCG	2137.56 ± 1937.45	2756.67 ± 2567.8	0.049	2.022	
FIV	7.42 ±4	7.04 ±3.58	0.221	0.796	
Porcentaje FIV	75.41 ±20.09	74.85 ±21.97	0.327	0.206	
ICSI	5.28 ±2.48	5.26 ±2.69	0.56	0.051	
Número total de blastocistos	4.11 ±2.3	3.29 ±1.62	0.034	2.443	
Tasa de Recuperación de Blastocisto	55.09 ±31.19	43.96 ±22.72	0.033	2.427	
Número de embriones transferidos	2.18 ±0.68	2.35 ±0.72	0.049	-2.161	



## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

Imagen 3. Se observó una diferencia significativa en la tasa de recuperación de blastocisto entre ambos grupos.

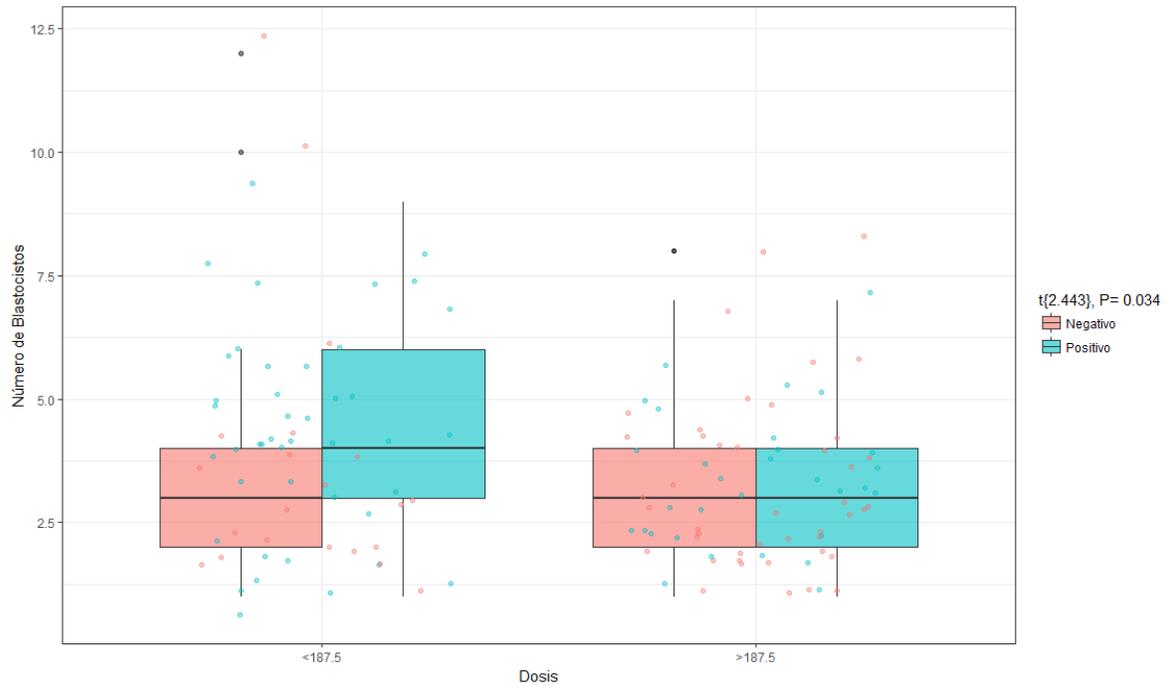


Imagen 4. Se observan diferencias en el número de blastocistos generados entre ambos grupos.

Adicionalmente, se dividió la misma muestra de 352 mujeres en dos grupos, las que fueron transferidas en día 3 (TD+3), y aquellas transferidas en día 5 (TD+5).

Tabla 4.					
		TD+3	TD+5		
		N, %	N, %		
		248 (70.4%)	104 (29.6%)		
		Media, DE	Media, DE	t-test	p. val
	EDAD	31.89 ±2.71	31.23 ±2.77	2.058	0.907

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

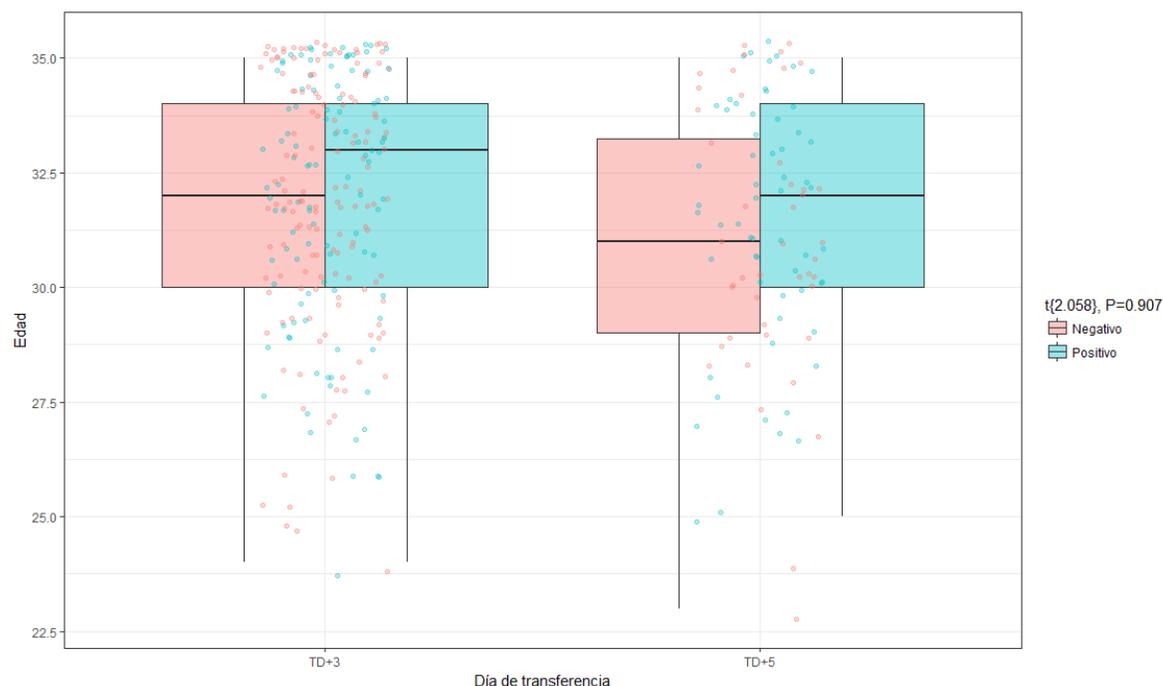


Imagen 6. No existieron diferencias de edad entre los grupos de TD+3 Y TD+5.

No se encontraron diferencias en las medias de edad entre ambos grupos. Se observa una diferencia en el grupo de la transferencia en Blastocisto como son en la cantidad de ovocitos en metafase II (M 7.89,  $\pm$ 5.49, P=0.046), al igual que al referirse a la media de fertilización por FIV (M 72.67,  $\pm$ 23.96, P=<0.001) así como porcentaje de fertilización por ICSI (M 2927.89,  $\pm$ 1648.26, P=0.015).

Tabla 5.

		<b>TD+3</b>	<b>TD+5</b>	<b>p.val</b>	<b>RR</b>		
		<b>N, %</b>	<b>N, %</b>				
<b>Infertilidad</b>	Primaria	160 (64.52%)	56 (53.85%)	0.0719	0.8346		
	Secundaria	88 (35.48%)	48 (46.15%)	0.0719	1.3007		
<b>PIE</b>	Negativo	143 (57.66%)	44 (42.31%)	0.01	0.7337		
	Positivo	105 (42.34%)	60 (57.69%)	0.01	1.3626		
<b>Procedimiento</b>	FIV	66 (26.61%)	39 (37.5%)	0.055	1.4091		
	ICSI	84 (33.87%)	9 (8.65%)	<0.001	0.2555		
	FIV-ICSI	98 (39.52%)	56 (53.85%)	0.0183	1.3626		

## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

Se observan diferencias esperadas entre los grupos al analizar los parámetros de éxito como número total de Blastocisto generados ( $P < 0.001$ ) y tasa de recuperación de Blastocisto ( $P = 0.015$ ) y una diferencia significativa en la cantidad de embriones transferidos en TD+3 y TD+5 ( $P < 0.001$ ), por otro lado no se reportan diferencias en número de nacidos vivos ( $M 1.24, \pm 0.48, P = 0.088$ ) entre las pacientes de TD+3 y TD+5, a pesar de observarse una ligera tendencia hacia generar resultado positivo en prueba de embarazo entre aquellas pacientes de TD+5.

Así mismo, se analizó si existían patrones al dividir los grupos entre día de transferencia más dosis aplicada, donde se observaron diferencias entre grupos al analizar la edad ( $P = 0.040$ ), número de óvulos, de ovocitos en MII, porcentaje de fertilización por FIV, E ICSI, Blastocisto, tasa de recuperación de Blastocisto y número de embriones transferidos ( $P < 0.001$ ).



Imagen 7. Se observó una diferencia significativa en el número de embriones transferidos en TD+3 y TD+5.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

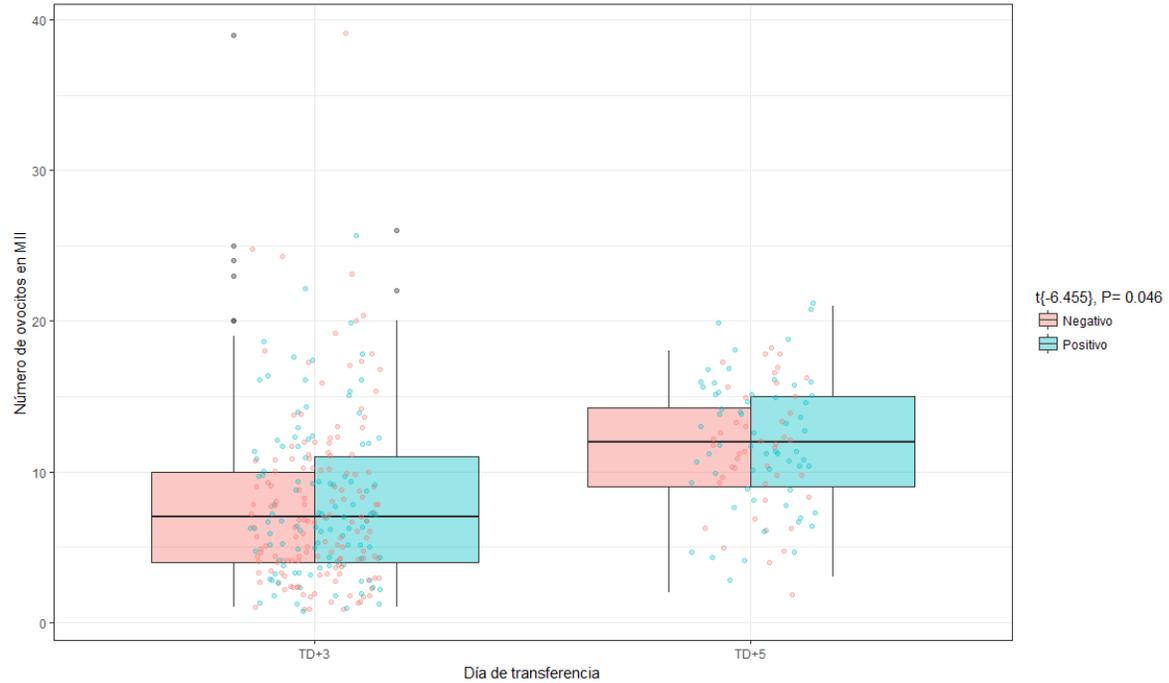


Imagen 8. Se observaron diferencias en el número de ovocitos en metafase II entre grupos.

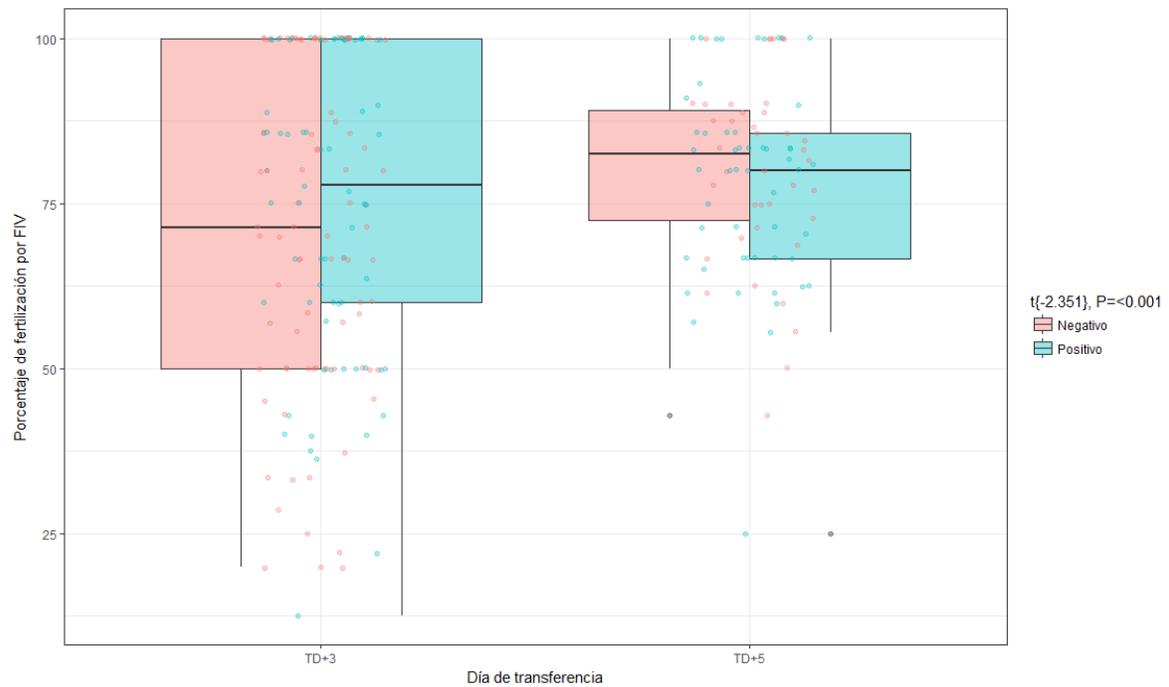


Imagen 9. Se observó un porcentaje de fertilización por FIV significativamente mayor entre aquellos que se transfirieron en TD+5.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

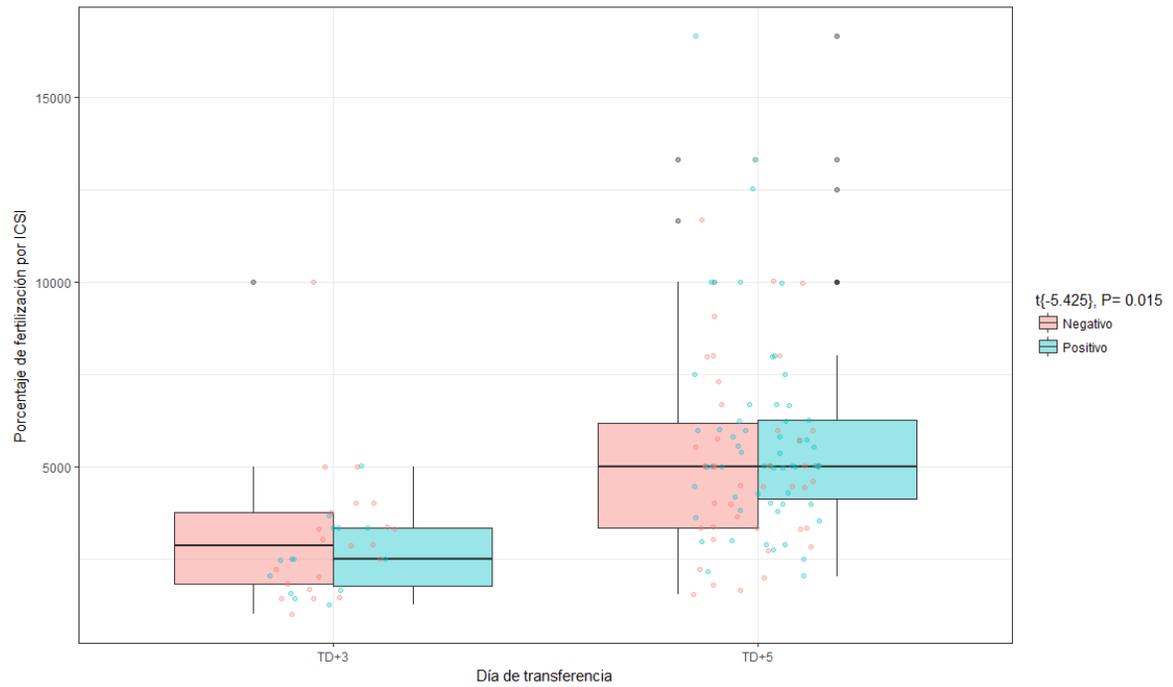


Imagen 10. Se observó un incremento significativamente mayor de fertilización por ICSI entre aquellos embriones transferidos en TD+5.

## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

Se rastrearon tendencias en cuanto al número de embriones congelados, no se observaron diferencias al analizar la media de la dosis de medicamento administrado diariamente y la cantidad de embriones congelados.

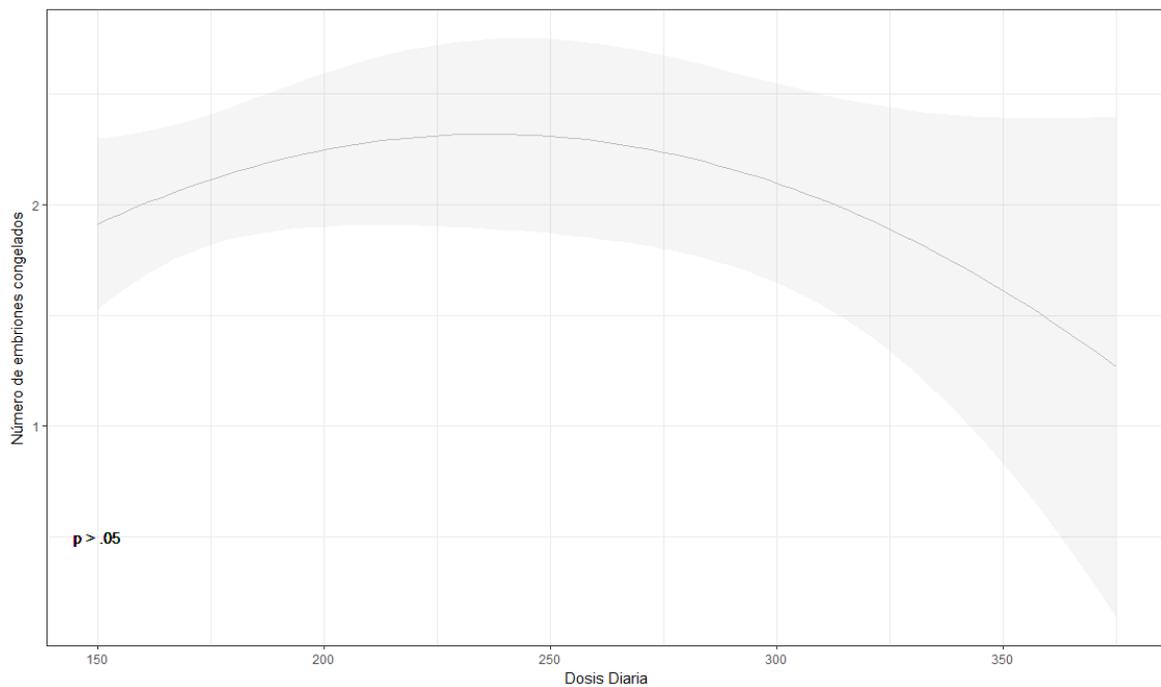


Imagen 11. Se observa la tendencia de ovocitos a congelar, no se observaron diferencias en cuanto al número de embriones congelados al tomar en cuenta la dosis aplicada diariamente.

## Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.

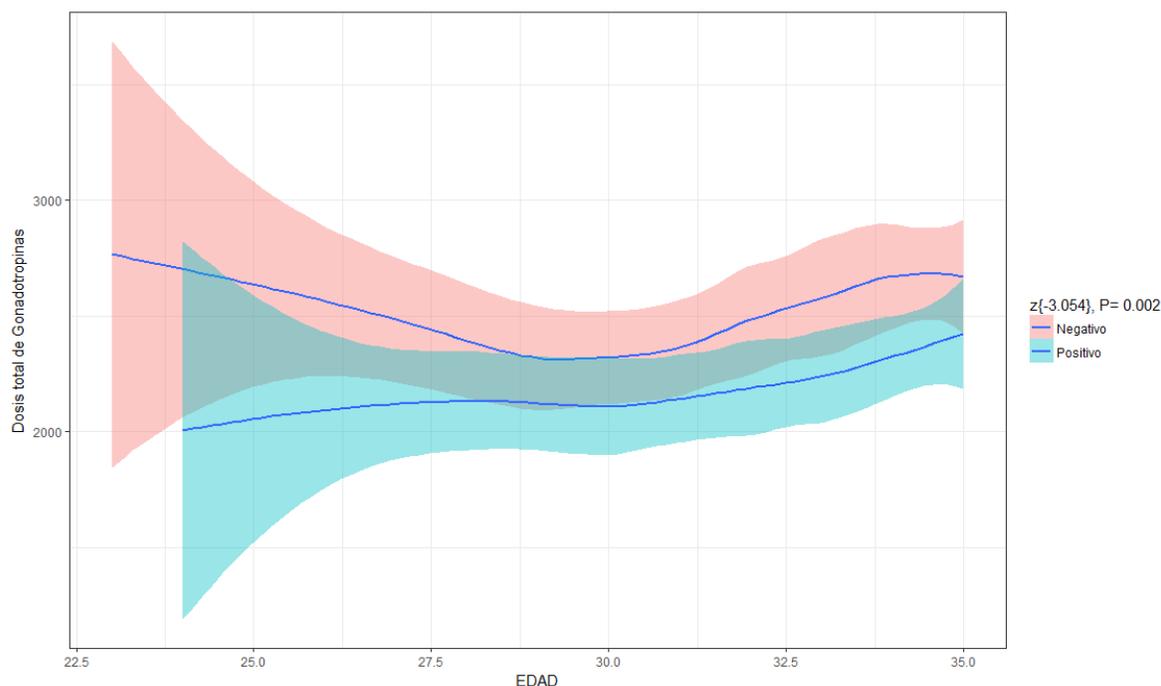


Imagen 12. Se encontraron diferencias al comparar los resultados de embarazo con la dosis total de gonadotropinas recibida.

Se realizó una comparación por grupo de estudio en 3 diferentes grupos de edad. En ella se observó cuantas pacientes eran transferidas de cada grupo, el grupo de pacientes que más se transfirió fue de 31-35 años y que la mayor parte de ellas recibió una dosis mayor a 187.5 UI de gonadotropinas.

Así mismo, al observar el promedio de embriones transferidos, se determinó que la mayor cantidad de embriones se transfirieron en las pacientes de 26-30 años que recibieron una dosis mayor de 187.5 mg gonadotropinas. Por otro lado, la mayor proporción de nacidos vivos y la menor razón de nacido vivo por embrión se observó en el grupo de pacientes de 31-35 años que recibieron la menor dosis. Se observó una correlación entre el número de embriones transferidos y el número de nacidos vivos ( $r= 0.943$ ,  $P= 0.005$ ).

Grupo de edad	Dosis gonadotropinas	No. De pacientes transferidas	No. De embriones transferidos	No. Embriones perdidos	No. Emb transferidos en promedio	NV por paciente	Razón embriones para nacido vivo
20-25	<187.5	1	2	2	2.00	0	-
	>187.5	10*	21*	18*	2.10	3	1:7.00
26-30	<187.5	49	106	82	2.16	24	1:4.42
	>187.5	52	126	108	2.42	18	1:7.00

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

31-35	<187.5	91	200	152	2.20	48	52.75%	1:4.17
	>187.5	150	349	284*	2.33	65	43.33%	1:5.37

\* Valor de P < 0.05

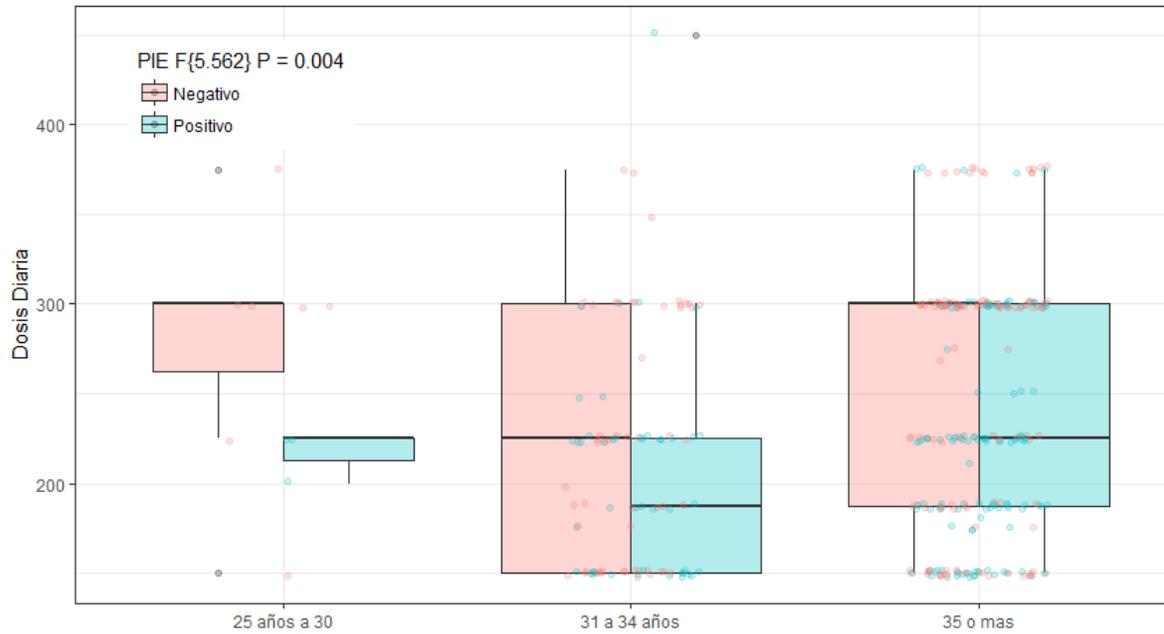


Imagen 13. Se observa una mayor cantidad de embarazos entre pacientes que recibieron menores dosis diarias, así como en el grupo de 26-30 años.

Se observó una tendencia hacia obtener resultados positivos para embarazo entre pacientes que recibieron una menor suma total de dosis de gonadotropinas exógenas (P= 0.002).

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

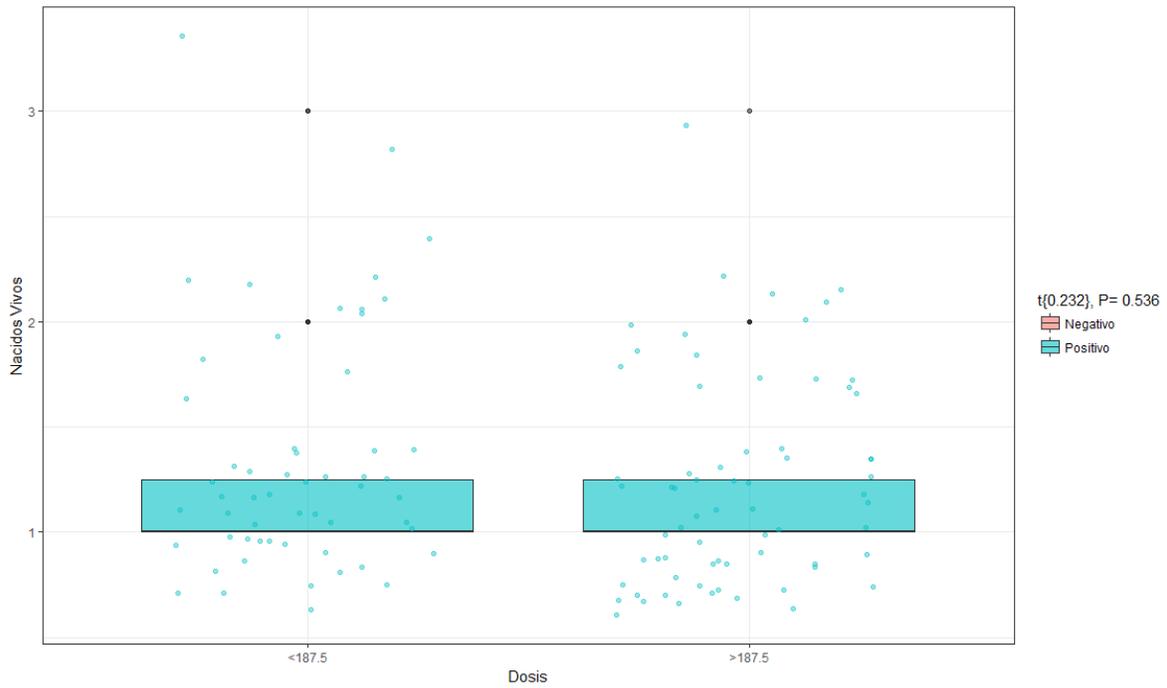


Imagen 14. No existieron diferencias en el número de nacidos vivos por grupo de dosis.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

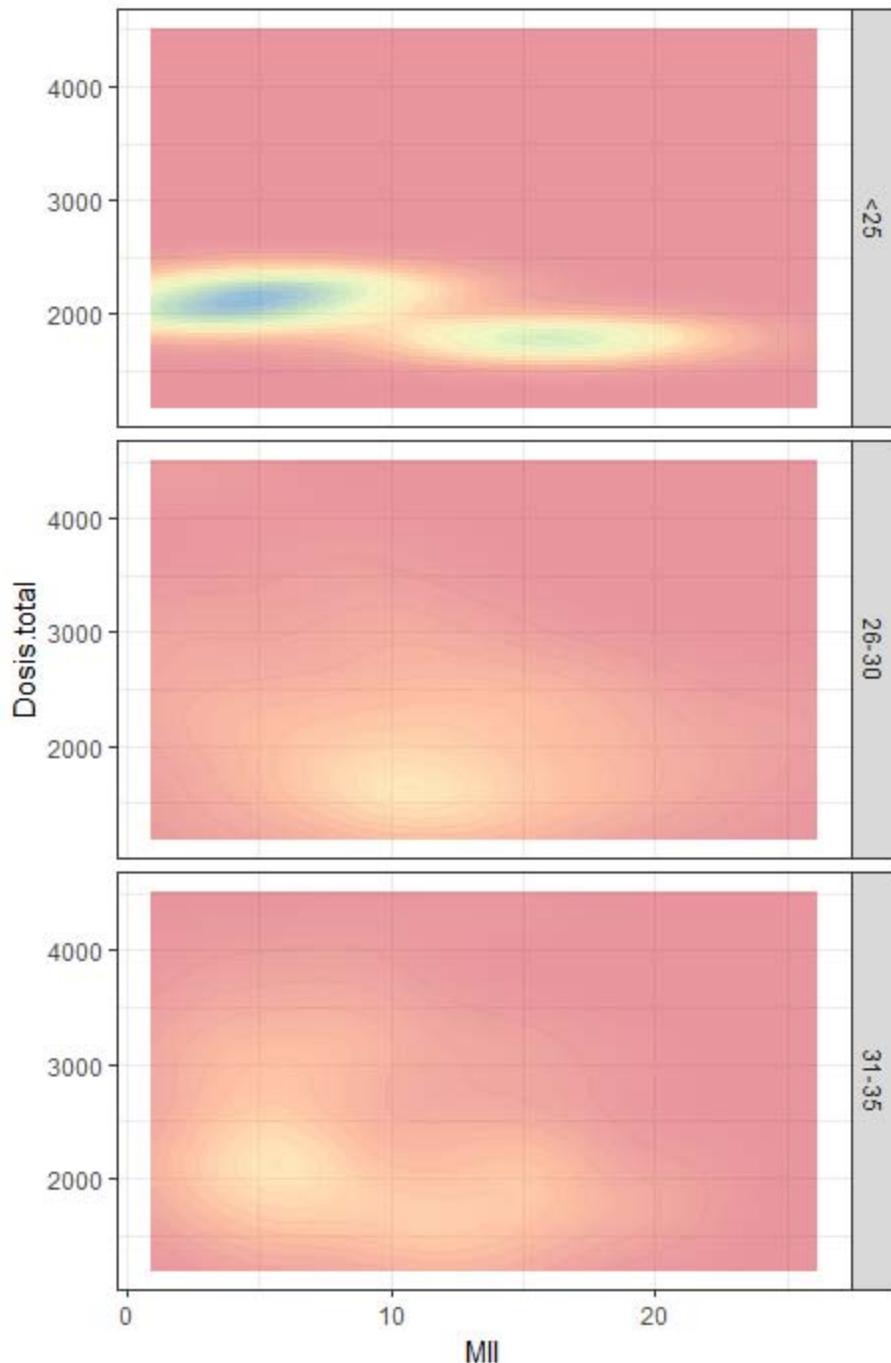


Imagen 15. No se observan beneficios adicionales con dosis mayores a 3000UI para cantidad de ovocitos en metafase II.

Adicionalmente se observó una disminución significativa en el número de ovocitos en metafase 2 entre las pacientes del grupo de 31-35 años ( $P=0.047$ ), y disminución en la cantidad de gonadotropinas utilizado entre las pacientes de 26-30 años en comparación con las pacientes de 31-35 con una diferencia de medias de  $235\pm 90$

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

UI (P= 0.027). Así mismo, se observa que no existe beneficio adicional de proporcionar más de 3000UI de gonadotropinas para la generación u obtención de un mayor número de ovocitos en metafase II. Por otro lado, la cantidad de UI administradas diariamente parece ser también un factor que afecta la proporción de embarazo positivo. Como resultado del árbol de decisiones (imagen 16) el mejor rango de dosis de administración diaria sería de entre 150-275 UI de gonadotropinas.

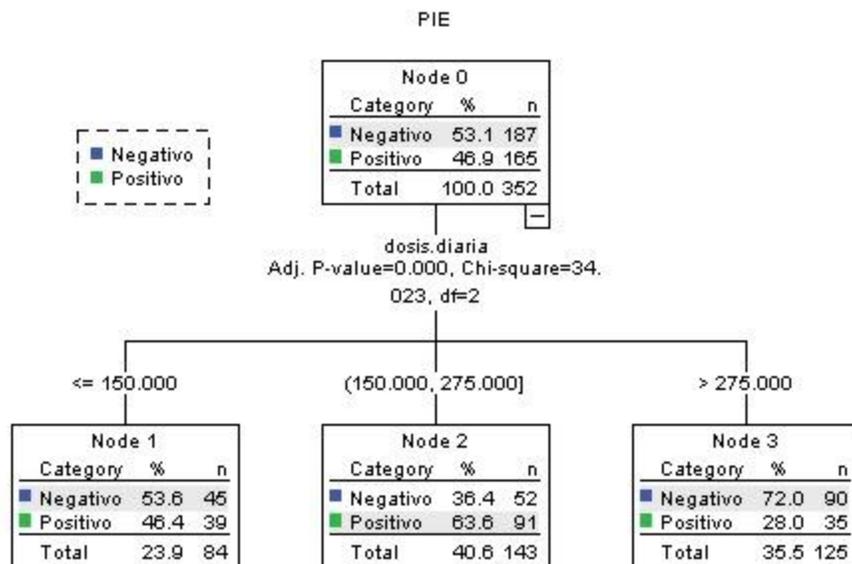


Imagen 16. Árbol de decisión. Se observa el rango de respuesta para embarazo positivo con una dosis de entre 150 y 275 UI diarias, donde las pacientes tratadas con dosis de este rango obtuvieron mejores resultados reproductivos.

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

### **10.0 DISCUSIÓN**

El objetivo general del estudio fue el establecer la presencia o ausencia de una correlación significativa entre los valores utilizados para la estimulación ovárica y sus resultados reproductivos (tasa de recuperación a blastocisto, tasa de embarazo; así como en el número de embriones perdidos), la hipótesis se confirmó, como se mencionara más adelante.

Como objetivos secundarios se logró observar, que no existe relación alguna entre la dosis de estimulación ovárica utilizada, la calidad embrionaria y el número de embriones que llega a congelarse.

Para ello se compararon las variables de estimulación, los parámetros de laboratorio, los resultados clínicos, entre un grupo de 141 pacientes que siguieron tratamiento de estimulación “amigable” (dosis menores a 187.5 UI de gonadotropinas) y antagonistas de la GnRH frente a 211 que siguieron un protocolo de estimulación convencional (dosis mayores a 187.5 UI) y con antagonistas de la GnRH.

La edad de las pacientes fue menor o igual a 35 años, no hubo diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos, hecho similar al estudio de Fernández et al., en el 2009), eliminando el factor más importante en reproducción como es la edad; otros factores que podrían influir en la respuesta o en la elección de una dosis mayor de estimulación ovárica también fueron analizados como fueron los niveles basales de FSH, LH y E2, así como el diagnóstico de infertilidad, datos que no demuestran significancia en ambos grupos.

## **Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Existen dos parámetros que pudieran representar un inconveniente para este estudio, en principio no se cuenta con el índice de masa corporal, parámetro clínico que pudiera influir en la dosis.

En segundo lugar, el estudio arroja una tendencia al uso de mayor dosis de gonadotropinas en el grupo con infertilidad secundaria; y diferencia significativa entre los grupos en el tiempo (expresado en años) de infertilidad; lo cual podría justificar el uso de una dosis mayor.

Dentro de los objetivos secundarios del estudio se demostraron diversos puntos interesantes con diferencias significativas.

Uno de estos es, que para el grupo de estimulación amigable existe una correlación negativa entre la dosis utilizada en la estimulación ovárica, los días de estimulación, el día de aspiración y el número de ovocitos en MII aspirados. Esta correlación negativa nos habla de que se logran la misma cantidad de ovocitos maduros con una dosis menor de estimulación.

Estos hallazgos son correspondientes a los ya descritos por varios autores, como Brown y Devroey en 1998.

A nivel de los parámetros de laboratorio se encontró que el nivel sérico de E2 el día de la administración de la hCG fue inferior en el grupo de estimulación amigable con diferencia significativa ( $p < 0.049$ ), concluyendo que la estimulación ovárica amigable mejora estos parámetros, de los cuales en trabajos como los de Beckers et al, 2006; Devroey et al, 2004; Strowitzki et al., 2006, hablan de los efectos negativos de niveles suprafisiológicos de esteroides sobre el desarrollo y capacidad de implantación embrionaria.

La media de ovocitos obtenidos por aspiración fue similar en los dos grupos a diferencia del estudio de Heijnen en el 2007, donde encuentra un menor número de

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

ovocitos en el grupo de la estimulación suave, así como en el estudio de Verberg et al. (2009) hubo una reducción del 35% en el número de ovocitos obtenidos con el protocolo de estimulación suave (6 ovocitos de media) comparado con el protocolo convencional (con una media de 9).

Un dato importante que se encontró en el estudio concuerda con la literatura publicada por Hohmann et al. (2003) y de Fernández-Shaw et al. (2009), donde encuentran resultados similares entre ambos grupos en los parámetros de ovocitos inyectados y fecundados; sin embargo en estos trabajos no se realiza una búsqueda intencionada hacia un parámetro muy importante en el laboratorio de gametos que es la tasa de recuperación a blastocisto, donde encontramos diferencias significativas favoreciendo al grupo de estimulación amigable ( $p$  0.033), lo cual se traduce en un número total de blastocistos que pueden ser candidatos tanto a transferencia como a vitrificación.

En lo que respecta a uno de los parámetros más importantes en reproducción asistida y ya que es el objetivo final del mismo es la tasa de embarazo en nuestro estudio arrojo una tasa total del 46.9%. Al momento de analizar y comparar los grupos de estimulación (los cuales se subdividieron de acorde a la edad y la dosis de estimulación con el fin de hacer más específico los resultados) se encontró diferencia significativa ( $p$  0.004) en aquellas pacientes con dosis menos a 187.5, además del grupo etario de 20 a 25 y 26 a 30 años.

No existe algún otro reporte que cumpla con las características de este estudio en la literatura para comparar los resultados, sin embargo el trabajo de Guerrero en el 2012, analiza un grupo de pacientes con estimulación mínima con 150 UI de gonadotropinas, obteniendo los siguientes resultados. En la siguiente tabla se muestran los resultados comparativos.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

	Guerrero (150 UI)	Leon (187.5)
N	69	141
Ovocitos MII	7,2 ± 4,8	9.73 ±5.31
Fertilización FIV	4,1 ± 3,2	7.42 ±4
Fertilización ICSI	7,2 ± 4,8	5.28 ±2.48
N. Embriones	3,9 ± 3	4.11 ±2.3
N. Embriones Transferidos	1,6 ± 0,7	2.18 ±0.68

**Tabla. Comparativa entre dos trabajos**

Por último y como objetivo secundario se investigó si también existía una relación entre la dosis y la pérdida embrionaria. Patrizio Pasquale en 2007, define como “embriones perdidos”, aquellos que son transferidos y no resultan en un nacido vivo. Baart encontró una relación positiva entre la dosis de gonadotropinas y la tasa de anomalías cromosómicas en pacientes infértiles (que en nuestro caso no es un trabajo comparable ya que no se realizó un estudio genético, pero puede explicar el fallo de implantación).

En nuestro estudio se encontró resultados significativos a encontrar un mayor número de pérdida embrionaria y relación nacido vivo/embrión; todo esto estrechamente relacionada con mayor dosis de gonadotropinas, siendo el primer reporte en México sobre este tipo de resultado ( $p < 0.05$ ).

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**11.0 CONCLUSIONES**

Durante el desarrollo del estudio, se realizó una revisión sobre el impacto, negativo o positivo, que tiene la cantidad de dosis utilizada en la estimulación ovárica.

El efecto que esta tiene sobre la calidad embrionaria y su tasa de embarazo es aun controversial.

No se observaron diferencias entre las medias de edad entre los grupos de dosis, pero si se observaron diferencias en cuanto al tiempo del diagnóstico de infertilidad. En relación a los parámetros de laboratorio, no se observaron diferencias en los perfiles hormonales basales de las pacientes en relación a los requerimientos de dosis.

En lo referente a la obtención de ovocitos, no se encontraron diferencias en los días de estimulación y de aspiración.

De forma adicional se exploró la relación entre la calidad embrionaria, la tasa de embarazo y su relación con la dosis diaria administrada, sin encontrar algún dato significativo, pero si una mejor proporción de éxito en transferir embriones de grado II.

De manera general, las pacientes que recibieron menor cantidad de dosis para estimulación ovárica tuvieron una tendencia a una mayor incidencia de tener mejores efectos reproductivos (tasa de recuperación de blastocisto, tasa de embarazo clínico).

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

Es de suma importancia poder determinar con exactitud el impacto que tiene la estimulación ovárica en sus múltiples etapas a través de la fertilización in vitro, teniendo como objetivo final el nacido vivo.

Queda claro que no es necesaria una estimulación ovárica agresiva debido a que logramos observar que los mismos resultados se logran a dosis menores en la estimulación ovárica controlada en las pacientes con estas características.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

**12.0 BIBLIOGRAFÍA**

1. Pérez Peña E. Estimulación ovárica controlada. En: Pérez Peña E, editor. Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida. 3ª ed. México: McGraw-Hill, 2011.
2. Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, et al. Mild ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod Update. 2009;15:13–29.
3. Franco JG Jr, Baruffi RL, Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Contart P, et al. Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study. Reprod Biol Endocrinol. 2009; 7:58.
4. Cancino VP, González OC, Enríquez FAS, Kohls G, et al. In vitro maturation: A low cost alternative that minimizes risks in ART. RBM Online 2008;17(Suppl 2):P-03,S-34.
5. Delvigne A, Rozenberg S. A qualitative systematic review of coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients. Hum Reprod Update. 2002; 8:291-6.
6. Speroff L. Frits M. "Clinical Gynecology, Endocrinology and Infertility". 7th Edition. 2005. Lippincott Williams & Wilkins.
7. Arslan M, Bocca S, Mirkin S, Barroso G, et al. Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr. Fertil Steril 2005;84:555-569.
8. Pelinck MJ, Hoek A, Simons AHM, Heineman MJ. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. Hum Reprod Update 2002;8:129-139.
9. Aanesen A, Nygren KG, Nylund L. Modified natural cycle and mild IVF: a 10 year Swedish experience. RBM Online 2010;20:156-162.
10. Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, et al. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics análisis. Hum Reprod. 2011; 26:1813-25.
11. Simon C, Pellicer A. Encuentro de expertos sobre gestaciones múltiples. Rev Iberoam Fert Rep Hum. 2005; 22:309-10.
12. Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, et al. Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm; the CONSORT study. Reprod Biomed Online. 2009; 18:195-204. ,

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

13. Sunkara SK, Coomarasamy A. Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014; 95:164-9.
14. Check JH. Mild ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24:621-7.
15. Busso CE, Garcia-Velasco J, Gomez R, Alvarez C, Simón C, Pellicer A. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Prevention of OHSS--dopamine agonists. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19:43-51.
16. Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, et al. A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2007; 369:743-9.
17. Nargund G, Fauser BC, Macklon NS, Ombelet W, Nygren K, Frydman R. TheISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod*. 2007(b); 22:2801-4.
18. Fernandez-Shaw S, Pérez Esturo N, Cercas Dunque R, Pons Mallol I: Mild IVF using GnRH agonist long protocol is possible: comparing stimulations with 100 UI vs. 150 UI recombinant FSH at starting dose. *J Assist Reprod Genet* 2009, 26(2-3):75-82.
19. Ubaldi F, Rienzi L, Baroni E, Ferrero S, Iacobelli M, Minasi MG, et al. Hopes and facts about mild ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14:675
20. Van Leeuwen FE, et al. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13:476-80.
21. Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53:375–80.
22. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*. 2001; 2:280-91.
23. Verberg MF, Eijkemans MJ, MacKlon NS, Heijnen EM, Baart EB, Hohmann PP, et al. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009; 15:5-12.
24. Yu Ng EH, Yeung WS, Yee Lan Lau E, So WW, Ho PC. High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. 2000.
25. Levi AJ, Drews MR, Bergh PA, Miller BT, Scott RT Jr. Controlled ovarian hyperstimulation does not adversely affect endometrial receptivity in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2001; 76:670-4.
26. Morgia F, Sbracia M, Schimberni M, Giallonardo A, Piscitelli C, Giannini P, et al. A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 81:1542–7.
27. Pelinck MJ, Vogel NE, Hoek A, Simons AH, Arts E, Mochtar MH, et al. Cumulative pregnancy rates after three cycles of minimal stimulation IVF and result according to subfertility diagnosis: a multicentre cohort study. *Hum Reprod*. 2006; 21:2375-83.

**Comparación de los resultados reproductivos de Ciclos de Fertilización In Vitro observados al emplear diferentes dosis de Gonadotropinas para Estimulación Ovárica en pacientes menores de 35 años.**

28. Pelinck MJ, Vogel NE, Hoek A, Arts EG, Simons AH, Heineman MJ. Minimal stimulation IVF with late follicular phase administration of the GnRH antagonist cetrorelix and concomitant substitution with recombinant FSH: a pilot study. *Hum Reprod* 2005; 20:642–8.
29. Polinder S, Heijnen EM, Macklon NS, Habbema JD, Fauser BJ, Eijkemans MJ. Cost effectiveness of a mild compared with a standard strategy for IVF: a randomized comparison using cumulative term live birth as the primary endpoint. *Hum Reprod*. 2008; 23:316-23
30. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozenthawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011; 96:344–8.
31. Revelli et al.: Milder is better? advantages and disadvantages of “mild” ovarian stimulation for human in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011 9:25.
32. Devroey P, Aboulghar M, Garcia-Velasco J, Griesinger G, Humaidan P, Kolibianakis E, Ledger W, Tomás C, Fauser BC: Improving the patient’s experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod* 2009, 24(4):764-774.
33. 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(6):454-460.
34. Manual de Procedimientos IECH 2017.
35. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H et al. 1987 Cryopreservation of human oocytes. *Human Reproduction* 2, 695-700.