

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO PUERTA DE
HIERRO
INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA “VIDA”**



**“TASA DE EMBARAZO EN TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
CONGELADOS CON EL USO DE CICLO NATURAL, MODIFICADO Y
VALERATO DE ESTRADIOL-PROGESTERONA”**

Tesis para obtener diploma en el Post Grado de:

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Presenta:

DRA. ZAIDA MARIA VILLA DELUNA

Dr. Efraín Pérez Peña

Asesor Académico

Dr. Francisco Rojas Romero.

Asesor Operacional

Guadalajara, Jalisco, México, 2014



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.

INDICE

INDICE	2
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	5
MARCO TEÓRICO	9
FERTILIZACIÓN E IMPLANTACIÓN	9
FERTILIZACION IN VITRO	12
EL CICLO DE FERTILIZACIÓN IN VITRO	14
TRANSFERENCIA EMBRIONARIA	16
TIPOS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA	16
TRANSFERENCIA INTRAUTERINA	17
TRANSFERENCIA INTRATUBÁRICA	17
TÉCNICA	18
FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL ÉXITO DE UNA TRANSFERENCIA	23
MÉDICO “TRANSFERIDOR”	24
TIPO DE CATÉTER	24
SANGRADO	25
RETIRADA DEL MOCO CERVICAL	25
ECOGRAFÍA	25
REPLECIÓN DE LA VEJIGA URINARIA	26
REPOSO POST-TRANSFERENCIA	26
TRANSFERENCIA DIFÍCIL	27
CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES	27
ESQUEMAS DE PREPARACION ENDOMETRIAL	28
CICLO NATURAL	29
CICLO NATURAL MODIFICADO	29
CICLO ARTIFICIAL PREPARADO CON VALERATO DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31

JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
HIPÓTESIS	36
MATERIAL Y METODOS	37
TIPO DE ESTUDIO	37
UNIVERSO DE ESTUDIO	37
CRITERIOS DE SELECCION	37
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	37
CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	37
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:	38
TAMAÑO DE MUESTRA	38
TÉCNICA DE RECOLECCION DE INFORMACIÓN	38
OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES	39
ESTE ESTUDIO SE REALIZO	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
CONSIDERACIONES ETICAS	40
RECURSOS	41
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

INTRODUCCION

Se ha demostrado que las tasas de embarazo por transferencia de embriones congelados (TEC) han sido más bajas que la transferencia de embriones en fresco. Sin embargo, las TEC incrementan la tasa de embarazo acumulativa, reduce costos, es relativamente simple de llevar a cabo y puede significar un periodo de tiempo menor en comparación con los ciclos en fresco repetidos. Por lo tanto, los esfuerzos para estudiar los factores que afectan el éxito de las TEC se han intensificado.

Las TEC fueron realizadas con diferentes regímenes de preparación endometrial: ciclo natural, ciclo natural modificado y artificialmente preparado por estrógenos y progesterona y la ovulación inducida con hCG (Wright, Guibert, Weitzen, Davy, Fauque, & Olivennes, 2006), (Imbar & Hunwitz, 2004).

Ciertamente para algunas pacientes esto es necesario porque sus ciclos son irregulares o ausentes. Por otro lado, el ciclo natural es la opción para pacientes que ovulan regularmente. Hay un gran número de factores más allá de estas dos consideraciones que se deben de tomar en cuenta para la elección del protocolo a emplear ya que cada caso es único. Según la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Registro latinoamericano de reproducción asistida 2008-2009. , 2010) reportó que en el 2009 se realizaron 4711 TEC en toda Latinoamérica.

Nosotros nos dimos la tarea de investigar la tasa de embarazos en TEC mediante ciclo natural, seminatural y uso de valerato de estradiol-progesterona por 2 años (n= 168).

ANTECEDENTES

El primer embarazo con éxito después de la transferencia de embriones congelados-descongelados (TEC) lo informaron en 1983 Trounson y Mohr (Trounson & Mohr, 1983). Posteriormente la criopreservación de embriones se ha convertido en una parte integrante de los programas de tecnologías de reproducción asistida (TRA). Siempre se ha encontrado que las tasas de embarazo después del tratamiento con TEC son menores de las que siguen a la transferencia de embriones mediante embriones frescos (ESHRE, 2006). Sin embargo, la TEC aumenta la tasa de embarazo (acumulativo), reduce el coste, es relativamente sencilla de realizar y se puede realizar en un período de tiempo más corto comparada con los ciclos “frescos” repetidos.

Los factores importantes en el proceso de implantación de los embriones son la receptividad del endometrio y la sincronización entre el desarrollo embrionario y el endometrial. La TEC se debe sincronizar para que la edad de los embriones después de la descongelación coincida con la edad endometrial el día de la transferencia de los embriones. La TEC se ha realizado mediante diferentes regímenes cíclicos; ciclos ovulatorios espontáneos (ciclo natural), ciclos en los cuales la ovulación se induce con fármacos (ciclo de inducción de la ovulación) y ciclos en los cuales el endometrio se prepara artificialmente mediante las hormonas estrógeno (E) y progesterona (P) (ciclo artificial).

La realización de la TEC en un ciclo natural monitorizado tiene la ventaja de que no se utilizan fármacos, lo que hace que tales ciclos sean preferibles para muchas mujeres. Lo anterior sólo es factible para las mujeres con ciclos regulares y ovulación comprobada. Sin embargo, incluso en las mujeres que tienen ciclos menstruales regulares, es posible que la ovulación no ocurra siempre y la sincronización de la TEC también puede ser problemática. La monitorización del

ciclo a menudo consta de varias exploraciones ecográficas pelvianas o endovaginales para confirmar el desarrollo folicular y para determinar el momento de la prueba para la hormona luteinizante (LH), la prueba de orina para la detección del aumento de LH y una exploración adicional para las pruebas ecográficas de la ovulación. El desarrollo espontáneo del endometrio en la fase folicular está afectado por la edad, la cual puede ser un factor que dé lugar a una menor tasa de embarazo en las mujeres de mayor edad (Sher, Herbert, Maassarani, & Jacobs, 1991).

Para reducir algunos de estos problemas se han utilizado agentes para la inducción de la ovulación (citrato de clomifeno o gonadotropinas, o una combinación de ambos) (Mandelbaum, et al., 1987). Sin embargo, incluso con su uso las tasas de cancelación de ciclos pueden ser altas.

Un método alternativo para desarrollar un endometrio receptivo a la implantación es un ciclo artificial controlado hormonalmente mediante el estrógeno (E) y la progesterona (P) exógenos administrados secuencialmente. Dicho régimen se utilizó por primera vez en mujeres sin función ovárica que reciben embriones de donantes de ovocitos (Lutjen, Trounson, Leeton, Findlay, Wood, & Renou, 1984). En las mujeres con función ovárica conservada se utilizó un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) para suprimir la función ovárica temporalmente y hacer que la paciente esté funcionalmente agonadal antes de inducir un ciclo artificial con E y P. Mediante este régimen la implantación y las tasas de embarazo en las receptoras de ovocitos de donantes, con función ovárica conservada, fueron similares a las de las receptoras sin función ovárica (Borini, Violini, Bianchi, Bafaro, Trevisi, & Flamigni, 1995), (Flamigni, Borini, Violini, Bianchi, & Serrao, 1993), (Pados, Camus, Van Waesberghe, Liebaers, Van Steirteghem, & Devroey., 1992). Sin embargo, estos ciclos son más costosos y el GnRHa puede tener efectos secundarios y retardar la reanudación de la ovulación espontánea si la TEC fracasa. En las mujeres con función ovárica conservada también se ha utilizado un régimen simplificado que mantiene los beneficios pero reduce el coste

y los efectos secundarios, el cual consta de E y P exógenos solamente (sin un GnRHa) (Jaroudi, Hamilton, Willemsen, Siek, & Roca, 1991), (Lelaidier, Olivennes, de Ziegler, Hazout, Freitas, & Frydman, 1995). Con este enfoque, el inicio del E exógeno administrado por vía oral el día uno del ciclo evita el reclutamiento folicular al suprimir la hormona foliculoestimulante (FSH), por lo que se evita la ovulación espontánea. En las mujeres con función ovárica conservada los implantes de estradiol también han mostrado que provocan la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis y una preparación adecuada del endometrio (Ben-Nun & Shulman, 1997).

La mayoría de los protocolos de ciclos artificiales imitan las fluctuaciones hormonales del ciclo natural, pero las sustancias activas utilizadas varían, al igual que las vías de administración del E y la P. El E puede ser administrado en forma de comprimidos orales, parches transdérmicos, implantes subcutáneos y anillos o tabletas vaginales. La P se puede administrar en forma de comprimidos orales, inyecciones intramusculares y supositorios o anillos intravaginales (Devroey & Pados, 1998).

La ventaja de los regímenes de reemplazo hormonal es un mayor control y flexibilidad en el momento de la transferencia. La duración de la fase folicular se puede modificar sin afectar las tasa de implantación o de embarazo (Leeton, Rogers, & Healy, 1991), (Navot, Anderson, Droesch, Scott, Kreiner, & Rosenwaks, 1989) y la tasa de cancelación de ciclos es baja. Sin embargo, el coste es mayor, en particular si se utiliza un GnRHa. Los regímenes fijos de E y P pueden ser inadecuados para el desarrollo endometrial apropiado bajo ciertas circunstancias. En las mujeres con ovarios funcionantes, se ha señalado la posibilidad de que los factores estimuladores de origen embrionario (como las gonadotropinas coriónicas humanas) puedan dar lugar a la producción de sustancias ováricas (p.ej. andrógenos o ciertos péptidos), con un efecto sobre la calidad del endometrio. Si ocurre un embarazo se debe continuar con el E y la P hasta que se establezca la autonomía placentaria que haga la función del cuerpo amarillo ausente.

Estudios más antiguos informaron que las tasas de embarazo en ciclos artificiales eran equivalentes a las obtenidas después de la TEC en ciclos ovulatorios espontáneos, con tasas de cancelación bajas (de Ziegler, Cornel, Bergeron, Hazout, Bouchard, & Frydman, 1991), (Frydman, Bouchard, & Parneix, 1988), (Meldrum, Wisot, Hamilton, Gutlay-Yeo, Marr, & Huynh, 1989), (Schmidt, et al., 1989), (Troup, Matson, Critchlow, Morroll, Lieberman, & Burslem, 1991). Algunos estudios posteriores (a menudo con escasos números) informaron mejores resultados en los ciclos artificiales, en lugar de los ciclos naturales (Davies, et al., 1991), (Mausher, Kruithoff, Simonetti, Oehninger, Acosta, & Jones, 1991); mientras que otros no informaron diferencias (Irianni, Veeck, Toner, & Muasher, 1992), (Sathanandan, Macnamee, Rainsbury, Wick, Brinsden, & Edwards, 1991). Por otro lado, se ha señalado preocupación acerca de lo adecuado de los diferentes regímenes de reemplazo y la posibilidad de tasas mayores de pérdida temprana del embarazo (Lelaidier, de Ziegler, Gaetano, Hazout, Fernandez, & Frydman, 1992). Por lo tanto, se mantiene la duda en cuanto a qué tipo de ciclo es superior y muchas unidades de infertilidad utilizan una mezcla de protocolos para la TEC. La efectividad clínica de los diferentes enfoques sólo se puede determinar mediante ensayos controlados aleatorios (ECAs) que comparan los tres regímenes cíclicos mencionados.

Esta revisión tuvo como objetivo determinar si el resultado de la TEC en un ciclo artificial donde se prepara el endometrio con E y P, o un ciclo con inducción de la ovulación, es diferente al que sigue a un ciclo natural monitorizado. Los hallazgos pueden ser de interés para los médicos y los profesionales de la atención sanitaria que ofrecen tratamiento de TRA y para las parejas con infertilidad que reciben tratamiento con TRA.

MARCO TEÓRICO

FERTILIZACIÓN E IMPLANTACIÓN

Se requiere un sistema neuroendócrino funcional tanto en el hombre como en la mujer para que tengan lugar de manera normal la espermatogénesis y ovulación y que en presencia de oviductos normales suceda la fertilización. En ocasiones las endocrinopatías no son tan severas y no impiden la fertilización; aún así, es común un mal pronóstico para el embarazo por hiperprolactinemia, elevación prematura de LH, hiperandrogenemia, alteraciones en hormonas tiroideas y otras, que condicionan un mal ambiente para la implantación y también foliculogénesis o espermatogénesis inadecuadas que generan gametos defectuosos con mayores tasas de abortos.

Gran parte de la información que existe deriva de la investigación en reproducción asistida. Alrededor de 36 horas después del inicio del pico de LH se presenta la ovulación. En promedio, el óvulo mantiene una capacidad para ser fertilizado de 12 a 24 horas después de la ovulación mientras que el espermatozoide es capaz de fertilizar por 24 a 48 horas después de la eyaculación. Los espermatozoides alcanzan el tercio externo de la trompa de Falopio 5 a 10 minutos después del coito y continúan migrando hasta las 48 horas (Mesiano, 2009). Cuando se expulsa un óvulo maduro en metafase II, el espermatozoide, que se fija a proteínas específicas en la zona pelúcida, es capaz de penetrar al óvulo gracias al contenido de enzimas del acrosoma; la membrana acrosomal se fusiona con la membrana citoplasmática del oocito y libera las enzimas acrosina y hialuronidasa, que abren una vía para que el espermatozoide atraviese el cumulus oophorus, la corona radiada y la zona pelúcida. A esto se le denomina reacción acrosómica. Después de que el espermatozoide penetra, su cabeza forma el pronúcleo masculino, que se coloca frente a su homólogo femenino y los nucléolos se alinean antes de la singamia o fusión nuclear (Rijnders, 1996). Posteriormente, el

cigoto experimenta sucesivas mitosis, que en estadios tempranos suceden a intervalos de 16 a 24 horas con divisiones asincrónicas. Como se ve en los capítulos de reproducción asistida, la tasa de división, temprana o tardía, es uno de los parámetros para evaluar la calidad embrionaria.

El desarrollo desde fecundación hasta mórula tiene lugar en las trompas, mientras el cigoto desciende gracias al movimiento ciliar y peristalsis tubarias; a lo largo de este recorrido se encuentra englobado en la zona pelúcida, encargada de proporcionarle un microambiente adecuado; estrógenos y progesterona modulan y facilitan este transporte. Entre los días 4 y 5 el embrión entra en la cavidad uterina en estadio de mórula y flota libremente por 2 a 3 días, se expande para formar el blastocisto, que se extruye de la zona pelúcida para implantarse alrededor del sexto día posfecundación (Speroff & Fritz, 2005).

Para un embarazo normal se requiere una adecuada implantación del embrión, lo que sólo sucede en alrededor de una tercera parte de los óvulos fecundados. A esto debemos agregar los casos que terminan en aborto, de los cuales el 22% ocurre antes de que pueda detectarse clínicamente.

Una apropiada implantación requiere preparación endometrial para recibir al embrión y mantenerlo. Para ello es fundamental la acción de estrógenos y progesterona. Además intervienen los factores de crecimiento y las citocinas (Paria, Reese, Das, & Day, 2002), mediados por los esteroides ováricos que promueven la actividad y receptividad del endometrio con respecto a un embrión en estadio de blastocisto en un lapso denominado *ventana de implantación*. Durante los días 20 a 24, el endometrio desarrolla unas estructuras de unión llamadas *pinópodos*, las cuales expresan citocinas y CAM (*cell adhesion molecules*) que atraen y adhieren al embrión, paradójicamente expresando una molécula repelente: MUC-1, que previene su adhesión (Mesiano, 2009).

Como la implantación es un factor limitante muy importante para lograr un embarazo normal, actualmente se efectúa investigación en diferentes áreas para comprenderla mejor, por ejemplo, lo que sucede en embriones en monocapas de células endometriales en cultivo, estudio de factores inmunológicos que permiten que este aloinjerto no sea rechazado, estudio de genes que se activan en el endometrio en esta fase (Kao, TulaC, Lobo, & al., 2002), así como la interacción de diversos moduladores de la acción hormonal estrogénica y progestacional.

La lista de citocinas y factores de crecimiento que intervienen en la implantación es interminable, pero entre ellos destacan: el factor inhibidor de la leucemia (LIF), diversas interleucinas (IL), factor de crecimiento epidérmico (EGF), prostaciclina (PGI_2), prostaglandina E_2 (PGE_2), el receptor del activador proliferador del perioxoma (PPAR), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factor estimulante de colonias (G-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), receptor activador proliferativo de peroxisomas (PPAR), productos de los genes HOXA10 y HOXA11, matriz metaloproteínasa 2 y 9 (MMP2 y MMP9), etc. Se denomina *quimiocinas* al subgrupo de citocinas que tienen la capacidad de atraer químicamente a diferentes tipos de leucocitos al tejido endometrial donde se encuentran. Además de las citocinas y factores de crecimiento, desempeñan funciones muy importantes las moléculas de adhesión celular y las proteínas de la matriz extracelular.

El trofoblasto secreta múltiples proteínas entre las que se incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF), los cuales estimulan el desarrollo de vasos sanguíneos entre las vellosidades (Brauenstein, 2008).

La implantación consta de tres fases:

- *Aposición.* Cuando el blastocisto encuentra su lugar de implantación dirigiendo su polo embrionario hacia la pared endometrial.
- *Adhesión.* Al establecer contacto directo con el epitelio endometrial.
- *Invasión.* Cuando penetra el endometrio, el sincitiotrofoblasto secreta proteasas que degradan la matriz extracelular endometrial, invadiendo los vasos sanguíneos estromales. El embrión actúa como un aloinjerto que inhibe las células asesinas naturales (NK), lo que causa tolerancia inmunológica materna. A las pocas horas de su implantación, el endometrio se modifica para formar la decidua y se reclutan células inflamatorias y endometriales. La invasión del endometrio se facilita por la apoptosis del epitelio uterino cuando el embrión se encuentra frente a él (Coutifaris & Coukos, 1994).

La HCG se detecta 24 horas después de la implantación y mantiene al cuerpo lúteo funcionando hasta su relevo por el trofoblasto. Al principio se estimula la producción hormonal del cuerpo lúteo y después el tejido placentario se hace cargo de la secreción hormonal, en cuya síntesis utiliza como precursores hormonas fetales y maternas. Paulatinamente se integra una verdadera unidad materno-feto-placentaria con funciones endócrinas para regular las cambiantes demandas del feto y los procesos adaptativos de la madre, evitar el rechazo inmunológico contra el feto, mantener el embarazo y en el tiempo propicio iniciar el trabajo de parto y la lactancia.

FERTILIZACION IN VITRO

La fecundación in vitro (FIV o IVF por sus siglas en inglés) es una técnica por la cual la fecundación de los ovocitos por los espermatozoides se realiza fuera del cuerpo de la madre. El término in vitro es un término en latín que significa en cristal, en los primeros experimentos biológicos los cultivos de tejido realizados fuera del organismo se realizaban en tubos de ensayo, probetas o placas de Petri cuyo material es el cristal, el término in vitro se utilizaba para diferenciar un

experimento in vivo donde se realizaban dentro del organismo (Rizk, García-Velasco, Sallam, & Makrigiannakis, 2008).

La fertilización in vitro aparece como técnica especial para tratar la infertilidad en 1978, de ahí se ha perfeccionado, convirtiéndose en una técnica que realiza la transferencia de embriones (FIV y TE) que consiste en la aspiración transvaginal de ovocitos para inseminarse con espermatozoides previamente preparados, proporcionar condiciones óptimas para la fertilización en el laboratorio, evaluar la división celular de los embriones y transferirlos en el momento oportuno por vía transcervical a la cavidad endometrial (Rizk, García-Velasco, Sallam, & Makrigiannakis, 2008), (Brinsden P. , 2005).

Se considera que más de cinco millones de niños han nacido como resultado de esta técnica y múltiples variantes derivadas de ella. Esta técnica de FIV se utiliza en todo el mundo y sólo en Estados Unidos existen más de 400 centros de reproducción asistida (RA). En México menos del 50% de los centros existentes están acreditados e informan anualmente sus resultados a la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Brinsden P. , 2005), (Pérez-Peña, Gutiérrez-Gutiérrez, Pascual-Rodríguez, & González-Ortega, 2009).

La FIV requiere una cavidad uterina adecuada, al menos un ovario funcional y accesible para la obtención de ovocitos y una muestra espermática aceptable (Pérez-Peña, Gutiérrez-Gutiérrez, Pascual-Rodríguez, & González-Ortega, 2009). Si estos factores no están disponibles se deben considerar otras alternativas, como empleo de madres subrogadas, donación de óvulos, Inyección intracitoplasmática e esperma (ICSI) y empleo de espermatozoides de donador. Como la fertilidad disminuye con la edad de la mujer, éste es un factor muy importante al evaluar resultados esperados (Gardner, Weissman, Howles, & Shoham, 2009).

Entre el sexto y séptimo día de desarrollo uno de esos folículos toma el lugar dominante e impide el desarrollo de los demás convirtiéndose en el único que

llega al momento de la ovulación. En los tratamientos de fertilización asistida convencionales, se suelen utilizar diferentes dosis de hormonas para lograr mayor cantidad de óvulos disponibles para intentar la fertilización y así tratar de transferir al útero más de un embrión (Kolibiankis, Zikopoulos, Camus, & Tournaye, 2004).

Para ello, se lleva a cabo un monitoreo ultrasonográfico y/o de niveles de estradiol sérico para comprobar la respuesta a la medicación administrada. Estos controles permiten ajustar la medicación en función de la respuesta y determinar el mejor momento para realizar la aspiración de los ovocitos.

El ciclo de fertilización in Vitro

El procedimiento normal de un ciclo de fertilización in Vitro incluye cuatro pasos:

- 1) La estimulación ovárica controlada.
- 2) Aspiración folicular
- 3) Fertilización en laboratorio.
- 4) Transferencia de embriones.

La Fertilización in Vitro es un proceso que se desarrolla paulatinamente a lo largo de varias fases. Primero se estimulan los ovarios para obtener ovocitos, que más tarde, se inseminarán in vitro en el laboratorio (Aanesen, Nygren, & Nylund, 2010). Después de cultivar estos ovocitos fecundados se procede a la transferencia de los mejores embriones al interior del útero de la mujer para que puedan implantar y dar lugar al tan deseado embarazo (Pérez Peña, 2011).

1ª Fase FIV “Estimulación ovárica controlada”: El objetivo de esta fase de la fecundación in vitro es el desarrollo de varios folículos en los ovarios. No existe una pauta estándar en esta fase y la medicación que se administra depende mucho de las características de cada paciente. Algunos de los criterios que se tienen en cuenta a la hora de pautarla son la edad, las características morfológicas de sus ovarios, los resultados de los análisis hormonales, el peso, el tamaño, y en

su respuesta a los procesos de estimulación de los ciclos reproductivos (Pérez Peña, 2011). Se deberán valorar todas estas variables y, entonces pautar la medicación más conveniente para favorecer el desarrollo folicular múltiple (DFM). Un número elevado de folículos aumenta las posibilidades de obtener suficientes embriones de calidad que posibiliten la posterior implantación uterina y, en consecuencia, el éxito del tratamiento. Para favorecer este DFM se suelen emplear inyecciones de hormonas gonadotrofinas (FSH), además se mantiene un control exhaustivo de la respuesta ovárica de cada paciente. De tal forma que se pueda determinar cual es el mejor momento para inducir la ovulación.

La “Desensibilización de la hipófisis”, se lleva a cabo durante un tratamiento de FIV y consiste en suministrar a la paciente medicamentos (agonistas ó antagonistas de la GnRH) que se encargan de inhibir la acción de las hormonas secretadas por la hipófisis, para poder controlar su funcionamiento favoreciendo la estimulación ovárica posterior.

2ª Fase FIV “Estimulación ovárica controlada”: Esta fase se inicia después de comprobar el desarrollo de los folículos ováricos. Se busca que estos alcancen un tamaño superior a los 18 mm; una vez que se ha verificado esto y que se obtiene una lectura favorable de los niveles de estradiol se puede proceder con la inducción a la ovulación. Para lograrla artificialmente se recurre a la hormona gonadotropina coriónica. Esta hormona induce la maduración final del ovocito y la consiguiente ovulación (Westergaard, Bossuyt, van der Veen, & van Wely, 2009).

3ª Fase “Obtención de los ovocitos”: Una vez logradas las condiciones óptimas para la maduración de los ovocitos se procede a la extracción de éstos, de los folículos ováricos. Para realizarla se emplea la punción-aspiración transvaginal guiada ecográficamente (Pérez Peña, 2011). El líquido folicular aspirado pasa al laboratorio donde el equipo técnico se encarga de recuperar, lavar y clasificar los óvulos obtenidos. En este proceso se valora tanto la madurez como la calidad de éstos lo que permite escoger los más viables para llevar el proceso a buen término.

Una vez clasificados, los ovocitos son almacenados en el interior de incubadoras especiales que los mantienen a 37°C mientras esperan ser inseminados por los espermatozoides. Esta tercera fase del proceso de Fecundación in Vitro tiene lugar alrededor de 36 horas después de haber procedido a inducir la ovulación. Es una intervención breve, se emplea una sedación ligera y la paciente externarse (Pérez Peña, 2011).

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria (TE) es el proceso mediante el cual depositamos en la paciente los embriones generados en el laboratorio de FIV. Con ello culmina y finaliza el proceso. Tras la TE, el éxito de la FIV depende de la capacidad del embrión para establecer el diálogo con el endometrio que culmina con su implantación.

La técnica para la TE es básicamente un “arte” que desgraciadamente se basa más en habilidades personales que en parámetros objetivos y científicos.

Durante muchos años los esfuerzos en el terreno de la reproducción asistida se centraron en mejorar la estimulación ovárica y las condiciones técnicas de los laboratorios, hasta que nos dimos cuenta de que las tasas de implantación varían dependiendo de quién y cómo ha realizado la transferencia. En la actualidad ésta se considera un paso fundamental dentro de la FIV, y todos creemos que la mejora de los resultados de la FIV en los últimos años obedece, entre otras causas, a que se cuida más la TE.

TIPOS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Existen, básicamente, tres tipos de transferencia, dependiendo de dónde se depositen los embriones y en qué estadio:

Transferencia intrauterina

Es la más utilizada en la actualidad por su sencillez y porque las demás forma de TE no han demostrado una mejora en los resultados.

En la transferencia intrauterina depositamos los embriones a través de la vagina, canalizando el cérvix uterino hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial.

Transferencia intratubárica

Este tipo de transferencia se realiza en la trompa. A través de una laparoscopia se canaliza el extremo distal de la trompa y se depositan gametos, cigotos o embriones en el tercio externo de la tuba. En la actualidad sus indicaciones son muy limitadas, y únicamente se reversa para los casos en que la TE es difícil o imposible por vía vaginal. Las tasas de embarazo son similares y, por tanto, tiene poco sentido aumentar el riesgo quirúrgico sin lograr ningún beneficio.

Transferencia intratubárica de gametos (GIFT)

Consiste en la transferencia de los gametos femeninos y masculinos. Realizada por primera vez por Asch (Asch, Balmaceda, Ellsworth, & al., 1986) en 1985, con esta técnica se trata de facilitar la inseminación la zona donde se produce la fecundación natural. Tanto la recuperación ovocitaria como la transferencia se realizan en el mismo acto quirúrgico. En la actualidad está reservada únicamente para los grupos que, por motivos éticos y religiosos, no pueden acceder a la FIV.

Transferencia intratubárica de cigotos (ZIFT)

Fue descrita por primera vez por Devroey (Devroey, Braekmans, Smith, & al., 1986). Consiste en la colocación de cigotos en la trompa. Se realiza a las 24 hrs de la captación ovocitaria, en el momento en que aparecen los dos pronúcleos y se han extruido los dos corpúsculos polares.

Transferencia intratubárica de embriones (TET)

En esta variante se introducen embriones de dos días a las 48 hrs de la captación. La técnica se debe a Balmaceda (Balmaceda, Gestaldi, Remohí, & al., 1988), quien la

introdujo en 1988. Tiene la ventaja, respect a las anteriores, de que se puede valorar la calidad de la division embrionaria.

Transferencia transmiometrial

Los embriones se depositan en el endometrio a través de la punción del miometrio con una aguja de 18 G. La técnica se realiza bajo control ecográfico, y con un catéter blando se llega hasta el endometrio. Algunos autores, como Kato, tiene una vasta experiencia con dicha técnica.

Técnica

La transferencia de los embriones a la cavidad uterina se efectúa por vía transcervical con monitorización ultrasonográfica transabdominal con vejiga llena (Coroleu, et al., 2000). Es una parte fundamental puesto que las variables que determinan los resultados en un ciclo de FIV son: calidad embrionaria, receptividad endometrial y la eficiencia de la transferencia. Mientras más atraumática y aséptica (Egbase, Al-Sharhan, Al-Othman, Al-Mutawa, Udo, & Grudzinskas, 1996) sea la técnica, mejores serán los resultados. Influye también el que la paciente esté relajada, para lo cual hay que cuidar los detalles. Las transferencias difíciles y traumáticas ocasionan mayor contractilidad uterina y sangrado, y ello disminuye las tasas de implantación (Nasseri, Copperman, & Corfman, 1998).

Para dominar la técnica se requiere entrenamiento y luego práctica constante. La transferencia se efectúa en condiciones estériles, en el quirófano adyacente al laboratorio de gametos y embriones, con la paciente en litotomía y después de efectuar lavado genital con solución salina fisiológica. No se necesita anestesia ni sedación, aunque sí condiciones que reduzcan el estrés que este paso representa para la paciente. Puede administrarse media hora antes un relajante muscular con propiedades analgésicas, o utilizar medidas alternativas para reducir el estrés (Westergaard, Mao, Kroglund, Sandrini, Lenz, & Grinsted, 2006), (Levitas, et al., 2006). Se debe evitar que la paciente sufra con la vejiga sobredistendida, para lo cual se efectúa revisión periódica previa del llenado vesical con sonograma abdominal

antes de pasarla al quirófano.

Es recomendable efectuar el paso de un catéter de transferencia como prueba o ensayo (*mock or dummy transfer*), en un ciclo previo o durante la captura folicular (Mansour, Aboulghar, & Serour, 1990). Es muy importante documentar esta transferencia de prueba con todas sus características, tamaño del espejo vaginal y el tipo de angulación al catéter que dio los mejores resultados, así como tener disponible este informe en el momento de la transferencia. Lo anterior debe efectuarse con vejiga llena para que las condiciones sean similares a la transferencia real. Permite detectar casos donde se anticipe una transferencia difícil e incluso efectuar medidas correctivas previas como dilatación cervical, empleo de laminarias o histeroscopia (Noyes, 1999).

No es conveniente utilizar pinzas de Pozzi para tracción ni dilatación cervical puesto que la manipulación del cérvix aumenta la contractilidad uterina. Se limpia el exceso de moco con medio de cultivo. Se extrae el moco endocervical aspirando con una jeringuilla de insulina y un catéter y con la ayuda de unas pinzas delgadas. Hay quienes recomiendan vigoroso lavado endocervical (McNamee, Huang, & Carwile, 1998), lo cual no ha demostrado ser necesario (Glass, Green, Fluker, Schoolcraft, McNamee, & Meldrum, 2000).

Se procede a pasar el catéter guía, el cual puede introducirse hasta poco después del orificio endocervical o hasta 1-1.5 cm del fondo uterino sin tocarlo; luego se inserta el catéter blando de transferencia con vigilancia ultrasonográfica (Wood, Batzer, Go, Gutman, & Corson, 2000). Cuando llega a la punta del anterior, se retrae la guía y se deja el catéter de transferencia con los embriones en el sitio seleccionado. Acto seguido, con la jeringa de insulina, se empuja el émbolo en forma firme y lenta, manteniendo la presión por 30 a 60 segundos, para luego retirar el catéter guía y el de transferencia juntos para su examen bajo microscopio. El depositar la muestra muy lejos del fondo favorece embarazos cervicales, mientras que muy altos, los tubarios (Yovich, Turner, & Murphy, 1985).

Un punto importante en la transferencia es la preparación del catéter con los embriones, para lo cual se colocan en un mínimo de medio de cultivo (alrededor de 20 μ L) entre dos pequeñas columnas de aire y dos porciones de 5 μ L de medio de cultivo sin embriones, así como una columna de medio para llenar el espacio muerto del catéter. Éste se fija con firmeza a una jeringa de insulina (**Figura 1**). La introducción de volúmenes altos de medio o aire favorece la expulsión de los embriones. Una variante para cargar el catéter es sin las interfases de aire en una columna de medio de cultivo, donde los embriones se depositan cerca del final del catéter. No se debe dejarlos muy cerca del extremo distal o muy cercanos al extremo proximal del catéter para evitar la pérdida o la retención de los mismos. Técnicas de transferencia deficiente incluyen: contaminar la punta del catéter, inserción traumática, no aspirar adecuadamente el moco, considerar que se está en cavidad endometrial sin estarlo, tocar el fondo uterino, ejercer presión débil o exagerada al inyectar, reaspirar el medio con los embriones al no mantener presionado el émbolo, etc. Al retirar el catéter y la guía deben examinarse en un microscopio estereoscópico; si hay retención de embriones se requiere una nueva transferencia. Una vez que se demuestra que el catéter está limpio, se retira y se mantiene a la paciente en posición de litotomía alrededor de 20-30 minutos; no se produce mejoría en los resultados con lapsos mayores de reposo (Sharif, et al., 1995).

Para transferencias difíciles existen alternativas como el empleo de catéteres metálicos flexibles, como el de Kilani, en cuyo interior se pasa el catéter con los embriones. También existen métodos como el de Towako, en donde el depósito de los embriones es transmiometrial, con guía sonográfica endovaginal. Los informes de resultados con diferentes tipos de catéteres son contradictorios, según la experiencia y preferencia de los operadores, aunque la tendencia actual es utilizar catéteres más blandos por ser menos traumáticos y considerar que ésta y otras medidas están contribuyendo a mejorar los resultados que hoy se verifican. El empleo de estos catéteres requiere más experiencia puesto que son más

difíciles de pasar por el endocérnix, y por eso muchos de ellos constan de una cubierta rígida exterior móvil o una guía interior móvil semirrígida y maleable para facilitar la inserción.

Un avance notable en la transferencia embrionaria es la visualización sonográfica de catéteres con punta ecogénica durante el procedimiento, lo que permite la localización precisa del sitio donde se depositarán los embriones. Para ello se requiere la vejiga llena y el transductor abdominal. Con la evaluación sonográfica se ha logrado determinar que a veces la localización del catéter dista mucho de estar donde se suponía.

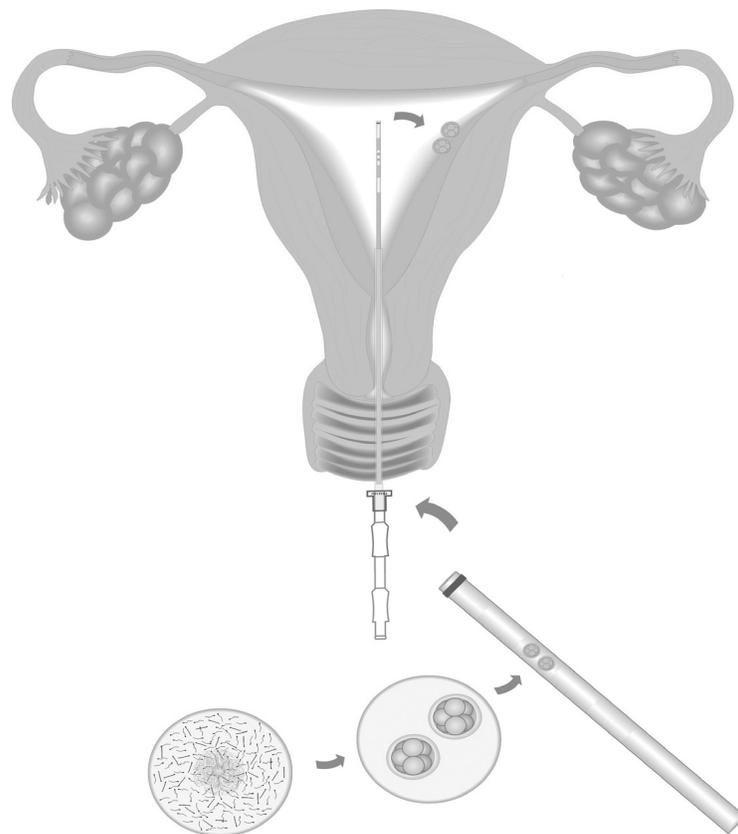


Figura 1. Transferencia embrionaria.

Puntos fundamentales en la técnica son la decisión de cuántos y cuáles embriones

transferir, el día más apropiado para realizar el procedimiento y las medidas para evitar al máximo los embarazos múltiples.

La selección de los mejores embriones con el mayor número de parámetros es fundamental de acuerdo a lo ya señalado. En mujeres menores de 35 años, con embriones de buena calidad y tratándose del primer o segundo intento de FIV, es recomendable transferir no más de 2 embriones. En aquellas que no reúnen estos requisitos se recomienda la transferencia de 3 embriones (**Figura 2**), de acuerdo a la edad, número de intentos, características de los embriones, etc. (American Society of Reproductive Medicine. , 2004) Se procura al máximo evitar el riesgo de embarazos múltiples, lo cual es una complicación. Para ello en Europa una tendencia es la transferencia de un solo embrión (*single embryo transfer*, SET) (Bergh, 2005), (Barlow, 2005), (Gerris, De Neuborg, Mangelschots, van Royen, Van de Meersschle, & Valken-burg, 1999). Es difícil que esta práctica se generalice. Se ha calculado que al implementarla habría una reducción del 42-70% de nacimientos; por otro lado, los embarazos dobles obtenidos por reproducción asistida no difieren del tiempo de terminación de los dobles obtenidos espontáneamente (Dickey, Sartor, & Pyrzak, 2004), (Pandian, Bhattacharva, Ozturk, Serour, & Templeton, 2004).

La mayoría de las transferencias se realizan en el día 3 cuando los embriones han llegado al estadio de 8 células; se reservan las del día 5 para casos especiales. En general hay una tendencia a más embarazos en día 3 que en 2, pero la diferencia no es significativa (Oatway, Gunby, & Daya, 2004). Cuando se utilizan varios parámetros para evaluación de embriones no se registran diferencias significativas en tasas de embarazo al transferir en día 3 ó en día 5 (Blake, Proctor, Jonson, Olive, & Blake, 2005). La del día 5 representa mayores tasas de implantación por embrión cuando se encuentra en la etapa de blastocisto; en esta época el endometrio es más receptivo y la contractilidad uterina menor. Como se requiere cultivo prolongado, utilización de medios secuenciales o co-cultivos, existe la posibilidad de terminar sin embriones viables en el día 5, por lo que no se indica si no se

cuenta con al menos tres de ellos de ocho células (grado 1) en el día 3. Transferir dos embriones en etapa de blastocisto mejora las probabilidades de embarazo y disminuye la tasa de embarazos múltiples de alto orden fetal (Gardner, Surrey, Minjarez, Leite, Stevens, & Schoolcraft, 2004).

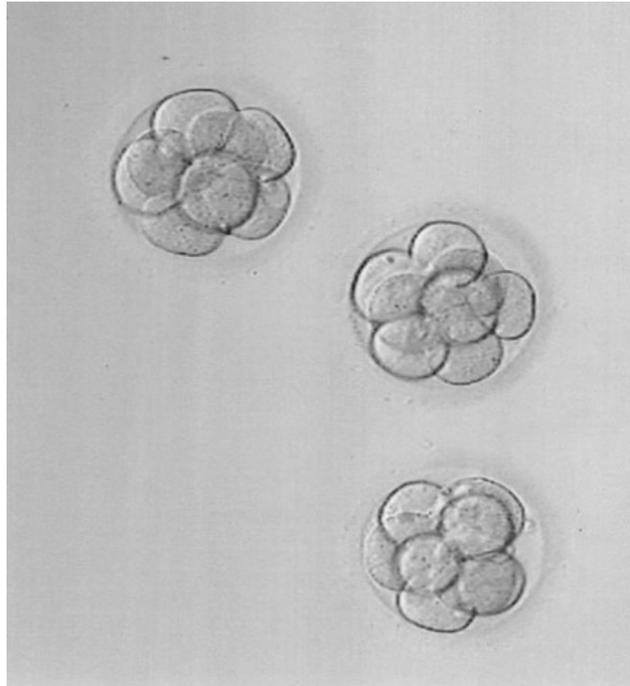


Figura 2. Embriones de 8 células grado 1 en día 3 para transferir.

FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL ÉXITO DE UNA TRANSFERENCIA

La técnica de transferencia es manual y, por lo tanto, resulta difícil definir y estudiar los factores subjetivos que intervienen en ella. A lo largo del tiempo se ha dado cada vez más importancia a la técnica utilizada, y para modificar actitudes frente a la transferencia se han estudiado multitud de factores. Los más importantes son los siguientes:

Médico “transferidor”

La mayoría de los autores constata las diferencias entre unos ginecólogos y otros (Heamns-Stokes, Miller, Scott, & al., 1988), (Karande, Morris, Chapman, & al., 1999). Karande (Karande, Morris, Chapman, & al., 1999), en un artículo muy interesante aunque con poca casuística, llega a la conclusión de que las diferencias entre unos médicos y otros son muy importantes, y que el adiestramiento no consigue disminuir la diferencia entre los más hábiles y los menos. Además, concluye, la destreza en la SE TE pierde si se deja de realizar un número elevado de transferencias, y consiguen mejores resultados los médicos que llevan a la paciente desde el principio hasta el final del tratamiento.

Algunos autores no han encontrado estas diferencias, ni siquiera las han encontrado realizando las enfermeras las transferencias fáciles (Sicclair, Morgan, Lashen, & al., 1998), pero en general, la bibliografía coincide en que los resultados dependen de la habilidad del médico que lleva a cabo la transferencia. En un análisis prospectivo randomizado de 485 transferencias embrionarias, con similar número y calidad de embriones en los dos grupos, se constató una diferencia significativa en la tasa de gestación clínica del 16% entre dos médicos que utilizaron la misma técnica (Angelini, Brusco, Barnocchi, & al., 2006).

Tipo de catéter

La opinión mayoritaria es que se obtiene mejores resultados con las cánulas blandas que con las rígidas, con mayor o menor significación estadística (Spandorfer, Goldstein, Navarro, & al., 2003).

En un metaanálisis reciente de estudios prospectivos randomizados que comparaba los diferentes tipos de catéteres utilizados, se encontraron siete estudios que analizaban los resultados obtenidos con cánulas blandas (Cook o Wallace) frente a cánulas rígidas. Como era de esperar, se demostró un aumento significativo en las tasas de gestación al utilizar cánulas blandas (Bucket, 2006),

(Abou-Setta, Al-Inany, Mansour, & al., 2005). Otros seis estudios compararon los dos catéteres blandos (Cook y Wallace) sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (Abou-Setta, Al-Inany, Mansour, & al., 2005).

Sangrado

No existe acuerdo en cuanto a las repercusiones de la observación de sangre en el catéter, ni en cuanto a si es peor el sangrado endometrial o el cervical.

Es muy difícil cuantificar de manera objetiva la cantidad de sangre que se produce en una TE. En lo que sí parece que hay acuerdo es en que una gran cantidad de sangre tiene un efecto absolutamente deletéreo (Kovacs, 1999). En un estudio retrospectivo se determinó una asociación significativa entre la presencia de sangre en el catéter y el descenso de las tasas de implantación y gestación clínica. El análisis multivariado de este estudio determinó que la presencia de sange es el factor predictivo más importante para las tasas de implantación y gestación (Alvero, Herranz-Stokes, Catherino, & al, 2003).

Retirada del moco cervical

Los primeros en defender la aspiración del moco cervical fueron Mansour y cols (Mansour R. , Aboulghar, Serour, & al, 1994), que al estudiar transferencias de prueba con azul de metileno observaron que, si no se retiraba el moco, en un 57% de los casos reflúa el azul a la vagina porque el moco actuaba como un tapón. Otros autores piensan que la retirada del moco puede ocasionar sangrado y disminui las tasas de éxito.

Ecografía

El uso de la ecografía para monitorizar la SE TE ha propugnado ampliamente desde hace muchos años. En teoría, la ecografía bdominal ayuda a definir el trayecto uterino y permite visualizar la zona endometrial a la que decidimos

realizar la transferencia. Ahora bien, con la ecografía trabajamos en un solo plano, y no es raro que en los trayectos curvos perdamos de vista el catéter y realicemos la TE más alta de lo que en principio deseábamos, aunque quizás con catéteres especiales para la visión ecográfica no nos encontremos con este problema. En general, casi todos los autores son partidarios de la ecografía, aunque en la mayoría de los estudios las diferencias no son significativas (Kan, Abdalla, Gafar, & al., 1999). Después de analizar dos grupos similares en cuanto a edad, día y dificultad de la transferencia, historia de ciclos de FIV previos y uso de tenáculos, se observó que en el grupo en que se usó ecografía abdominal para guiar la transferencia embrionaria ecoguiada es equivalente (respecto a las tasas de gestación e implantación) a una medición uterina ultrasonográfica previa (Lambers, Dogan, Kosteljik, & al., 2006). El uso de nuevos catéteres ecogénicos simplifica la técnica ecoguiada, pero no tiene beneficios en términos de tasas de gestación (Coroleu, Barri, Carreras, & al., 2006).

En una revisión de Cochrane, se estableció que la ecografía no parece mejorar las tasas de gestación clínica ni evolutiva (Brown, Buckingham, Abou-Setta, & al., 2007).

Repleción de la vejiga urinaria

Habitualmente el útero se encuentra en anteflexión. La repleción de la vejiga ayuda a que el trayecto de la TE sea rectilíneo y, por tanto, facilita su inserción. En los úteros en retroflexión, la vejiga debe estar menos llena, pero aún así nos ayuda a realizar la ecografía con mayor nitidez y a saber dónde se encuentra el catéter exactamente, ya que en la retroflexión se pierde “el tacto”.

Reposo post-transferencia

En los inicios de la FIV se recomendaba reposo absoluto, pero poco a poco se ha ido viendo el nulo impacto que sobre los resultados tiene la actividad física. Botta obtiene los mismos resultados cuando la paciente está 24 hrs en reposo absoluto que cuando lo está 20 minutos.

Transferencia difícil

Es complicado, por la subjetividad que implica, definir con claridad lo que es fácil o difícil. Habitualmente es el biólogo el que decide la complejidad de la TE. Por otro lado, existen publicaciones en los dos sentidos (Tomas, Tikkinen, Tuomivaara, & al.). La dilatación cervical se ha propuesto como método para superar la dificultad que entraña la transferencia embrionaria; sin embargo, no hay criterios consistentes para la selección de pacientes. En un estudio prospectivo randomizado de 283 pacientes con antecedente de dos transferencias embrionarias consideradas difíciles, el grupo sometido a dilatación cervical presentó una tasa de gestación significativamente mayor (40 frente a 24%; $p < 0.01$), con las relaciones similares en las tasas de implantación y de recién nacidos vivos (Prapas, Prapas, Panagiotidis, & al., 2004).

CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

En 1983 se informó del primer embarazo logrado después de la congelación y descongelación de un embrión de ocho células, lo que ha modificado las perspectivas de reproducción asistida. Por un lado se incrementa la probabilidad de lograr un embarazo por ciclo después de una transferencia en fresco, con una o dos transferencias de embriones criopreservados del mismo ciclo, sin necesidad de estimular ni de efectuar captura folicular de nuevo. Aun en el caso de que la paciente se embarace en la primera transferencia, tiene la posibilidad de un nuevo embarazo sin necesidad de iniciar un nuevo ciclo. Además, si el riesgo de hiperestimulación ovárica es muy grande con la transferencia en fresco, éste se evita criopreservando todos los embriones para transferencias en ciclos posteriores, en donde incluso el estado hormonal resulta más adecuado para la implantación. También con este avance se reduce la probabilidad de embarazos múltiples puesto que se puede congelar el exceso de embriones en lugar de efectuar una transferencia de alto riesgo. De la misma manera se evita el desperdicio de gametos, puesto que antes sólo se inseminaban unos pocos óvulos

por los inconvenientes de transferir numerosos embriones (Gangrade, 1998).

Los avances en criopreservación y descongelación han resultado de la aplicación de principios básicos de criobiología que se señalan en el capítulo de *Preservación de la fertilidad*, donde también se tratan otros aspectos relevantes de la congelación de embriones. Las tasas de embarazo después de congelación, en la mayoría de los programas de RA, están por debajo de las que se obtienen con transferencias en fresco, por lo que si con estricto control de calidad un programa mejora en forma importante sus resultados con congelación y descongelación de embriones, sus tasas de embarazo por ciclo estimulado o aspirado se incrementan mucho. La criopreservación no está exenta de peligros: uno de los principales es el abandono de embriones congelados a pesar de información extensa, consentimientos firmados, recordatorios frecuentes, etc., lo cual conlleva implicaciones éticas y legales.

ESQUEMAS DE PREPARACION ENDOMETRIAL

Los protocolos de preparación endometrial controlada involucra el uso de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH α) antes de la administración de esteroides con el fin de suprimir la función ovárica e inducir la sincronización del desarrollo embrionario y endometrial, el cual ha sido desarrollado basado en la experiencia obtenida por los programas de donación de óvulos (Chaudhuri & Chatterjee, 2013).

Por otra parte, los intentos de simplificar la programación del ciclo han sugerido que la omisión de la fase de baja regulación no afecta negativamente a los resultados del ciclo, siempre y cuando se lleva a cabo el monitoreo de ultrasonido y/o la monitorización endocrina de la actividad ovárica.

La TEC se realiza en las siguientes condiciones:

1. TE en fresco fallida cuando existen embriones congelados de ese ciclo de estimulación.

2. En un ciclo de estimulación cuando el desarrollo endometrial es subóptimo o pobre, la TE es pospuesta y la TEC se programa más adelante.
3. En casos de donación de ovocitos o subrogación de útero, si la receptora no se ha preparado para la TE en fresco en el ciclo correspondiente de la donadora.

El procedimiento más importante para la TEC es la preparación endometrial. Los embriones congelados pueden ser transferidos al útero ya sea en un ciclo natural o en uno controlado hormonalmente. Las oportunidades de alcanzar el embarazo se han reportado ser las mismas que las obtenidas en TE en fresco (Queenan, Veeck, Seltman, & Muasher, 1994).

Ciclo natural

Se recomienda en las mujeres jóvenes y que tienen ciclos menstruales regulares que los que previamente se ha confirmado su ovulación. A estas mujeres se les cita el día 2-3 de su ciclo para la realización de un ultrasonido en el que se corrobora la ausencia de quistes residuales y el endometrio esté acorde al día del ciclo. Se practica seguimiento del crecimiento folicular mediante ultrasonido, que también debe corroborar el crecimiento adecuado del endometrio; este ciclo deberá ser cancelado si el grosor endometrial es menor a 8 mm al momento de la elevación de la LH. Si por el contrario, se detecta un folículo dominante y un endometrio >8 mm se administra 5000 UI de hCG para programar 3 días después la transferencia de los embriones.

Ciclo natural modificado

Se recomienda en las mujeres jóvenes con ciclos menstruales irregulares, anovulatorias. Este grupo de pacientes se les cita en el día 2-3 de su ciclo para la realización de un ultrasonido transvaginal para detectar cualquier anomalía que pudiera interferir en el desarrollo de un folículo dominante o producir un endometrio deficiente. Se administran 50-100 mg de citrato de clomifeno por 5

días, posteriormente se mantienen seguimientos ultrasonográficos para la comprobación del crecimiento de un folículo así como el grosor endometrial. Al igual que en un ciclo natural, si la línea endometrial es <8 mm a pesar de un folículo dominante o bien, no hubo crecimiento folicular, se cancela el ciclo. Si se logran ambas partes, se administran 5000 UI de hCG para programar 3 días después la transferencia de los embriones.

Ciclo artificial preparado con valerato de estradiol y progesterona

Las mujeres mayores y aquellas con ciclos irregulares son candidatas para tratar sus ciclos de forma artificial mediante el control con GnRHa como busarelina, nafarelina o leuprolide. Las dosis diarias del agonista comienzan en el día 21 del ciclo anterior. La supresión hipofisarias se confirma en el segundo día de la menstruación siguiente. Si tras la realización del ultrasonido vaginal en el inicio de la menstruación se corroboran ovarios quiescentes, se reduce la dosis del agonista y se comienza el empleo de valerato de estradiol 2mg (Primogyn ®) por 7 días, seguida de 4 mg del día 8 al 10, continuando con 6 mg del 11-13 día, o bien en forma ascendente hasta alcanzar un endometrio >8 mm y un estradiol sérico >350 ng/mL. Una vez logrado esto, se inicia la suplementación de progesterone (crinone ® gel al 8%) y una vez completado 3 días con soporte lúteo se realiza la TEC.

En mujeres sin función ovárica no hay necesidad de administrar los GnRHa, solo se inicia con el valerato de estradiol en dosis ascendente y se continúa tal como se describió en el párrafo anterior.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infertilidad es reconocida como un problema de salud pública a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La infertilidad puede afectar a 1 de cada 6 a 10 parejas, por lo cual estas parejas necesitarán ayuda médica para resolver su paternidad la cual, no se logra en forma espontánea.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) en las últimas dos décadas han permitido a miles de parejas infértiles tener hijos, actualmente los reportes bibliográficos muestran que las TRA son responsables del 1% de todos los nacimientos y 18% de nacimientos múltiples en los Estados Unidos.

Las TRA incluyen todos los tratamientos de fertilidad en los que los ovocitos y el espermatozoides son manejados fuera del cuerpo humano, como Fertilización in vitro (FIV) con o sin inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), cultivo embrionario, diagnóstico genético preimplantatorio, transferencia de embriones en fresco o congelados, donación de ovocitos.

Las tasas de embarazo logradas por transferencia de embriones congelados (TEC) han sido más bajas que las de embriones en fresco. Ahora cada vez son mejores debido a los avances en laboratorio y condiciones endometriales más fisiológicas. Con mejores tasas acumulativas de embarazo, se reducen costos y el desgaste que implica nuevas estimulaciones al repetir ciclos. Nuestra impresión con TEC en ciclos naturales y ciclos naturales modificados es que las tasas de embarazo son similares a las obtenidas con preparación endometrial con estrógenos y progesterona. Además en condiciones más fisiológicas y con menor soporte lúteo.

Según la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Red LARA) en el 2009 se realizaron 4711 TEC en toda Latinoamérica. Como hemos mejorado nuestras

tasas de embarazo, nuestro interés es investigar en este estudio comparativo los factores que intervienen en el éxito de las TEC.

Se ha demostrado que las tasas de embarazo por transferencia de embriones congelados (TEC) han sido más bajas que la transferencia de embriones en fresco. Sin embargo, las TEC incrementan la tasa de embarazo acumulativa, reduce costos, es relativamente simple de llevar a cabo y puede significar un periodo de tiempo menor en comparación con los ciclos en fresco repetidos. Por lo tanto, los esfuerzos para estudiar los factores que afectan el éxito de las TEC se han intensificado.

Por ello, la pregunta de investigación fue:

¿Existe diferencia entre las tasas de embarazo de acuerdo al esquema de preparación endometrial utilizado?

JUSTIFICACIÓN

MAGNITUD:

En la literatura médica encontramos que, en países desarrollados la incidencia de infertilidad llega hasta un 15% de las parejas, esta infertilidad puede ser primaria o secundaria de acuerdo a la vida reproductiva. Por desgracia en nuestro medio existen limitantes que impiden conocer con precisión el número de parejas afectada por infertilidad. Las TRA surgen como la solución para estas parejas que buscan la paternidad.

TRASCENDENCIA

Actualmente el esfuerzo mundial está enfocándose en aumentar la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida. Existe un gran número de variables que interactúan en la FIV y que tienen que estar en equilibrio para lograr el éxito de estos procedimientos. La hiperestimulación ovárica controlada es, sin duda, de gran importancia para obtener varios óvulos, pero esto también afecta la fertilización, así como el ambiente del endometrio lo que podría afectar a la tasa de éxito. Los factores asociados a la infertilidad como la endometriosis o la infestación tuberculosa del endometrio o el hidrosálpinx pueden afectar a la receptividad del mismo junto con la calidad del embrión. Se ha demostrado por muchos investigadores que las tasas de éxito de las TRA aumentan con la medición del endometrio en condiciones endocrinológicas óptimas, lo cual puede verse afectado en ciclos estimulados. Esto requiere la TEC en un ciclo natural o mínimamente estimulado donde la preparación endometrial idealmente puede alcanzarse.

La trascendencia de este estudio estriba en que fue diseñado para determinar si la existen diferencias significativas en las tasas de embarazo en la preparación del endometrio de una forma más fisiológica (ciclo natural y ciclo natural modificado)

en comparación con el artificialmente preparado con valerato de estradiol y progesterone.

FACTIBILIDAD

Durante los últimos años el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida en el Hospital Puerta de Hierro ha realizado un registro hospitalario de logros de fertilización, por lo cual este estudio contó con la información requerida para la realización de los objetivos de la investigación.

VIABILIDAD

Para la realización de este protocolo de investigación se contó con el conocimiento científico del asesor así como la experiencia y cooperación del personal del Instituto que intervino en la FIV.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si existen diferencias en el resultado entre las TEC en ciclos naturales, en ciclos seminaturales y en ciclos preparados artificialmente con valerato de estradiol y progesterona.

Objetivos particulares

- Determinar la tasa de embarazo clínico en transferencia de embriones congelados por ciclo natural.
- Determinar la tasa de embarazo clínico en transferencia de embriones congelados por ciclo seminatural.
- Determinar la tasa de embarazo clínico en transferencia de embriones congelados por endometrio artificialmente preparado con valerato de estradiol y progesterona.

HIPÓTESIS

H1= Existe diferencia significativa de la tasa de embarazo clínico entre el régimen de preparación endometrial mediante ciclo natural, ciclo natural modificado y artificial con uso de valerato de estradiol y progesterona.

H0= No existe diferencia significativa de la tasa de embarazo clínico entre el régimen de preparación endometrial mediante ciclo natural, ciclo natural modificado y artificial con uso de valerato de estradiol y progesterona.

MATERIAL Y METODOS

TIPO DE ESTUDIO

Observacional, transversal

UNIVERSO DE ESTUDIO

Se revisaron los expedientes clínicos de todas las pacientes a quienes se les realizaron TEC durante el periodo 1º enero del 2011 al 31 de diciembre del 2012.

CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de Inclusión

- 1) Pacientes a quienes se les realice TEC durante el periodo descrito
- 2) Pacientes de 18-40 años de edad
- 3) Preparación de endometrio en ciclo natural, natural modificado o artificial con valerato de estradiol y progesterona
- 4) Pacientes con soporte lúteo a base de crinone®, gel al 8%
- 5) Embriones de día 3, grado 1 obtenidos de óvulos propios o donados.
- 6) Pacientes preparadas por los medicos del staff del Instituto Vida Guadalajara en el Centro Médico Puerta de Hierro durante el periodo 1º enero del 2011 al 31 de diciembre del 2012.

Criterios de no inclusión

- 1) Pacientes en otro protocolo de preparación endometrial al descrito previamente.
- 2) Expedientes de pacientes incompletos o que no muestren la continuidad del control de la TRA.

Criterios de Exclusión:

- 1) Expedientes de pacientes que reporten una suspensión de la terapia indicada o prescrita.

TAMAÑO DE MUESTRA

No probabilística, muestreo por conveniencia.

TÉCNICA DE RECOLECCION DE INFORMACIÓN

Se revisaron los expedientes clínicos de todas las pacientes a quienes se les realizaron TEC durante el periodo 1º enero del 2011 al 31 de diciembre del 2012. Se analizaron un total de 168 ciclos que reunieron requisitos para ser introducidas en este protocolo, de los cuales 123 fueron de óvulos propios y 45 de óvulos donados. En todos los casos se usó la técnica de desvitrificación por el método de Kuwayama(Cobo, Kuwayama, Pérez, Ruiz, Pellicer, & Remohí, 2008). Adicionalmente, los médicos que realizaron la transferencia de embriones usaron técnicas uniformes.

Las TEC fueron divididas en tres grupos : 1 ciclo natural (CN), 2 ciclo natural modificado con CC y HCG (CNM) y 3 endometrio artificialmente preparado con estrógenos y progesterona (VE-P4).

Las opciones 2 y 3 se utilizaron en pacientes con ciclos irregulares o ausentes. La 1 para aquellas que ovulaban regularmente. Se tomaron en cuenta otros factores para la elección del protocolo a emplear, ya que cada caso es único.

En el grupo 1 CN, al alcanzar un folículo 17 mm de diámetro y el endometrio 8 mm, se aplicó 5000 UI de hCG (Choragon ®) y 36 horas después se consideró día 0 a partir de ahí se agregó progesterona vaginal y se realizó la TEC una vez

cubiertos 3 días completos de exposición a progesterona. En el grupo 2 se administró citrato de clomifeno 50-100 mg por 5 días y con criterios similares se aplicó la HCG y la progesterona. En el grupo 3 se administró valerato de estradiol 2 mg (primogyn ®) en dosis ascendente a partir del segundo día de la menstruación, hasta alcanzar 8 mm de grosor endometrial para posteriormente agregar progesterona con los mismos criterios.

El embarazo clínico fue determinado con presencia de saco gestacional y embrión con latido cardiaco fetal.

OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	MEDICIÓN ESTADÍSTICA
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la realización de este estudio	Cuantitativa	Menor de 20 años 21 a 30 años 31 a 40 años	X, DE, IC Medidas de tendencia central y dispersión
Ciclo natural (CN)	Forma de preparación del endometrio producida de forma espontánea. Indicada en pacientes con ciclos ovulatorios	Interviniente Dicotónica	Desarrollo mínimo de 1 folículo de >18 mm con un endometrio > 8mm No desarrollo de ningún folículo >18 mm y/o endometrio >8 mm	Proporciones
Ciclo natural modificado (CNM)	Forma de preparación del endometrio inducida por fármacos inductores de la ovulación. En este caso citrate de clomifeno	Interviniente Dicotónica	Desarrollo mínimo de 1 folículo de >18 mm con un endometrio > 8mm No desarrollo de ningún folículo >18 mm y/o endometrio >8 mm	Proporciones
Ciclo artificial (VE-P4)	Forma de preparación del endometrio mediante valerato de estradiol y progesterone.	Interviniente Dicotónica	Desarrollo de endometrio >8 mm y niveles séricos Estradiol >250 pg/mL No desarrollo de endometrio >8 mm y/o niveles séricos estradiol <250 pg/mL	Proporciones
Embriones congelados transferidos	Número de embriones transferidos por procedimiento	Cuantitativa		X, DE, IC Medidas de tendencia central y dispersión
Hormona gonadotropina	hormona glicoproteica producida durante	Cualitativa	Positiva: >100 mU/ml Negativa <100 mU/ml	X, DE, IC Medidas de tendencia

coriónica humana (hCG-b)	el embarazo por el embrión en desarrollo después de la fecundación y posteriormente por el sincitiotrofoblasto			central y dispersión
Tasa de embarazo	Relación entre el total de transferencias realizadas y la cantidad de embarazos clínicos (saco gestacional y embrión con latido cardíaco fetal)	Cuantitativo		X, DE, IC Medidas de tendencia central y dispersión

ESTE ESTUDIO SE REALIZO

En el Instituto de Ciencias de la Reproducción Humana Vida Guadalajara, con sede en el Centro Médico Hospital Puerta de Hierro.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue hecho mediante el software SPSS v21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) para Macintosh. Las variables continuas fueron presentadas en relaciones porcentuales del total de las TEC, media y DE, la diferencia entre grupos con chi cuadrada según ameritaba el caso. Una $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. La tasa de embarazo clínico fue calculada dividiendo el número total de ciclos en los nacimientos, por el total de TEC realizadas del 1 de enero del 2011 al 31 de diciembre del 2012.

CONSIDERACIONES ETICAS

Este estudio de investigación se apegó a los principios emanados de la 18ª asamblea médica de Helsinki, Finlandia en 1964, de las modificaciones hechas por la propia asamblea en Tokio, Japón en 1975 y en el 2001 donde se contempló la investigación médica (Investigación Clínica). Acorde con la Ley General de Salud de México. Se manifestó el respeto a la persona, la vida y la seguridad así como a todos los derechos de confidencialidad de quienes

integraron la unidad de investigación. En ningún momento fueron revelados en el estudio tanto nombres u otras características que pudieran permitir la identificación del paciente en específico. Se cumplió con las consideraciones de la norma de instituciones en materia de investigación científica realizando la investigación personal calificado del Hospital Puerta de Hierro.

RECURSOS

Humanos: Investigador y asesores.

Materiales: Expedientes clínicos, computadora, impresora, calculadora, 200 hojas blancas, lápiz, y diverso material de oficina.

Financiamiento: El costo de este protocolo de investigación, fue cubierto por el investigador y los recursos propios del hospital.

RESULTADOS

Se realizaron 168 TEC, de las cuales 123 fueron de óvulos propios y 45 de ovodonación. Para su análisis los mismos grupos fueron subdivididos en pacientes que usaron sus propios óvulos y aquellas con óvulos donados. Las de óvulos propios fueron de edad similar, a diferencia de las de óvulos donados, como se muestra en la Tabla 1. En los 168 ciclos se transfirieron un total de 404 embriones, el promedio fue en ciclo natural de 2.3 ± 0.7 , en CNM 2.6 ± 0.5 y con VE-P4 2.5 ± 0.6 , la media de 2.6 ± 0.7 en ciclo natural con óvulos propios. Las pacientes de óvulos propios se dividieron en: 66, CN; 30, CNM y 27, VE-P4.

TABLA 1. CARACTERISTICAS GENERALES SEGÚN TIPO DE CICLO EN TEC							
	Óvulos propios			Óvulos donados			Total
	CN	CNM	VE-P4	CN	CNM	VE-P4	
Pacientes	66	30	27	6	0	39	168
Edad	32.4±4	32.8±3.24	33.6±4.2	35±6.9	-	40±3.8	-
Emb transferidos	151	77	67	16	-	93	404
Prom. Emb x TEC	2.3±0.7	2.6±0.5	2.5±0.6	2.6±0.5	-	2.4±0.7	-

En el caso de las mujeres con óvulos donados 6 pacientes fueron con CN y 39 con VE-P4 (tabla 2). Tanto la tasa de embarazo por TEC usando CN como por CNM en mujeres con sus propios óvulos tuvieron resultados similares (42.4 y 43% respectivamente) a diferencia de las obtenidas por VE-P4. En las TEC de las mujeres con óvulos donados sólo se utilizó el CN (tasa de embarazo/TEC 33.3%) y el VE-P4 siendo éste con la tasa de embarazo más alta (46.1%).

TABLA 2. RESULTADOS DE CICLOS PARA TEC						
	Óvulos propios			Óvulos donados		
	CN	CNM	VE-P4	CN	CNM	VE-P4
Total TEC	66	30	27	6	-	39
hCG-b (+)	28	13	5	2	-	18
Tasa emb/TEC (%)	42.4	43	18.5	33.3	-	46.1

La tabla 3 muestra hace una comparación entre las tasas de embarazos obtenidas mediante óvulos propios y óvulos donados, tal como se muestra no existen diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 3. COMPARACION DE HCG-B EN GRUPO OVODON Y OVULOS PROPIOS				
hCG-b	Óvulos donados	óvulos propios	Total	Valor p
Negativo	26 (57.8%)	76 (61.8%)	102 (60.7%)	0.72
Positivo	19 (42.2%)	47 (38.2%)	66 (39.3%)	
Total	45 (100%)	123 (100%)	168 (100%)	

Como se ejemplifica en la tabla 4 y 5, se muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa mediante el uso de CN y de VE-P4.

TABLA 4. TASA DE EMBARAZO CON CICLO NATURAL EN ÓVULOS DONADOS Y OVULOS PROPIOS				
hCG-b	Óvulos donados	Óvulos propios	Total	Valor p
Negativo	4 (66.7%)	38 (57.6%)	42 (58.3%)	1.00
Positivo	2 (33.3%)	28 (42.4%)	30 (41.7%)	
Total	6 (100%)	66 (100%)	72 (100%)	

TABLA 5. TASA DE EMBARAZO EN CICLO PROGRAMADO VE-P4 EN ÓVULOS DONADOS Y OVULOS PROPIOS				
hCG-b	Óvulos donados	Óvulos propios	Total	Valor p
Negativo	22 (56.4%)	21 (77.8%)	43 (65.2%)	0.11
Positivo	17 (43.6%)	6 (22.2%)	23 (34.8%)	
Total	39 (100%)	27 (100%)	66 (100%)	

DISCUSIÓN

Las parejas recurren a la fecundación in vitro (FIV) tras haber pasado un largo período de subfertilidad, debido a que las mujeres tienen alguna alteración en el factor tuboperitoneal, o endometriosis severa, o bien el hombre posee un bajo número de espermatozoides, o cuando el embarazo no se produjo luego de intentar con tratamientos de fertilización menos invasivos. Tras un ciclo infructuoso de FIV con embriones frescos, se puede realizar una transferencia de embriones descongelados si se dispone de los mismos. La donación de ovocitos suele ser una alternativa para las pacientes que poseen baja reserva ovárica o falla ovárica prematura, o que pasaron por varios ciclos infructuosos de FIV, sobre todo en pacientes de mayor edad. Una adecuada preparación hormonal del endometrio es fundamental, tanto para la receptora de óvulos como para los ciclos de reemplazo de embriones congelados, para optimizar las posibilidades de embarazo. Muchos investigadores utilizaron numerosos fármacos y diversas modalidades de administración para optimizar las tasas de implantación y así mejorar las tasas de éxito de los procedimientos de transferencia de embriones.

La singularidad de la criopreservación de embriones ya sea en pronúcleos, clivage o blastocisto puede permitir múltiples ciclos de transferencia desde una captura ovular y de esta manera reducir los costos de los tratamientos de fertilidad (El-Toukhy, et al., 2008).

Las tasas de embarazo de TEC comparadas con las transferencias de embriones en fresco son discretamente más bajas, esto puede ser debido a que los mejores embriones son utilizados para las transferencias en fresco.

Existen estudios que demuestran que en ciclos regulares la suplementación de estrógenos exógenos es continuada para la preparación endometrial durante la TEC. La tasa de embarazos es parecida en nuestro estudio observacional, el cual

corresponde con otras investigaciones similares (Wright, Guibert, Weitzen, Davy, Fauque, & Olivennes, 2006).

La ovulación espontánea en ciclos no controlados parece ser la principal causa de menor tasas de embarazo después de la TEC, en comparación con la ovulación provocada (El-Toukhy, et al., 2004). Otra razón es por el uso de la hCG en quienes se provoca la ovulación, los receptores de LH están localizados en el endometrio (El-Toukhy, et al., 2004), (Fields & Shemesh, 2004) lo que indica que el endometrio es el órgano blanco para la LH. A diferencia de la información previa de que la LH sólo puede afectar indirectamente el endometrio a través de la producción ovárica de hormonas esteroides (de Ziegler, Cornel, Bergeron, Hazout, Bouchard, & Frydman, Controlled preparation of the endometrium with exogenous estradiol and progesterone in women having functioning ovaries. , 1991), estudios recientes han relacionado la exposición a la LH con varios cambios regulatorios pertinentes a la proliferación y la diferenciación de las glándulas endometriales y el estroma morfológico y funcional, principalmente a través de la activación de las vías de la guanilato ciclasa y la fosfolipasa C así como el aumento de la síntesis local de las hormonas esteroides (Ku, et al., 2002). Debido a que esos cambios son sincronizados normalmente al desarrollo folicular en el ciclo natural (Buffet & Bouchard, 2001), es posible que la administración de la hCG, como actúa como LH, puede inducir cambios favorables en el endometrio por deciduización propia haciéndolo más receptivo para la implantación de los embriones (Chaudhuri & Chatterjee, 2013).

Hay un gran número de consideraciones para determinar cuál protocolo de preparación endometrial es el mejor para la paciente. Las mujeres en las que se les prepara el endometrio de forma artificial fue en base a si sus ciclos menstruales son irregulares o ausentes, o bien, mujeres ovulatorias que por situaciones de agenda rígida (por viaje, por ejemplo) requerían la realización de la transferencia en un determinado día. Otras candidatas óptimas para este tipo de preparación endometrial es para las receptoras de óvulos donados en fresco, debido a la dificultad para sincronizar a la donadora y a la receptora.

Las mujeres con ciclos ovulatorios pueden ser consideradas para el ciclo natural, los cuales son menos caros y son considerados amigables porque no requieren la autoadministración de medicamentos de depósito (GnRHa) y vía oral (valerato de estradiol). Sin embargo, la programación de la transferencia depende totalmente del día en que la ovulación sucede de acuerdo al crecimiento folicular. Otra razón por la cual la transferencia no puede ser programada es la falla en la detección del pico de LH, lo que resulta en una ovulación “perdida”. Por esta razón nosotros ante la evidencia de un folículo de >18 mm con un endometrio >8 mm programamos la administración de la hCG para imitar el pico de la LH y de esta manera reducir esas “ovulaciones perdidas” que pudieran presentarse de forma espontánea.

En cambio, las mujeres con oligoanovulación, como por ejemplo quienes padecen de ovario poliquístico, son las candidatas perfectas para el ciclo natural modificado con el empleo de inductores de la ovulación, ya sea el citrato de clomifeno, letrozol o gonadotropinas.

En nuestro estudio no encontramos diferencia estadísticamente significativa en la edad de las pacientes de acuerdo a embriones obtenidos por óvulos propios y donados así como el tipo de preparación endometrial. El promedio de embriones transferidos por TEC fue homogénea entre los tres esquemas de preparación endometrial ya sea con óvulos propios o donados. La tasa de embarazo mediante CN fue de 41.7%. Se realizaron más transferencias de embriones por óvulos propios en este grupo de pacientes que obtenidos por ovodonación (66 vs 6, $p < 1.00$), lo que se atribuye a que la elección de este esquema de preparación endometrial se basa en la integridad de la función ovulatoria, lo que a su vez se correlaciona en la edad de mujeres jóvenes. En el ciclo natural la tasa de embarazo fue discretamente mayor con el uso de óvulos propios en comparación con el de óvulos donados (42.4 vs 33.3%), sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p < 1.00$), esto habla de interacciones intrínsecas entre los embriones

de óvulos propios y donados con el endometrio, a pesar de que la evaluación morfológica de los embriones fue óptima por criterio de inclusión de este protocolo. No encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre las tasas de embarazo logradas por el CN y las del CNM (42.4% vs 43%). No tuvimos pacientes con óvulos donados y preparación endometrial con CNM.

En la preparación artificial VE-P4 la tasa de embarazo fue del 34.8%, y como era de esperarse, en este grupo de pacientes se obtuvieron más embriones de óvulos donados que de óvulos propios, aunque no hay diferencia significativa entre ambos (43.6% vs 22.2%, $p < 0.11$).

Nos llama la atención que mediante la preparación del endometrio artificial VE-P4 la tasa de embarazo con embriones de óvulos propios es radicalmente menor (18.5%) en comparación con la obtenida mediante los óvulos donados (46.1%). Consideramos este resultado a que independientemente de la evaluación morfológica de los embriones existen implicaciones genéticas que denotan mejor calidad embrionaria y que la valoración morfológica es insuficiente.

CONCLUSIONES

Las tasas de embarazo logradas por transferencia de embriones congelados (TEC) han sido más bajas que las de embriones en fresco. Ahora cada vez son mejores debido a los avances en laboratorio y condiciones endometriales más fisiológicas. Con mejores tasas acumulativas de embarazo, se reducen costos y el desgaste que implica nuevas estimulaciones al repetir ciclos. Nuestra impresión con TEC en ciclos naturales y ciclos naturales modificados es que las tasas de embarazo son similares a las obtenidas con preparación endometrial con estrógenos y progesterone, además en condiciones más fisiológicas y con menor soporte lúteo. El propósito de este estudio fue evaluar si con distintos esquemas producen las mismas tasas de embarazo con TEC.

Se trató de determinar cuál protocolo es el mejor para la receptividad endometrial. Las pacientes que tienen ciclos regulares fueron candidatas a CN, en cambio, aquellas con ciclos irregulares pero con función ovárica respetada fueron candidatas a CNM; aquellas que no tuvieron función ovárica fueron candidatas a VE-P4 y también para quienes contaron con una agenda personal muy restringida. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en las tasas de embarazo para TEC en CN, CNM y VE-P4, ya sea con óvulos propios o por ovodonación. Por lo cual concluimos que el CN es una excelente opción y puede utilizarse con su variante, el CNM, en mujeres con ciclos irregulares sin los inconvenientes de la preparación tradicional endometrial.

Las modalidades más comunes para TEC es el ciclo natural, ciclo natural modificado o la preparación endometrial con estrógenos exógenos y progesterona, con o sin la adición de un GNRHa. No se identificó una comparación directa de estas modalidades. Por lo tanto, en la actualidad no hay pruebas suficientes para apoyar el uso de una intervención con preferencia a la otra y en las mujeres con ciclos ovulatorios espontáneos regulares se puede ofrecer cualquier método.

BIBLIOGRAFÍA

- Aanesen, A., Nygren, K., & Nylund, L. (2010). Modified natural cycle and mild IVF: a 10 year Swedish experience. . *RBM Online* , 20, 156-162.
- Abou-Setta, A., Al-Inany, H., Mansour, R., & al., e. (2005). Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Human Reprod* , 20 (11), 3114-21.
- Alvero, R., Herranz-Stokes, R., Catherino, W., & al, e. (2003). The presence of blood in the transfer catheter negatively influences outcome at embryo transfer. *Human Reprod* , 18 (9), 1848-52.
- American Society of Reproductive Medicine. . (2004). Practice Committee. Guidelines on number of embryos transferred. . *Fertil Steril* , 82, S1-S2.
- Angelini, A., Brusco, G., Barnocchi, N., & al., e. (2006). Impact of physician performing embryo transfer on pregnancy rates in an assisted reproductive program. *J Assist Reprod Genet* , 23, 329-332.
- Asch, R., Balmaceda, J., Ellsworth, L., & al., e. (1986). Preliminary experiences with gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* , 45, 366-371.
- Balmaceda, J., Gestaldi, C., Remohí, J., & al., e. (1988). Tubal embryo transfer as a treatment of infertility ue to male factor. *Fertil Steril* , 50, 476-79.
- Barlow, D. (2005). The debate on single embryo transfer in IVF. How will today's arguments be viewed from the perspective of 2020? . *Hum Reprod* , 20, 1-3.
- Bayer, S., Alper, M., & Penzias, A. (2010). *The Boston IVF Handbook of Infertility* . . New York: Informa Healthcare.
- Ben-Nun, I., & Shulman, A. (1997). Induction of artificial endometrial cycles with s.c. oestrogen implants and injectable progesterone in in-vitro fertilization treatment with donated oocytes: a preliminary report. . *Human Reproduction* , 12 (10), 2267-70.
- Bergh, C. (2005). Single embryo transfer: a mini-review. . *Hum Reprod* , 20 (2), 323-327.

- Blake, D., Proctor, M., Jonson, N., Olive, D., & Blake, D. (2005). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. . *Cochrane Database Syst Rev* , 4, CD 002118.
- Borini, A., Violini, F., Bianchi, L., Bafaro, M., Trevisi, M., & Flamigni, C. (1995). Improvement of pregnancy and implantation rates in cyclic women undergoing oocyte donation after long-term down-regulation. . *Human Reproduction* , 10 (11), 3018-21.
- Brauenstein, G. (2008). Endocrine changes in pregnancy. . En M. S. In: Kronenberg HM, *Williams' Textbook of endocrinology*. (11th Ed ed., págs. 741-54). Philadelphia, USA: Saunders Elsevier.
- Brinsden, P. (2005). *Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. The Bourn Hall Guide to clinical and laboratory practice*. (3rd Ed ed.). London, UK: Taylor & Francis Group;.
- Brinsden, P. (2005). *Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. The Bourn Hall Guide to clinical and laboratory practice*. (3rd Ed ed.). London: Taylor & Francis Group.
- Brown, J., Buckingham, K., Abou-Setta, A., & al, e. (2007). Ultrasound versus clinical touch for catheter guidance during embryo transfer in woman. *Cochrane Database Syst Rev* , 1, CD00607.
- Bucket, W. (2006). A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertil Steril* , 85, 728-34.
- Buffet, N., & Bouchard, P. (2001). The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. . *Chronobiol Int* , 18, 893-919.
- Chaudhuri, A., & Chatterjee, S. (2013). Frozen embryo transfer: the present practice and beyond. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* , 1-6.
- Cobo, A., Kuwayama, M., Pérez, S., Ruiz, A., Pellicer, A., & Remohí, J. (2008). Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. . *Fertil Steril* , 89, 1657-64.
- Coroleu, B., Barri, P., Carreras, O., & al., e. (2006). Effect of using and echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme. *Hum Reprod* , 21 (7), 1809-15.

- Coroleu, B., Carreras, O., Veiga, A., Martell, A., Martínez, F., Belil, I., y otros. (2000). Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod* , 15 (3), 616-620.
- Coutifaris, C., & Coukos, G. (1994). Fertilization and implantation. . *Infert Reprod Med Clin* , 5, 571-90.
- Davies, D., Jenkins, J., Anthony, F., Gadd, S., Watson, R., Sakhrani, L., y otros. (1991). Biochemical monitoring during hormonal replacement therapy cycles for transfer of cryopreserved embryos in patients with functional ovaries. . *Human Reproduction* , 6 (7), 934-8.
- de Ziegler, D., Cornel, C., Bergeron, C., Hazout, A., Bouchard, P., & Frydman, R. (1991). Controlled preparation of the endometrium with exogenous estradiol and progesterone in women having functioning ovaries. . *Fertility and Sterility* , 56, 851-5.
- Devroey, P., & Pados, G. (1998). Preparation of endometrium for egg donation. *Human Reproduction Update* , 4 (6), 856-61.
- Devroey, P., Braekmans, P., Smith, J., & al., e. (1986). Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* , 1, 329.
- Dickey, R., Sartor, B., & Pyrzak, R. (2004). What is the most relevant standard of success in as- sisted reproduction? No single outcome measure is satisfactory when evaluating suc- cess in assisted reproduction; both twin births and singleton births should be counted as successes. . *Hum Reprod* , 19, 783-787.
- Egbase, P., Al-Sharhan, M., Al-Othman, S., Al-Mutawa, M., Udo, E., & Grudzinkas, J. (1996). Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in-vitro fertilization and embryo transfer. . *Hum Reprod* , 11, 1687.
- El-Toukhy, T., Coomarasamy, A., Khairy, M., Sunkara, K., Seed, P., Khalaf, Y., y otros. (2008). The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. . *Fertil Steril* , 89, 832-9.

- El-Toukhy, T., Taylor, A., Khalaf, Y., Al-Darazi, K., Rowell, P., Seed, P., y otros. (2004). Pituitary suppression in ultrasound-monitored frozen embryo replacement cycles. A randomised study. . *Hum Reprod* , 19, 874-9.
- ESHRE, p. r. (2006). *World Report on Assisted Reproductive Technology (ART) fact sheet*. Obtenido de www.eshre.com.
- Fields, M., & Shemesh, M. (2004). Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals. . *Biol Reprod* , 71, 1412-8.
- Flamigni, C., Borini, A., Violini, F., Bianchi, L., & Serrao, L. (1993). Oocyte donation: comparison between recipients from different age groups. . *Human Reproduction* , 12, 2088-92.
- Frydman, R., Bouchard, P., & Parneix, I. (1988). LHRH agonists do they have a role in frozen embryo transfer cycle. *Contraception Fertilite Sexuality* , 16-29.
- Gangrade, B. (1998). Oocyte and embryo cryopreservation: current applications and future outlook. *Infert Reprod Med* , 9, 259-73.
- Gardner, D., Surrey, E., Minjarez, D., Leite, A., Stevens, J., & Schoolcraft, W. (2004). Single blastocyst transfer. . *Fert il Steril* , 81, 551-55.
- Gardner, D., Weissman, A., Howles, C., & Shoham, Z. (2009). *Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives*. (3rd ed ed.). London: Informa Healthcare.
- Gerris, J., De Neuborg, D., Mangelschots, K., van Royen, E., Van de Meersschle, M., & Valken-burg, M. (1999). Prevention of twin pregnancy after in vitro fertilization or intracytoplasmatic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized trial. . *Hum Reprod* , 14, 2581-87.
- Glass, K., Green, C., Fluker, M., Schoolcraft, W., McNamee, P., & Meldrum, D. (2000). Multi-center randomized trial of cervical irrigation at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* , 74 (S), 31.
- Heamns-Stokes, R., Miller, B., Scott, L., & al., e. (1988). Pregnancy rates after embryo transfer as a treatment of infertility due to male factor. *Fertil Steril* , 50, 476-79.

- Imbar, T., & Hunwitz, A. (2004). Synchronization between endometrial and embryonic age is not absolutely crucial for implantation. . *Fertil Steril* , 82, 472-4.
- Irianni, F., Veeck, L., Toner, J., & Muasher, S. (1992). Influence of number of pre-embryos transferred, progesterone level and oestradiol/progesterone ratio at the thaw on pregnancy results during replacement of cryo-preserved pre-embryos in natural cycles. . *Human Reproduction* , 7, 797-800.
- Jaroudi, K., Hamilton, C., Willemsen, W., Siek, U., & Roca, G. (1991). Artificial endometrial stimulation for frozen embryo replacement. *Fertility and Sterility* , 56, 835-7.
- Kan, A., Abdalla, H., Gafar, A., & al., e. (1999). Embryo transfer: ultrasound-guided versus clinical touch. *Human reprod* , 14, 1259-61.
- Kao, L., TulaC, S., Lobo, S., & al., e. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. . *Endocrinology* , 143, 2119.
- Karande, V., Morris, R., Chapman, C., & al., e. (1999). Impact of the "physian factor" on pregnancy rates in a large assisted reproductive technology program: do too many cooks spoil the broth? *Fertil Steril* , 71, 1001-10.
- Kolibiankis, E., Zikopoulos, K., Camus, M., & Tournaye, e. a. (2004). Modified natural cycle for IVF responders does not offer a realistic chance of parenthood in poor responders with high day 3 FSH levels, as a last resort prior to oocyte donation. . *Hum Reprod* , 19, 2545-49.
- Kovacs, G. (1999). What factors are important for succesful embryo transfer in vitro fertilization? *Human Reprod* , 14, 590-91.
- Ku, S., Choi, Y., Suh, C., Kim, S., Kim, J., Moon, S., y otros. (2002). Effect of gonadotropins on human endometrial stromal cell proliferation in vitro. . *Arch Gynecol Obstet* , 266, 223-8.
- Lambers, M., Dogan, E., Kosteljik, H., & al., e. (2006). Ultrasonographic-guided embryo transfer does not enhance pregnancy rates compared with embryo transfer based on previous uterine length measurement. *Fertil Steril* , 86 (4), 867-72.

- Leeton, J., Rogers, P., & Healy, D. (1991). A comparison of pregnancy rates for 131 donor oocyte transfers using either a sequential or fixed regime of steroid replacement therapy. . *Human Reproduction* , 6, 299-301.
- Lelaidier, C., de Ziegler, D., Gaetano, J., Hazout, A., Fernandez, H., & Frydman, R. (1992). Controlled preparation of the endometrium with exogenous oestradiol and progesterone: a novel regimen not using a gonadotrophin-releasing hormone agonist. . *Human Reproduction* , 7, 1353-6.
- Lelaidier, C., Olivennes, F., de Ziegler, D., Hazout, A., Freitas, S., & Frydman, R. (1995). Endometrium preparation with exogenous estradiol and progesterone for the transfer of cryopreserved blastocysts. . *Fertility and Sterility* , 63 (4), 919-21.
- Levitas, E., Parment, A., Lunenfeld, E., Bentov, Y., Burtstein, E., Friger, M., y otros. (2006). Impact of hypnosis during embryo transfer on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer: a case control study. . *Fertil Steril* , 85, 1404-08.
- Lutjen, P., Trounson, A., Leeton, J., Findlay, J., Wood, C., & Renou, P. (1984). The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. . *Nature* , 307 (5947), 174-5.
- Mandelbaum, J., Junca, A., Placchot, M., Alvarez, S., Debache, C., Salat-Baroux, J., y otros. (1987). Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Human Reproduction* , 2, 709-14.
- Mansour, R., Aboulghar, M., & Serour, G. (1990). Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* , 54, 678.
- Mansour, R., Aboulghar, M., Serour, G., & al, e. (1994). Dummy embryo transfer using methylene blue. *Human Reprod* , 9, 1257-1259.
- Mausher, S., Kruthoff, C., Simonetti, S., Oehninger, S., Acosta, A., & Jones, G. (1991). Controlled preparation of the endometrium with exogenous steroids for the transfer of frozen-thawed pre-embryos in patients with anovulatory or irregular cycles. . *Human Reproduction* , 6, 443-5.

- McNamee, P., Huang, T., & Carwile, A. (1998). Significant increase in pregnancy rates achieved by vigorous irrigation of endocervical mucus prior to embryo transfer with a Wallace catheter in an IVF-ET program. . *Fertil Steril* , 70 (S), 228.
- Meldrum, D., Wisot, A., Hamilton, F., Gutlay-Yeo, A., Marr, B., & Huynh, D. (1989). Artificial agonadism and hormone replacement for oocyte donation. . *Fertility and Sterility* , 52, 509.
- Mesiano, S. (2009). The endocrinology of human pregnancy and feto-placental neuroendocrine development. . En J. Strauss, & R. Barbieri, *Reproductive endocrinology* (6th ed., págs. 249-81). Philadelphia, USA: Saunders Elsevier.
- Nasseri, A., Copperman, A., & Corfman, R. (1998). Embryo transfer. What and how many to transfer. Is this step underappreciated as affecting pregnancy outcome? . *Infertil Reprod Med* , 9, 243-258.
- Navot, D., Anderson, T., Droesch, K., Scott, R., Kreiner, D., & Rosenwaks, Z. (1989). Hormonal manipulation of endometrial maturation. . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 68 (4), 801-7.
- Noyes, N. (1999). Hysteroscopic cervical canal shaving: a new therapy for cervical stenosis before embryo transfer in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* , 71 (5), 965-67.
- Oatway, C., Gunby, J., & Daya, S. (2004). Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. . *Cochrane Database Syst Rev* 2004 , 2, CD004378.
- Pados, G., Camus, M., Van Waesberghe, L., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., & Devroey. (1992). Oocyte and embryo donation: evaluation of 412 consecutive trials. *Human Reproduction* , 7 (8), 1111-7.
- Pandian, Z., Bhattacharva, S., Ozturk, O., Serour, G., & Templeton, A. (2004). Number of embryos for transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. . *Cochrane Database Syst Rev* , CD003416.
- Paria, B., Reese, J., Das, S., & Day, S. (2002). Deciphering the cross-talk of implantation: Advances and challenges. . *Science* , 296, 2185-88.

- Pérez Peña, E. (2011). Estimulación ovárica controlada. . En E. Pérez Peña, *Atención integral de la infertilidad. Endocrinología, cirugía y reproducción asistida*. (3a ed ed.). México: McGraw-Hill.
- Pérez-Peña, E., Gutiérrez-Gutiérrez, A., Pascual-Rodríguez, A., & González-Ortega, C. (2009). Preservación de la fertilidad. . En J. Barroso Villa, *Biología de la reproducción en el siglo XXI*. (págs. 121-42). Clin Perinat Reprod Hum .
- Prapas, N., Prapas, Y., Panagiotidis, Y., & al., e. (2004). Cervical dilatation as a positive impact on the outcome of IVF in randomly assigned cases having two previous difficultt embryo transfers. *Hum Reprod* , 19 (8), 1791-95.
- Queenan, J. J., Veeck, L., Seltman, H., & Muasher, S. (1994). Transfer of cryopreserved-thawed pre-embryos in a natural cycle or a programmed cycle with exogenous hormonal replacement yields similar pregnancy results. . *Fertil Steril* , 62, 545-50.
- Registro latinoamericano de reproducción asistida 2008-2009. . (2010). www.redlara.com.
- Rijnders, P. (1996). The spermatozoon. . En M. Bras, J. Lens, & P. Piederiet, *IVF LAB. Laboratory aspects of in vitro fertilization*. (págs. 21-40). Netherlands: Organon.
- Rizk, B., García-Velasco, J., Sallam, H., & Makrigiannakis, A. (2008). *Infertility and assisted reproduction*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sathanandan, M., Macnamee, M., Rainsbury, P., Wick, K., Brinsden, P., & Edwards, R. (1991). Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: A prospective semi-randomised study. . *Human Reproduction* , 6 (5), 685-7.
- Schmidt, C., de Ziegler, D., Gagliardi, C., Mellon, R., Taney, F., Kuhar, M., y otros. (1989). Transfer of cryo-preserved-thawed embryos: the natural cycle versus controlled preparation of the endometrium with gonadotrophin-releasing hormone agonist and exogenous estradiol and progesterone (GEEP). *Fertility and Sterility* , 52, 609-16.
- Sharif, K., Afnan, M., Lenton, W., Khalaf, Y., Ebbiary, N., Bilalis, D., y otros. (1995). Do patients need to remain in bed following embryo transfer? The

- Birmingham experience of 103 in-vitro fertilization cycles with no bed rest following embryo transfer. *Hum Reprod* , 10, 1427-29.
- Sher, G., Herbert, C., Maassarani, G., & Jacobs, M. (1991). Assessment of the late proliferative phase endometrium by ultrasonography in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Human Reproduction* , 6 (232), 7.
- Sicclair, L., Morgan, C., Lashen, H., & al., e. (1998). Nurse performing embryo transfer: the development and results of the Birmingham experience. *Human Reprod* , 13, 699-702.
- Spandorfer, S., Goldstein, B., Navarro, J., & al., e. (2003). Difficult embryo transfer as a negative impact in the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* , 79, 654-55.
- Speroff, L., & Fritz, M. (2005). The endocrinology of pregnancy. . En L. Speroff, & M. Fritz, *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. (7th Ed. ed., págs. 259-318). Philadelphia, USA: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Tomas, C., Tikkinen, K., Tuomivaara, L., & al., e. Te degree of difficulty of embryo transfer is an independet factor for predicting pregnancy. *Hum Reprod* , 17, 2632-35.
- Trounson, A., & Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. . *Nature* 1983 , 305, 707-9.
- Troup, S., Matson, P., Critchlow, J., Morroll, D., Lieberman, B., & Burslem, R. (1991). Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage or expanded blastocyst stages. . *European Journal of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Biology* , 38 (2), 133-9.
- Westergaard, L., Bossuyt, P., van der Veen, F., & van Wely, M. (2009). Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles. . *Cochrane Database of Systematic Reviews*. , CD003973. .
- Westergaard, L., Mao, Q., Kroglund, M., Sandrini, S., Lenz, S., & Grinsted, J. (2006). Acupuncture on the day of embryo transfer significantly improves the

- reproductive outcome in infertile women: a prospective randomized trial. . *Fertil Steril* , 85, 1341-46.
- Wood, E., Batzer, F., Go, K., Gutman, J., & Corson, S. (2000). Ultrasound-guided soft catheter embryo transfer will improve pregnancy rates in in vitro fertilization. . *Hum Reprod* , 15 (1), 107-112.
- Wright, K., Guibert, J., Weitzen, S., Davy, C., Fauque, P., & Olivennes, F. (2006). Artificial versus stimulated cycles for endometrial preparation prior to frozen-thawed embryo transfer. . *Reprod BioMed Online* , 13, 321-5.
- Yovich, J., Turner, S., & Murphy, A. (1985). Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancies in in vitro fertilization. . *Fertil Steril* , 44, 318-321.