

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

***“Influencia de la duración de la
Transferencia Embrionaria en el
éxito de los ciclos de FIV/ICSI”***

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autora: Paula Vergaro Varela

Tutor: Ángel Plácido Llana Coto

Junio 2014

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y colaboración de varias personas. Por ello, quiero manifestar mis más sinceros agradecimientos:

Al personal de la Unidad de Reproducción del HUCA, por hacerme sentir como una más del equipo durante la recogida de los datos. Especialmente, a la Dra. Lourdes Sánchez, por su interés y disposición para enseñarme en todo momento.

Al director de este trabajo, el Dr. Plácido Llana, por creer en mis ideas más que yo misma, y sobre todo, por su paciencia y dedicación.

A mis compañeras de piso Nathaly y Andrea, y a mis compañeros del Máster, en especial a Marta, a María, a Natalia, a Bea y a Juan, por compartir conmigo lágrimas y alegrías y por hacer que este año haya sido muy especial.

Y por último y muy importante, a mis padres y a mi hermana, por demostrarme una vez más su apoyo incondicional y su confianza en mí.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

- **DGP:** Diagnóstico Genético Preimplantacional
- **EOD:** Esterilidad de Origen Desconocido
- **ESHRE** (por sus siglas en inglés): Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
- **ESM:** Error Estándar de la Media
- **FIV:** Fecundación *in vitro*
- **FSH** (por sus siglas en inglés): Hormona foliculoestimulante
- **ICDE:** Intervalo de tiempo entre la carga y descarga de los embriones en el catéter
- **ICSI** (por sus siglas en inglés): Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoide
- **LH** (por sus siglas en inglés): Hormona Luteinizante
- **NK:** *Natural Killer*
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **Pre-ICDE:** Intervalo de tiempo desde la colocación del catéter en la cavidad uterina hasta el inicio del ICDE
- **RFA:** Recuento de Folículos Antrales
- **RO:** Reserva Ovárica
- **SEF:** Sociedad Española de Fertilidad
- **SHEO:** Síndrome de Hiperestimulación Ovárica
- **TE:** Transferencia Embrionaria
- **TEB:** Tasa de Embarazo Bioquímico
- **TEC:** Tasa de Embarazo Clínico
- **TI:** Tasa de Implantación
- **TME:** Tiempo de manipulación endometrial
- **TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	7
1.1. La Fecundación <i>in vitro</i>	7
1.2. Factores que influyen en el éxito de los ciclos FIV/ICSI	8
1.3. La implantación embrionaria	11
1.4. La Transferencia Embrionaria	15
1.4.1. Factores que influyen en el resultado de la TE.....	16
1) Técnicas de cargado del catéter.....	16
2) Deposición de los embriones	16
3) Retirada del catéter.....	17
4) El grosor endometrial.....	17
5) La dificultad de la transferencia.....	18
6) Test de transferencia previo.....	19
7) Transferencia eco-guiada frente a palpación ginecológica.....	20
8) Tipo de catéter	22
a. Firmeza del catéter	22
b. Ecogenicidad del catéter	23
9) Sangre en el catéter.....	24
10) Retirada del moco cervical	25
11) Tiempo entre la carga y descarga del catéter	25
12) Otros factores.....	26
a. Uso de fármacos	26
b. Reposo tras la TE	26
2. Hipótesis y Objetivos	27
3. Material y Metodologías	28
3.1. Población de estudio.....	28
3.2. Estimulación ovárica	29
3.3. Punción folicular	31
3.4. Cultivo embrionario	31
3.5. Transferencia embrionaria	32

3.1. Análisis estadístico.....	35
4. Resultados.....	36
5. Discusión.....	46
6. Conclusiones	55
7. Referencias Bibliográficas	56

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

<i>Tabla I.</i> Clasificación ASEBIR de la calidad embrionaria para los días +2 y +3 de desarrollo	10
<i>Tabla II.</i> Principales tipos de catéteres disponibles comercialmente	23
<i>Tabla III.</i> Número y proporción de casos de embarazo, no embarazo y total en los grupos de Pre-ICDE, ICDE y TME según su duración media.	38
<i>Tabla IV.</i> Número y proporción de casos de embarazo, no embarazo y total en los grupos de Pre-ICDE, ICDE y TME según su duración en percentiles.....	40
<i>Tabla V.</i> Relación entre la edad de la paciente, los niveles de Progesterona y Estradiol, y el grosor endometrial con el embarazo.....	42
<i>Tabla VI.</i> Relación entre el tipo de ciclo, calidad embrionaria, número de embriones transferidos, y día de la TE en fresco y criopreservados con el embarazo	43
<i>Tabla VII.</i> Relación entre el uso/no uso del fiador, ginecólogo/a y embriólogo/a que participaron en la TE, y tratamiento hormonal con el embarazo.	45

FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Dinámica del endometrio durante el ciclo menstrual y la concepción y relación con el ciclo ovárico y las hormonas reguladoras	11
<i>Figura 2.</i> Representación del proceso de fecundación, desarrollo embrionario e implantación	13
<i>Figura 3.</i> Señales moleculares implicadas en el proceso de invasión	14
<i>Figura 4.</i> Representación de la técnica de TE.....	15
<i>Figura 5.</i> Distribución de la población de estudio según el tipo de ciclo y la consecución de la gestación.	36
<i>Figura 6.</i> Duración media de Pre-ICDE, ICDE y TME en los grupos de embarazo y no embarazo.	37
<i>Figura 7.</i> TEB para Pre-ICDE, ICDE y TME distribuidos según la media global... ..	38
<i>Figura 8.</i> TEB para Pre-ICDE, ICDE y TME distribuidos en percentiles.....	40
<i>Figura 9.</i> Duración media de Pre-ICDE, ICDE y TME en los grupos de ciclos en fresco y criopreservados... ..	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA FECUNDACIÓN *IN VITRO*

En 1978, Patrick Christopher Steptoe y Robert Geoffrey Edwards fueron responsables del primer nacimiento tras un ciclo de Fecundación *in vitro* (FIV) y Transferencia Embrionaria (TE). El nacimiento de esta niña, llamada Louise Brown, supuso una revolución en el mundo médico y científico, ya que ofrecía nuevos horizontes al problema de la infertilidad humana, y marcó el inicio de la era de la Tecnología de la Reproducción Humana Asistida. Sus contribuciones en el campo de la FIV, hicieron a Robert Edwards merecedor del Premio Nobel en Fisiología o Medicina en el año 2010 (*Kamel y cols., 2013*).

La FIV consiste en poner en contacto los gametos masculinos (espermatozoides) y femeninos (óvulos) para lograr la fecundación y el desarrollo embrionario inicial fuera del organismo de la mujer (*Sociedad Española de Fertilidad, 2012*). Los embriones resultantes son finalmente transferidos al útero de la mujer para conseguir la gestación, sea en ciclos en fresco o tras criopreservarlos.

Fundamentalmente, existen dos modalidades para llevar a cabo la FIV:

- **Fecundación *in vitro* convencional (FIV):** Se ponen en contacto los gametos, en condiciones óptimas para que la fecundación suceda de forma espontánea.
- **Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoide o Microinyección Espermática (ICSI):** Es una variedad de la FIV convencional, en la que se selecciona e introduce un espermatozoide en el interior de cada ovocito.

Inicialmente, las técnicas de FIV se utilizaron para el tratamiento de la infertilidad asociada a obstrucciones tubáricas bilaterales, en la que la concepción natural no era posible. Las aplicaciones de la FIV/ICSI han ido cambiando con el tiempo, de forma que hoy en día son muy variadas, e incluyen: lesión o ausencia de las trompas, alteración severa de la calidad seminal, endometriosis moderada o severa, alteraciones de la ovulación, alteraciones inmunológicas con trascendencia reproductiva, necesidad de DGP, EOD... (*van Loendersloot y cols., 2010; Sociedad Española de Fertilidad, 2011*).

Los procedimientos de FIV requieren disponer de un número de ovocitos elevado, lo que se consigue mediante un tratamiento de estimulación ovárica. Mediante la administración de fármacos, se consigue bloquear los mecanismos fisiológicos y controlar el ciclo ovárico, estimular el desarrollo y maduración de varios folículos, y desencadenar la ovulación de forma controlada. El resultado es la obtención de varios ovocitos maduros, que serán fertilizados, y los embriones resultantes se mantendrán en cultivo hasta el momento de la transferencia o, en su caso, de la criopreservación.

1.2 FACTORES QUE INFLUYEN EL ÉXITO DE LOS CICLOS FIV/ICSI

Las probabilidades de éxito de un ciclo de FIV/ICSI-TE dependen predominantemente de la edad de la mujer, del número de embriones transferidos, y de la calidad de los mismos. La probabilidad media de embarazo por ciclo se sitúa entre el 29% y el 35%, aunque los valores oscilan entre el 10% y el 40% en función de las características concretas de cada caso (*Sociedad Española de Fertilidad, 2012*). Otros predictores de éxito propuestos son: la duración de la infertilidad, el tipo (primaria o secundaria), la indicación para FIV, los valores basales de FSH, el número de ovocitos obtenidos y el método de fertilización (FIV convencional o ICSI). Aunque existen sospechas de que estos factores condicionan en mayor o menor grado los resultados de las TRA, no existen evidencias suficientes para afirmar esa influencia. El meta-análisis llevado a cabo por van Loendersloot y cols. en base a los datos existentes, concluye que la duración de la infertilidad, los niveles basales de FSH, y el número de ovocitos extraídos, son predictores del éxito de la FIV (*van Loendersloot y cols., 2010*).

La **edad materna** constituye un factor fundamental a la hora de predecir el éxito de un ciclo FIV/ICSI. La explicación biológica del descenso en la probabilidad de gestación a medida que avanza la edad, reside en la disminución de la reserva ovárica (RO), con menor recuento y calidad ovocitarios. Esto conduce, en general, a una menor respuesta en la estimulación con gonadotropinas, reduciendo así la posibilidad de embarazo. Además, otros factores relacionados con el éxito de las TRA como la FSH basal, el número de ovocitos y el tiempo de infertilidad, son dependientes de la edad.

Una mujer de edad avanzada tiene más posibilidades de sufrir un período de infertilidad más largo, sus niveles basales de FSH aumentan progresivamente, y el número de ovocitos disminuye.

El **número de embriones** transferidos es un aspecto que genera controversia entre los especialistas en Reproducción, y está regulado por la Legislación de cada país. Las principales sociedades científicas realizan guías de recomendaciones para la práctica clínica, basándose en criterios como la edad de la mujer y la calidad embrionaria en el día de la transferencia. En España, todas las decisiones tienen como máximo exponente la *Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida (B.O.E., núm. 126, de 27 de mayo de 2006)*, que limita el número máximo de embriones transferidos a tres. Si bien está comprobado que existe una relación positiva entre el número de embriones transferidos y las tasas de éxito, también se confirma la misma relación con las tasas de embarazos múltiples (*van Loendersloot y cols., 2010*). Con el fin de evitar los costes que estos suponen, tanto en salud como económicos, la tendencia de las políticas de TE se orienta a seguir las indicaciones de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE): transferencia electiva de embrión único. La Sociedad Española de Fertilidad (SEF), no recomienda la transferencia de más de dos embriones a pacientes menores de 35 años, y apoya la transferencia de un único embrión en los casos más favorables. En aquellos casos en los que la calidad embrionaria es excelente y el número de embriones elevado, indican la criopreservación.

Hay muchos estudios que apoyan que la **calidad embrionaria** constituye, por sí misma, un factor predictivo del éxito en los ciclos de FIV/ICSI. Las pacientes con mejores embriones en términos de morfología y desarrollo tienen más probabilidades de embarazo (*van Loendersloot y cols., 2010*). Existen distintas clasificaciones embrionarias según su calidad, la mayoría basadas en la evaluación de caracteres morfológicos. La Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), estableció una serie de criterios y normas para la clasificación de los embriones hasta el estadio de blastocisto. Aunque los estadios de desarrollo más significativos a la hora de establecer una clasificación son los pre-embriónicos (días +2 y +3) y de blastocisto

(días +5 o +6), parece que la valoración de los demás estadios (ovocito, cigoto y primera división celular, y mórula) también pueden ser de ayuda, especialmente ante la elección de embriones de la misma categoría (ASEBIR, 2008). En la **Tabla I**, se resumen los criterios más importantes para los días +2 y +3 de desarrollo:

Tabla I. Clasificación ASEBIR de la calidad embrionaria para los días +2 y +3 de desarrollo.

CATEGORÍA	Blastómeras en DÍA+2	Blastómeras en DÍA+3	%Fragm	Simetría	Otras
A	4	7-8	10%	I/S	
B	4	7-8	10-25%	I/S	
	2 o 5	≥9			
C	2,4 o 5	≥7	25-35%	Irreg	Escasas vacuolas ZP anormal
	6	≥8			
	2 o 4	6			
D	1 o ≥6	Indiferente	>35%	Irreg	Fragm grado IV Multi-nucleación Múltiples vacuolas AC en D+3
		<6			
	3 semejantes				
		1			

S= Semejantes; NS= No semejantes; I=Iguales; Irreg= Irregulares; Fragn= Fragmentación; ZP= Zona pelúcida; AC= Anillo acitoplasmático.

Existen muchos estudios acerca de otros aspectos relacionados con la calidad embrionaria, como el perfil metabólico o el estudio de aneuploidías, todos ellos prometedores pero aún experimentales. Actualmente, el estudio de la cinética del desarrollo está ganando cada vez más peso gracias a la aparición de los sistemas de videografía *Time-Lapse*. En la clínica, se utilizan fundamentalmente tres sistemas: Embryoscope®, Primo Vision®, y EEVA®. Estos permiten un análisis más exacto de cuándo y cómo se producen los principales eventos en el desarrollo, por lo que la definición de los intervalos más favorables de cara a la implantación permitirá establecer una clasificación más objetiva y eficaz.

1.3 LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

La implantación embrionaria constituye el paso más crítico en el proceso reproductivo de muchas especies, y es fundamental en el establecimiento del embarazo. Se trata de un fenómeno biológico excepcional, basado en un íntimo diálogo entre el embrión y el endometrio materno para formar una placenta capaz de mantener el feto durante la gestación. Un endometrio receptivo y un embrión con capacidad implantatoria en estadio de blastocisto temprano, son fundamentales para que esto ocurra con éxito. Se dice que el endometrio es receptivo cuando es competente, morfológica y funcionalmente, con la implantación (Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013; Edgell y cols., 2013).

La maduración folicular desde folículo primario hasta que ovula el ovocito, dura unas 4 semanas. Este es el tiempo en el que la superficie uterina tiene que prepararse para la implantación y desarrollo embrionario, por lo que debe haber una coordinación exacta entre el ciclo ovárico y el menstrual (los cambios en el útero). Esto se consigue mediante el control hormonal a través del eje Hipotálamo-hipófisis-ovario (**Figura 1**).

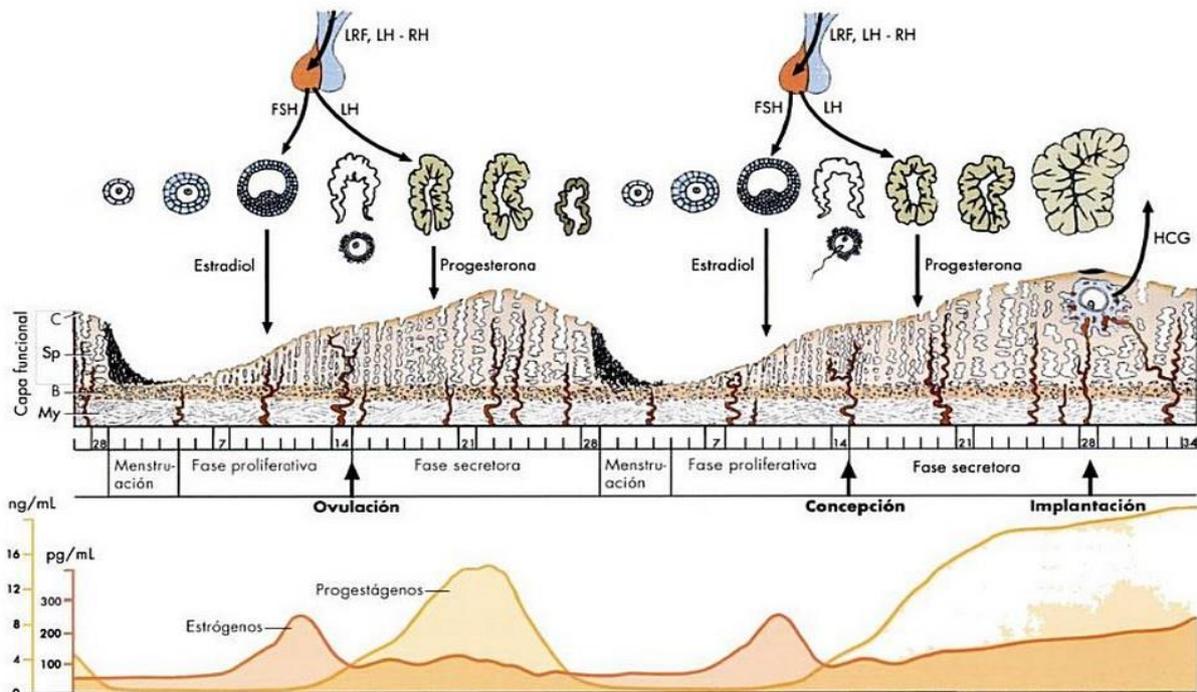


Figura 1. Dinámica del endometrio durante el ciclo menstrual y la concepción y relación con el ciclo ovárico y las hormonas reguladoras (Rohen JW y Lütjen-Drecoll, 2008).

A lo largo del ciclo, el endometrio pasa por distintas fases de desarrollo. En la **fase menstrual** (días 1-4), se produce el desprendimiento y eliminación de la capa funcional del endometrio. Esta, junto con la sangre de los vasos que atraviesan la capa basal, constituyen lo que se conoce como menstruación.

En la primera fase del ciclo, el aumento en los niveles de Estrógenos estimula proliferación celular para llevar a cabo la regeneración y restitución de la capa funcional a partir de la capa basal intacta. Se conoce como **fase proliferativa**, y se extiende desde el día 5 hasta que se produce la ovulación, en torno al día 14. El endometrio crece hasta alcanzar un espesor favorable a la implantación de entre 8 y 12 milímetros. En este crecimiento participan distintos tipos de Citoquinas y factores de crecimiento, como IGF-1, IGF-2, TNF- α y VEGF. El endometrio proliferativo se caracteriza por tener un gran número de células y glándulas tubulares rectas, más enrolladas en la capa basal.

Tras la ovulación, comienza la **fase secretora**, que dura hasta el final del ciclo (día 28). El pico post-ovulatorio de Progesterona producida por el cuerpo lúteo provoca una serie de cambios morfológicos y funcionales en el endometrio que lo preparan para la implantación embrionaria. Se produce la detención proliferativa, las glándulas epiteliales rectas se vuelven sinuosas y empiezan a secretar Glucógeno, dilatando su lumen. Se observa edema en el estroma, y se produce la diferenciación de las células estromales en células especializadas de la decidua. Además, tiene lugar una reorganización y expansión vascular, y la afluencia de células *NK* uterinas. Esta diferenciación celular del estroma para formar un tejido especializado o decidua se conoce como decidualización, y es fundamental para dirigir la implantación embrionaria, promover la formación de vasos sanguíneos y formar la placenta. (*Urbina y Lerner, 2008*).

El remodelado del endometrio tiene como consecuencia funcional su receptividad, que ocurre en la mitad de la fase secretora, y tiene una duración de unos cuatro días (días 20-24 del ciclo). Durante este período, llamado ventana de implantación, el epitelio luminal se aplanan y desaparecen las microvellosidades. Esto coincide con la llegada del embrión a la cavidad uterina, después de haber atravesado

las trompas de Falopio donde se produjo la fecundación, y haberse desarrollado en sincronía con el endometrio hasta alcanzar el estadio de blastocisto (**Figura 2**).

En otras fases del ciclo, el endometrio se muestra hostil y la implantación del embrión no es posible (Koot y cols., 2012). Si no se produce la fecundación, la caída en los niveles de Estrógenos y Progesterona por la degeneración del cuerpo lúteo provoca la isquemia y necrosis de la capa funcional, y tiene lugar la menstruación.

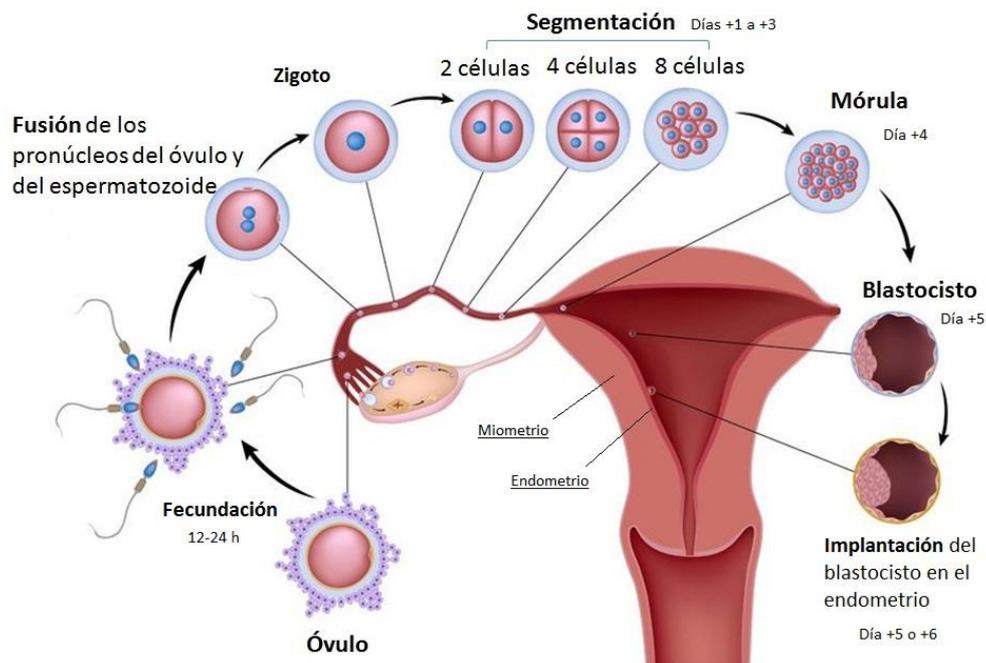


Figura 2. Representación del proceso de fecundación, desarrollo embrionario e implantación (Modificado de Royalty Free Stock Photos, Vectors and Illustrations, 2014).

El proceso de implantación puede dividirse en tres fases: aposición, adhesión e invasión. En la primera fase de aposición, el blastocisto orienta su masa celular interna hacia una zona determinada de la superficie luminal de la cavidad endometrial, donde más tarde se fijará. Las células del trofoectodermo del blastocisto se adhieren de forma laxa al epitelio receptivo. Posteriormente, el blastocisto se anclará a la lámina basal del endometrio y a la matriz extracelular estromal. En este punto, el embrión y el endometrio establecen una vinculación estable (adhesión). Finalmente, el blastocisto realiza una penetración invasiva del epitelio luminal, regulada por una compleja red de señales moleculares (**Figura 3**) (Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013).

A pesar del creciente éxito de los ciclos de FIV, las bajas tasas de implantación (TI) continúan siendo un obstáculo. La TI media en FIV se sitúa alrededor del 25%, y el fallo de implantación se considera una de las causas de infertilidad principales en las mujeres sanas (*Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013*).

Además de la calidad embrionaria y la receptividad endometrial, la TE pasó a tener relevancia como determinante del éxito en la implantación en ciclos de FIV. Por esta razón, desde hace unos años muchos estudios se centran en determinar cuáles son las mejores condiciones para realizar la TE, así como los factores que la afectan (*Mains y Van Voorhis, 2010*).

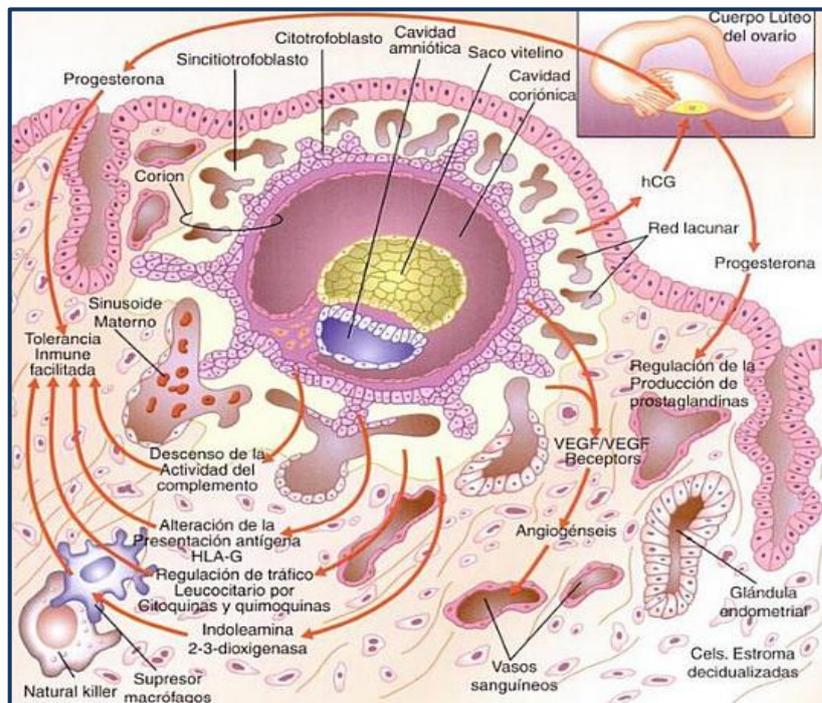


Figura 3. Señales moleculares implicadas en el proceso de invasión (*Simon y cols., 2009*).

1.4 LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Desde que se consiguió el primer embarazo con éxito en el año 1978, las TRA han sufrido grandes variaciones y mejoras en muchos aspectos. Sin embargo, la técnica de TE ha permanecido prácticamente invariable desde su primera descripción por Edwards y cols. en 1984. La TE requiere el trabajo conjunto de biólogos y clínicos, de forma que el éxito depende tanto de la viabilidad de embriones capaces de implantar como de la realización de la técnica de forma no traumática (*Schoolcraft y cols.*, 2001).

En general, el procedimiento de la TE se realiza en el quirófano, sin necesidad de anestesia. La paciente adopta una posición litotómica, se realiza un lavado genital con solución salina y se procede a visualizar el cuello uterino colocando un espéculo en la vagina. Dependiendo del ginecólogo, se pueden limpiar los restos de la Progesterona aplicada por vía intravaginal durante el tratamiento, y también el moco cervical, cuyo efecto se mencionará más adelante. Tras confirmar la identidad de la paciente, el embriólogo carga el catéter con los embriones a transferir mediante la técnica elegida, y el ginecólogo lo introduce a través del canal cervical. Una vez alcanzada la cavidad uterina, se depositan los embriones y se retira el catéter con mucho cuidado (**Figura 4**). Es entonces cuando el embriólogo se asegura, mediante la observación del catéter en la lupa estereoscópica, que los embriones han sido depositados con éxito, o si por el contrario han quedado retenidos en alguna de las partes del catéter.

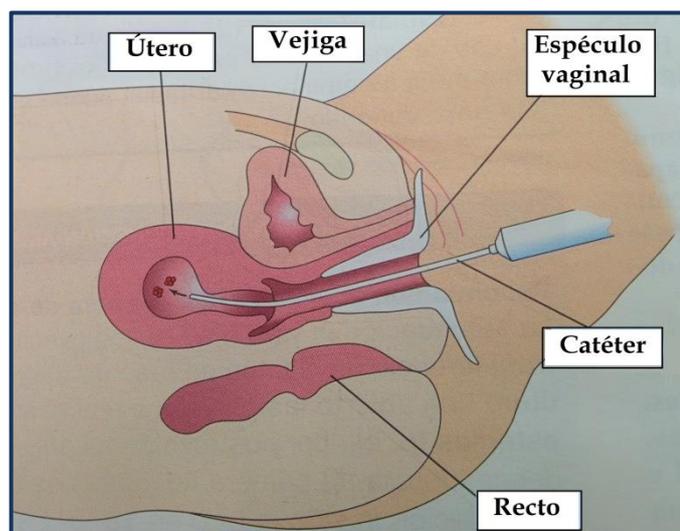


Figura 4. Representación de la técnica de TE (Modificado de Moore y Persaud, 2008).

1.4.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RESULTADO DE LA TE

El objetivo de la TE es depositar los embriones en el útero, en una localización en la que se favorezca la implantación, de la forma menos traumática posible (*Mains y Van Voorhis, 2010*). Para esto, se ha estudiado cómo mejorar distintos aspectos de la técnica, pero la influencia de múltiples variables y la dificultad para estandarizarlas durante el procedimiento dificulta la obtención de resultados concluyentes. Algunos de los factores que condicionan el éxito de la TE son los siguientes:

1) Técnicas de cargado del catéter

En general, existen dos formas de cargar el catéter durante la TE, que se distinguen básicamente en la introducción de aire y medio de transferencia o únicamente medio. En la técnica de cargado con aire, la columna del catéter contiene un volumen central de medio de transferencia en la que se sitúan los embriones, rodeado a ambos lados por burbujas de aire que lo separan de medio de transferencia sin embriones. La otra técnica, localiza los embriones en una única columna continua de medio de transferencia, sin espacios. Una modificación de estas técnicas consiste en cargar el catéter con una única burbuja de aire en el extremo del catéter, disminuyendo el aire introducido en la cavidad uterina (*Abou-Setta, 2007*).

Las burbujas de aire facilitan localizar los embriones en el catéter y en la ecografía, lo que no solo agrada a los especialistas sino también a los pacientes. Además, se reduce la probabilidad de que se pierdan antes de depositarlos en lugar correcto dentro de la cavidad uterina, o que se muevan en la columna aumentando el riesgo de que queden retenidos en el catéter. Por otra parte, se sugirió que el aire podría facilitar la retención de los embriones en el catéter, y sus movimientos dentro del útero. Actualmente, no existen evidencias acerca del efecto beneficioso o perjudicial de una técnica frente a otra, por lo que queda a elección de cada especialista (*Abou-Setta, 2007*).

2) Deposición de los embriones

Aunque no existe consenso a la hora de determinar cuál es la mejor posición para depositar los embriones, parece que la más aceptada es cerca del fondo uterino,

a menos de 10 milímetros, sin llegar a tocarlo para evitar la estimulación de las contracciones uterinas. Las mayores tasas de gestación observadas podrían deberse a la expresión de factores importantes para la implantación, mayor irrigación sanguínea del tejido y menor incidencia de contracciones. Además, la localización de los embriones en esa posición se relaciona con menores tasas de embarazos ectópicos (*Cenksoy y cols., 2014*).

En general, se acepta que una distancia de 1.5 a 2 milímetros entre la punta del catéter interno y el fondo uterino es la más adecuada. El tamaño de la cavidad uterina también es un factor a tener en cuenta, ya que en los úteros profundos los embriones se depositan más lejos del fondo uterino (*Cenksoy y cols., 2014*).

3) Retirada del catéter

Algunos estudios defienden que la presión negativa realizada al retirar el catéter favorece la deposición de los embriones en la vagina. Con el fin de evitarlo, se plantearon variaciones en la técnica de la TE, como la introducción de aire con una jeringa inmediatamente después de la descarga del catéter. De esta forma, se genera una presión positiva que evita el retroceso de los embriones en la retirada del catéter. La presión es contraria a las contracciones uterinas, de forma que previene la expulsión de los embriones. Este procedimiento, descrito por Madani y cols. (2010), consigue TEC y TI significativamente superiores (*Madani y cols., 2010*).

4) El grosor endometrial

El grosor y estructura del endometrio son fundamentales en el proceso de implantación embrionaria. El éxito del proceso se relaciona con un patrón ecográfico de “triple línea”, y su grosor se utiliza como marcador clínico de la receptividad endometrial, aunque no todos los estudios lo apoyan ni existe consenso para establecer los puntos de corte. En general, el aumento en el grosor endometrial se correlaciona con mayores TEC, situándose el intervalo óptimo entre 7 y 14 milímetros el día de la administración de la hCG. El aumento del grosor por encima de 14 milímetros no produce aumento en la TEC. No obstante, se han conseguido embarazos con endometrios finos, menores incluso de 4 milímetros (*Casper, 2011; Aydin y cols.,*

2013). Los protocolos de estimulación modulan los niveles de Estrógenos y Progesterona, afectando por lo tanto al endometrio. El uso de Antagonistas de la GnRH se asocia con endometrios más finos, aunque las diferencias no son significativas (Aydin y cols., 2013).

La explicación de por qué endometrios finos se asocian con fallos en la implantación no está clara. Una respuesta podría ser el descenso en el número de receptores esteroideos durante la ventana de implantación, como sucede en casi todos los mamíferos estudiados, pero no explicaría los embarazos ectópicos. Recientemente, se planteó la hipótesis de que la causa es la alta presión de Oxígeno y la consecuente producción de radicales libres en las inmediaciones de la capa basal del endometrio, en comparación con las condiciones de hipoxia de la superficie durante la implantación (Casper, 2011). Dada su relevancia, actualmente se están realizando estudios de genómica, proteómica, microRNA, así como técnicas ecográficas optimizadas que permitan evaluar correctamente el endometrio y establecer biomarcadores fiables de la receptividad endometrial.

5) La dificultad de la transferencia

A pesar ser un procedimiento aparentemente sencillo, las TE dificultosas aparecen con frecuencia en los ciclos de FIV. Para valorar correctamente la dificultad de la TE, sería necesaria la medida directa del daño producido al endometrio durante el procedimiento, lo que influiría por sí mismo el resultado (Schoolcraft y cols., 2001). Por eso, aunque su definición es bastante subjetiva, existen medidas indirectas de la dificultad de la TE. Entre ellas se encuentran las transferencias costosas en cuanto a tiempo, aquellas que causan molestias, y las que requieren el uso de un catéter firme o instrumentación adicional como el tenáculo (Mains y Van Voorhis, 2010).

Existe mucha controversia respecto a la relación entre las transferencias fáciles o difíciles y los resultados obtenidos. Ya en 1990, Mansour y cols. encontraron TEC y TI significativamente menores (4% y 1%, respectivamente) en ciclos de FIV con TE difíciles, en comparación con las obtenidas con TE fáciles (20,4% y 6,7%, respectivamente) (Mansour y cols., 1990). Otros estudios posteriores apoyan estos

resultados (*Singh y cols.*, 2012; *Ghaffari y cols.*, 2013). Sin embargo, algunos grupos no encontraron diferencias significativas en los resultados entre transferencias fáciles y difíciles (*Nabi y cols.*, 1997; *Tur-Kaspa y cols.*, 1998; *Sallam y cols.*, 2003).

Hasta ahora, sólo se ha realizado un meta-análisis publicado recientemente, cuyo objetivo era determinar la proporción de riesgo asociado a las TE difíciles y a la presencia de sangre en el catéter en los siguientes parámetros: nacidos vivos, embarazos clínicos y abortos. Ninguno de los estudios recogía información acerca de los nacidos vivos, y solo uno sugería un aumento significativo en el riesgo de aborto asociado a TE dificultosas, pero el pequeño tamaño de muestra hizo que las conclusiones no fueran relevantes. En cuanto a las TEC, observaron un descenso significativo de un 9.4% en TE difíciles. Las conclusiones poco consistentes de este meta-análisis reflejan la falta de estudios realizados bajo condiciones comparables, así como los problemas para definir la dificultad de la técnica (*Phillips y cols.*, 2013).

Las causas frecuentes de la dificultad de las TE son la estenosis cervical o el alto grado de anteversión/retroversión o anteflexión/retroflexión del útero. Las TE fáciles se asocian con ciertos aspectos técnicos, como una prueba de transferencia previa, uso de guía ecográfica y uso de catéteres suaves (*Mains y Van Voorhis*, 2010).

6) Test de transferencia previo

Las pruebas o test de transferencia previas a la TE propiamente dicha, permiten evaluar la posición anatómica del cérvix uterino, de forma que el ginecólogo puede canalizarlo más fácilmente y evitar perturbaciones el día de la verdadera TE.

En un ensayo controlado y aleatorizado con 335 pacientes, se encontraron mayores TEC y TI en casos con test de transferencia previos a la verdadera TE frente a los casos en los que no se habían realizado (*Mansour y cols.*, 1990). Además, el porcentaje de transferencias difíciles el día de la TE era menor cuando se realizaba el test. A día de hoy, no existen más ensayos de este tipo.

El test de transferencia puede realizarse antes de empezar la estimulación ovárica o justo antes de realizar la verdadera TE. El tamaño de los ovarios varía desde el inicio de la estimulación hasta el día de la punción. Esto hace que la posición del

útero y del ángulo cervical pueden sufrir modificaciones desde que se realiza el test hasta el día de la TE. La longitud de la cavidad uterina parece ser mayor al acercarse el día de la verdadera TE, por lo que el éxito de la técnica podría verse limitado (*Katariya y cols.*, 2007). Por este motivo, algunos investigadores están a favor de realizar el test de transferencia justo antes de transferir los embriones, pero la posible estimulación de las contracciones uterinas tendría el mismo efecto negativo que una transferencia larga y traumática. Otros grupos defienden que el mejor momento es el día de la punción, aunque la receptividad endometrial podría verse entonces disminuída. Por lo tanto, cuándo y a qué pacientes se les debe realizar el test de transferencia continúa siendo un tema en debate (*Levi Setti y cols.*, 2003; *Mains y Van Voorhis*, 2010).

La duración del test de transferencia no parece tener efecto en las TEC y TI, independientemente del momento en el que sea realizado (*Katariya y cols.*, 2007).

7) Transferencia eco-guiada frente a palpación ginecológica

Desde que la TE guiada mediante ecografía abdominal fue descrita en 1985 por Strickler, son muchos los estudios que demuestran sus beneficios en los resultados (*Strickler y cols.*, 1985).

Actualmente, pocos ginecólogos utilizan la palpación durante la TE. Sus principales inconvenientes son la dificultad para localizar el catéter y el peligro de tocar el fondo uterino inconscientemente. El contacto con el fondo en TE “a ciegas” se ha encontrado en el 17,4% de los casos, produciendo un aumento de las contracciones uterinas que puede disminuir la posibilidad de embarazo (*Woolcott y cols.*, 1997).

La transferencia eco-guiada permite introducir el catéter de forma no traumática, asegurar su localización en la cavidad uterina y evitar el contacto con el fondo uterino. Además, en casos de angulación del canal cervical, facilita la entrada del catéter y permite al ginecólogo el uso de un catéter maleable que se adapte a la anatomía de la paciente. También constituye una ayuda en aquellos úteros distorsionados por fibromas que desvían el catéter, o con otra clase de anomalías difíciles de evaluar mediante el tacto. El uso de la ecografía abdominal requiere que la paciente acuda a la TE con la vejiga urinaria llena. Esto es de especial ayuda en

pacientes con un canal cervical muy angulado, en los que la introducción del catéter es complicada, ya que al tener la vejiga llena el canal cervical se alisa. La ecografía ofrece ventajas adicionales: permite evaluar los ovarios y la presencia de exceso de fluido peritoneal, determinando si se debe cancelar la TE por riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHEO) (*Schoolcraft y cols.*, 2001; *Mains y Van Voorhis*, 2010).

El uso de la eco-guía consigue alcanzar TEC y TI significativamente superiores, así como reducir la incidencia de factores que afectan negativamente a los resultados, como las transferencias dificultosas y el sangrado durante el procedimiento, en comparación con las transferencias “a ciegas” (*Sallam*, 2004; *Sallam*, 2005). En este aspecto, la posibilidad de modular el catéter adaptándolo a la anatomía cervical tiene mucha importancia. Estos resultados concuerdan entre varios estudios y meta-análisis publicados, así como con una revisión Cochrane publicada en 2010 (*Buckett y cols.*, 2003; *Brown y cols.*, 2010). Sin embargo, deben realizarse más estudios que confirmen estos resultados, ya que algunas variables con influencia en las TEC y TI diferían entre los casos estudiados (*Lambers y cols.*, 2006).

En la literatura, existe una tendencia a establecer una relación entre el uso de la ecografía durante la TE y el descenso en la tasa de embarazos ectópicos, pero no todos los estudios permiten afirmarlo. Independientemente de que los autores estén a favor o en contra de su uso, ningún estudio evidencia que la TE eco-guiada tenga efectos adversos, justificando su uso rutinario (*Flisser y cols.*, 2007).

A pesar de las evidentes ventajas, la ecografía abdominal también presenta inconvenientes, y ciertos autores continúan criticando su eficacia. Algunos de estos inconvenientes podrían ser la necesidad de un ayudante para utilizar el ecógrafo, una mayor duración del procedimiento, o que la paciente tenga la vejiga correctamente llena (*Mains y Van Voorhis*, 2010). Otros autores no encuentran mejoras en cuanto a las TEC y TI al realizar TE eco-guiada cuando se realiza previamente una medida ultrasonográfica del endometrio o un test de transferencia (*Lambers y cols.*, 2006).

En los últimos años, se están investigando las posibles aplicaciones de otros tipos de ecografía en la TE, como la ecografía en 3 y 4 dimensiones, o la ecografía vaginal (Mains y Van Voorhis, 2010).

8) Tipo de catéter

En la actualidad, existen muchos catéteres comercialmente disponibles para realizar las TE en las clínicas de Reproducción Asistida (**Tabla II**). Sus diseños buscan adaptarse a las diferencias anatómicas que presenta el aparato reproductor femenino, intentando disminuir su agresión durante la TE y aumentar la precisión al depositar los embriones. Aunque todos tienen aspectos comunes y están compuestos por plásticos no tóxicos, exhiben variaciones que incluyen: composición por materiales de mayor o menor rigidez y calidad, aberturas en sus extremos o laterales (cargado distal o lateral), distinto grado de maleabilidad, presencia o no de vaina externa, y diferencias en la longitud, el calibre y en los acabados finales.

a. Firmeza del catéter

Aunque se han hecho varios estudios, tampoco existe consenso entre los especialistas acerca de cuál es el mejor catéter. En general, se considera que los catéteres blandos consiguen mejores resultados que los más firmes, ya que producen menos lesiones cervicales y endometriales. Además, su uso podría reducir la incidencia de las contracciones uterinas. Las complicaciones por cuellos uterinos aparentemente difíciles de atravesar, pueden ser solventadas sin necesidad de utilizar un catéter firme, ya que existen fiadores para los catéteres blandos. La principal desventaja de utilizar un catéter blando es el tiempo empleado en una TE difícil. Esto se puede solucionar realizando previamente un test de transferencia, y mediante la realización de la TE eco-guiada y con la vejiga llena, lo que facilita el paso si hay la angulación cervical (Buckett, 2006). No todos los resultados apoyan el uso de los catéteres blandos, ya que muchos autores no encontraron diferencias significativas en el éxito con respecto a los firmes (Sallam, 2004), pero tampoco se evidenció lo contrario. Durante muchos años, el catéter más popular y utilizado como estándar en la mayoría de los centros de Reproducción Asistida, fue el Edwards Wallace[®]. Otro catéter blando

muy utilizado de forma rutinaria es el el catéter Cook[®], más suave que el Wallace[®] (Buckett, 2006; Saldeen y cols., 2008).

Tabla II. Principales tipos de catéteres disponibles comercialmente (Buckett, 2006; Saldeen y cols., 2008).

Catéteres blandos o flexibles		Catéteres rígidos	
Nombre	Casa comercial	Nombre	Casa comercial
Edwards Wallace[®]	Smiths Medical, Hythe, Kent, United Kingdom	Frydman[®]	Laboratoire CCD, Paris, France
Cook[®]	Cook Ob/Gyn, Inc., Bloomington, IN	Frydman TDT[®]	Laboratoire CCD, Paris, France
		Tomcat[®]	Kendell Health Care, Hampshire, Massachusetts
		Tefcat[®]	Kendell Health Care, Hampshire, Massachusetts
		Rocket[®]	Rocket Medical, Watford, United Kingdom

Dos revisiones sistemáticas y meta-análisis que compararon los resultados de los catéteres firmes frente a los blandos, coinciden al concluir que el uso de catéteres blandos incrementa significativamente las TEC. Uno de ellos también encuentra una mejora significativa en las tasas de nacidos vivos al usar catéteres blandos. Observaron que las TE con catéteres blandos suponían eventos traumáticos con más frecuencia, y una tendencia al fracaso, pero sin significación estadística. Además, encontraron con más frecuencia sangre, mucosidad o embriones retenidos en los catéteres blandos, pero estos resultados no afectaron a las TEC. Por otra parte, el otro grupo no encontró diferencias entre los resultados obtenidos al usar el catéter Wallace[®] frente al Cook[®] (Abou-Setta y cols., 2005; Buckett, 2006).

b. Ecogenicidad del catéter

Con la generalización del uso de ecografía, aparecieron nuevos catéteres adaptados a esta técnica para mejorar los resultados. Estos incorporan una banda ecogénica de acero inoxidable en la punta de la cánula interna, como el Cook Echo-Tip[®], o ecogenicidad a lo largo de toda su extensión, como el SureView Wallace[®]. De esta forma, se facilita su visualización durante las TE eco-guiadas y hacen el proceso

más sencillo y rápido. Su uso limita los movimientos del catéter que tiene que hacer el ginecólogo para localizar la punta, y resulta aún más ventajoso en pacientes obesas o que no tienen la vejiga suficientemente llena en el momento de la transferencia (Karande y cols., 2002; Coroleu y cols., 2006).

Los resultados de un estudio comparativo apuntan a favor del catéter ecogénico frente al estándar, al facilitar el proceso por la sencillez de su localización, pero no se encontraron mejoras en cuanto a las TEC y TI. Los autores sugieren que el suave movimiento del catéter para localizarlo no es suficiente para afectar negativamente a los embriones o al endometrio (Karande y cols., 2002). Otro estudio comparativo realizado posteriormente, tampoco obtuvo diferencias significativas en las TI y TEC, aunque se observó mayor número de transferencias fallidas en el primer intento cuando se usaba el catéter Wallace® convencional. Esto pudo ser debido a que no usaron en ningún caso el fiador cuando se requería, ya que no estaba comercialmente disponible en lugar donde se realizó el estudio (Saldeen y cols., 2008). Coroleu y cols. encuentran mejores resultados cuando se usa un catéter ecogénico, pero tampoco tienen suficiente potencia estadística. Observan, además, que la tasa de embarazo múltiple es más alta en ese grupo de estudio, y concluyen que se necesitan estudios con muchos más casos para confirmar sus resultados (Coroleu y cols., 2006).

A la vista de los resultados publicados, y a falta de más estudios consistentes, parece razonable priorizar el uso de un catéter suave y ecogénico, así como la ecografía durante la transferencia, para facilitar el procedimiento y optimizar los resultados. Se debe utilizar el fiador antes que un catéter firme frente a pequeñas dificultades al canalizar el cuello uterino.

9) Sangre en el catéter

Al igual que en la dificultad, existen resultados contradictorios sobre la relación entre la presencia de sangre en el catéter y el éxito de la TE. La presencia de sangre al retirar el catéter está íntimamente relacionado con la dificultad de las TE, ya que suele ser resultado de forzar su entrada a través del canal cervical. Por este motivo, muchos autores estudian ambas variables conjuntamente. Singh y cols., en su estudio acerca

de la dificultad de las TE, refieren un descenso en la TEC en los casos en los que la sangre aparece en la punta del catéter y no en la vaina externa (*Singh y cols.*, 2012). El meta-análisis publicado por Phillips y cols. en 2013 también es el único publicado hasta la fecha sobre este factor. No se encuentran diferencias significativas en las TEC cuando aparece sangre en el catéter frente a cuando no aparece. Los pobres resultados en cuanto a las tasas de aborto no permiten extraer conclusiones, y no existen datos acerca de los nacidos vivos (*Phillips y cols.*, 2013).

10) Retirada del moco cervical

Hace unos años, el efecto negativo del moco cervical en la búsqueda de la gestación adquirió gran importancia, y su retirada antes de la TE parecía muy importante. Se sugirió que los embriones podían adherirse al moco que quedaba alrededor del catéter, interrumpiendo su deposición en la cavidad uterina (*Mains y Van Voorhis*, 2010). El último meta-análisis publicado sobre la efectividad de la retirada del moco cervical antes de realizar la TE, concluye que no parece haber un beneficio notable en los resultados de los ciclos FIV/ICSI. Aun así, se necesitan más estudios para comprobar un posible pequeña ventaja al realizarla (*Craciunas y cols.*, 2014).

11) Tiempo entre la carga y la descarga del catéter.

La publicación de un estudio realizado por Matorras y cols. en 2004, sugirió la influencia de un parámetro no estudiado hasta entonces: la duración de la transferencia. La exposición de los embriones a factores ambientales diferentes a las condiciones del cuerpo humano, así como la composición de los catéteres, podrían tener un efecto perjudicial, de forma que el tiempo empleado en la realización de la técnica podría servir como factor pronóstico de las TEC y TI. Matorras y cols. concluyen que, cuanto mayor es la duración de la TE, menores tasas de implantación y embarazo se consiguen. Este descenso es más pronunciado cuando las TE se prolongan más de 120 segundos (*Matorras y cols.*, 2004).

12) Otros factores

a. Uso de fármacos

Con el fin de disminuir las contracciones uterinas que afectan negativamente a la probabilidad de embarazo, se probaron distintos fármacos como la Progesterona, Anti-Prostaglandinas, Óxido Nítrico y Beta-adrenérgicos como la Ritodrina. Sólo la Progesterona resultó en una disminución de la contractibilidad miometrial, pero no se demostró una mejora significativa en las TEC y TI (*Mains y Van Voorhis, 2010*). Actualmente, se intenta demostrar la utilidad clínica del Atosiban, un antagonista de los receptores de Oxitocina que inhibe la contractibilidad uterina y reduce la liberación de Prostaglandinas. También presenta afinidad por los receptores de Vasopresina debido a su semejanza estructural. Existen indicios de que el Atosiban podría favorecer la implantación embrionaria al incrementar la perfusión endometrial (*Soares, 2014*).

b. Reposo tras la TE

No se han demostrado diferencias significativas en los resultados después de tomar ciertas precauciones, como el reposo absoluto de la paciente tras la TE (*Mains y Van Voorhis, 2010*).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Durante el tiempo en el que los embriones permanecen en el catéter, se exponen a un microambiente de condiciones no fisiológicas que pueden afectar negativamente a su capacidad de implantación. Ante esto, se planteó la hipótesis de que **el tiempo que transcurre desde que se inicia el cargado de los embriones en el catéter hasta su depósito en la cavidad uterina, se relaciona con la posibilidad de conseguir la gestación.**

Con el fin de corroborar esta hipótesis, se llevó a cabo el presente estudio cuyo objetivo principal fue:

- 1) Establecer una relación entre la duración de la técnica de transferencia embrionaria y la tasa de embarazo en los ciclos de FIV/ICSI.

Además, se propusieron los siguientes objetivos secundarios:

- 2) Determinar la influencia de la manipulación endometrial, medida como el tiempo durante el que el catéter permanece dentro de la cavidad uterina, en la tasa de embarazo en los ciclos de FIV/ICSI.
- 3) Observar si existen diferencias significativas en la duración de la TE entre ciclos en fresco y criopreservados.
- 4) Determinar la influencia de otras variables durante la realización de la TE en los resultados de los ciclos de FIV/ICSI.

3. MATERIAL Y METODOLOGÍAS

3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente trabajo muestra los resultados de un estudio prospectivo realizado con pacientes de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). La recogida de datos se realizó en el periodo transcurrido desde el 24 de Enero hasta el 13 de Marzo del 2014.

La población de estudio constó de 41 pacientes menores de 40 años en el momento del tratamiento, sometidas a ciclos de FIV/ICSI y TE. Se tuvieron en cuenta tanto los ciclos en fresco como los criopreservados. Todas las parejas en tratamiento contaban con un estudio de esterilidad básico previo, que consistió en el análisis del perfil hormonal, histerosalpingografía, cariotipo y serología.

La inclusión de las pacientes se hizo independientemente de las causas de la esterilidad y de los protocolos de estimulación ovárica utilizados. Se excluyeron aquellas transferencias en las que se repitió el procedimiento, debido a la retención de todos o alguno de los embriones en el catéter. Como reflejo de los resultados de los protocolos de estimulación ovárica, se tomaron los valores del último Estradiol antes de la punción, así como los de la Progesterona. También se tuvo en cuenta el espesor endometrial.

En todos los casos se midió el tiempo de realización de la técnica, que se dividió en dos intervalos: el tiempo transcurrido desde el cargado de los embriones en el catéter hasta que estos se depositaron en la cavidad uterina, y el tiempo total de manipulación del endometrio, desde que el ginecólogo situó el catéter en el lugar óptimo hasta que se depositaron los embriones y se retiró el catéter. El primer intervalo, desde la carga hasta la descarga de los embriones, se denominó ICDE (*Intervalo entre la carga y descarga de los embriones*), y el tiempo total TME (*Tiempo de manipulación endometrial*). La diferencia entre ambos, es decir, el tiempo transcurrido desde que se situó el catéter en la cavidad uterina hasta que se inició la carga de los embriones en el catéter, se denominó Pre-ICDE (*Intervalo de tiempo previo al ICDE*).

En cuanto a la dificultad, las TE se catalogaron como fáciles o difíciles. En las transferencias fáciles, el catéter utilizado fue el Cook Sydney IVF[®], con el uso del fiador en aquellos casos que lo requerían. Se considerarían difíciles las transferencias en las que habría que utilizar un catéter semi-rígido o rígido (Frydman o Towako). Todas las TE incluidas en el estudio se consideraron como fáciles, ya que en ningún caso se utilizaron catéteres rígidos, a pesar de que se encontró alguna complicación a la hora de atravesar el canal cervical.

3.2 ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Con el fin de obtener un número adecuado de ovocitos para realizar las técnicas de FIV/ICSI de forma eficiente, se utilizaron protocolos largos y cortos con Gonadotropinas, que estimulan el desarrollo folicular. Las diferencias entre los protocolos largos y cortos se basan en el tipo de análogo de la GnRH utilizado para frenar la hipófisis, de forma que permite iniciar el estímulo con el ovario en reposo, evitando el pico endógeno de LH.

En los protocolos largos, se administraron dosis de 0,2 mg/día de Agonistas de la GnRH en la mitad de la fase lútea del ciclo previo a la estimulación. Se realizó de forma subcutánea, normalmente el día 21 o 22 del ciclo, para evitar un pico prematuro de LH y el desencadenamiento de la ovulación espontánea. El día 1 de la estimulación, se administró FSH en dosis entre 150-300 UI/día, siguiendo el plan individualizado de cada paciente, y se disminuyó a 0,1 mg/día la dosis de Análogo. El día 7, se realizó un control ecográfico para evaluar el desarrollo folicular.

En el caso de los protocolos cortos, las pacientes se trataron con anticonceptivos orales en el ciclo previo, durante al menos 15 días. Se administró FSH (sola o combinada con LH) el día 2 o 3 del ciclo, en dosis entre 150-300 UI/día según la paciente, y 0,25 mg/día de Antagonista de la GnRH el día 7 tras comenzar el estímulo mediante inyección subcutánea. El uso del Antagonista permite bloquear los receptores de la GnRH en la hipófisis, de forma que no se libera FSH ni LH y no se produce la ovulación espontánea. El día 7 también se realizó un control ecográfico para evaluar el desarrollo folicular.

La estimulación ovárica se realizó con Gonadotropinas recombinantes en la mayoría de los casos, aunque en algunos se utilizaron Gonadotropinas urinarias ultrapurificadas. Las dosis empleadas se ajustaron a cada paciente, teniendo en cuenta su edad, peso y marcadores de RO, como la FSH y el Estradiol basales, medidos en el tercer día del ciclo, o el RFA.

El día 10 del estímulo, se evaluó el desarrollo folicular mediante un segundo control ecográfico y la última determinación de los niveles de Estradiol en sangre periférica. Se consideró un desarrollo folicular correcto, y por lo tanto una respuesta a la estimulación normal, cuando se consiguieron cuatro o más folículos con un diámetro entre 18 y 20 milímetros. La ecografía también permitió determinar el grosor y apariencia del endometrio, de forma que se cancelaron los ciclos en los que el grosor no era adecuado (entre 7 y 14 milímetros) o no presentaba un patrón de triple línea.

36 horas antes de la punción folicular, se indujo la ovulación mediante la administración de hCG recombinante en la mayoría de los casos. Con protocolos de Antagonistas, y ante riesgo de SHEO, se desencadenó la ovulación con un bolo de Agonista de la GnRH.

La duración del tratamiento de estimulación varió entre 10 y 12 días, en función de la respuesta de la paciente.

En los ciclos de criopreservación, se realizó la preparación endometrial para la transferencia mediante un tratamiento sustitutivo con Estrógenos y Progesterona exógenos. Se utilizaron Agonistas de la GnRH, administrados en la mitad de la fase lútea del ciclo previo (día 21-22), para bloquear la hipófisis y mantener el ovario en reposo. El día 1 del ciclo, se empezaron a administrar los Estrógenos por vía oral, en dosis fijas o secuenciales ajustadas a cada paciente. La duración del tratamiento con Estrógenos fue de en torno dos semanas. Se hizo un seguimiento ecográfico, y cuando el grosor endometrial alcanzó los 7-9 milímetros se inició el aporte de Progesterona intravaginal para transformar el endometrio proliferativo en un endometrio secretor y preparar la ventana de implantación. Tres días después, tuvo lugar la TE.

3.3 PUNCIÓN FOLICULAR

A las 36 horas de la administración de la hCG o del Agonista de la GnRH, se realizó la punción de los folículos para extraer los ovocitos. Se llevó a cabo en el quirófano de forma guiada por ultrasonografía transvaginal, con la paciente en posición litotómica y previamente sedada por anestesia.

Para dar apoyo a la fase lútea, se aportó Progesterona natural micronizada por vía intravaginal. Se inició el día de la punción, y se administraron 400 mg/día durante los 15 días siguientes.

3.4 CULTIVO EMBRIONARIO

Las técnicas de FIV/ICSI se realizaron siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio de Embriología de la Unidad. Todos los medios de cultivo y mantenimiento de gametos y embriones fueron de la marca comercial Cook[®], y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras aspirar el líquido folicular en la punción, se examinó con una lupa estereoscópica bajo la campana de flujo laminar horizontal y sobre la superficie calefactada. Se extrayeron todos los complejos cúmulo-ovocito, que se decumularon más tarde utilizando Hialuronidasa. Posteriormente, se evaluó su madurez y se clasificaron morfológicamente según los criterios ASEBIR.

La mayor parte de los ovocitos se fertilizaron mediante ICSI, y sólo se utilizó en algunos casos la FIV convencional. La capacitación espermática se realizó con la técnica *swim-up*, y el procesamiento y diagnóstico del semen se hizo utilizando como referencia la 5ª edición del manual de la OMS (2010). Los ovocitos inyectados o inseminados se mantuvieron en el incubador a 37⁰C, con 6% de CO₂ hasta las 16-18 horas tras la punción, momento en el que se valoró la fertilización. Sólo se mantuvieron en cultivo aquellos ovocitos fertilizados correctamente, en los que se observaron dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Los embriones se mantuvieron en cultivo en las mismas condiciones durante 2 o 3 días tras la punción, valorando cada día su desarrollo y calidad de acuerdo con los

criterios morfológicos de ASEBIR. Teniendo en cuenta la calidad embrionaria y otras consideraciones como el grosor endometrial o el riesgo de SHEO, se determinaron los destinos posibles de los embriones: transferencia en día +2 o +3, vitrificación o descarte por no evolución. Los embriones se clasificaron como A,B,C o D teniendo en cuenta el número y tamaño de las blastómeras, morfología, presencia de multinucleación, regularidad, presencia de vacuolas o fragmentos, y tamaño de los mismos, entre otros. Los embriones tipo A presentan una calidad óptima y máxima capacidad de implantación, mientras que los tipo D presentan mala calidad y probabilidad de implantación baja.

En el caso de los ciclos de criopreservación, los embriones se desvitrificaron el día anterior a la transferencia y se mantuvieron en cultivo en las mismas condiciones que los embriones en fresco. El día de la transferencia, se evaluó su supervivencia a la vitrificación, así como su calidad según los criterios ASEBIR. Las transferencias tuvieron lugar en los días +3 o +4 de desarrollo, dependiendo del día en el que habían sido vitrificados, y sólo en un caso se transfirió en el día +5 (estadio de mórula).

3.5 TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Previamente al inicio de la estimulación ovárica, se les realizó a todas las pacientes un test de transferencia, determinando la dificultad de la misma para elegir el catéter adecuado, y se registraron las características anatómicas que pudieran interferir en la técnica. El catéter utilizado durante la prueba fue el Cook Sydney IVF® (K-Jets-7019-SIVF; Cook® Medical, Eight Miles Plains, Queensland, Australia).

La TE verdadera se realizó entre 48 y 72 horas tras la punción folicular en los ciclos en fresco, y 24 horas aproximadamente tras la desvitrificación. El procedimiento fue el mismo en ambos casos, con la paciente colocada en posición litotómica y sin anestesia. En el estudio participaron seis ginecólogos diferentes, incluyendo el personal en prácticas, que realizaron la técnica de la misma forma. El efecto de las variaciones inter-operario en el éxito de la técnica también fue objeto de estudio, y se dividieron los casos en tres grupos según la TE la hubiera realizado alguno de los dos ginecólogos principales de la Unidad de Reproducción del HUCA, o el personal en

prácticas. Se insertó, en primer lugar, un espéculo en la vagina para visualizar el cérvix. Posteriormente, se realizó un lavado de la vagina y del cérvix con suero fisiológico previamente atemperado a 37⁰C. Se utilizaron unas pinzas largas y gasas de algodón estéril con el fin de eliminar los restos de Progesterona y el moco cervical, aunque no está demostrado su efecto perjudicial. Tras esto, se evaluó la apariencia y grosor del endometrio con la ayuda del ecógrafo, para comprobar que estaba en condiciones óptimas para recibir los embriones.

El catéter estándar empleado en todas las transferencias fue el Cook Sydney IVF[®] (K-Jets-7019-SIVF; Cook[®] Medical, Eight Miles Plains, Queensland, Australia). Este consta de un catéter externo más firme y otro interno flexible. El catéter externo se utiliza como guía, es ligeramente rígido y mide 17 cm de longitud. Presenta una curvatura en su extremo, y su punta es redondeada y abultada para facilitar el paso a través del canal cervical. Presenta un marcador de profundidad a 4 cm de la punta, que puede ajustarse a 5 cm. El catéter interno, más blando, mide 23 cm de longitud y presenta una punta redondeada (*Saldeen y cols., 2008*).

El catéter utilizado para cada paciente, se atemperó previamente en una superficie calefactada a 37⁰C. La transferencia se realizó canalizando el cuello uterino, previamente al cargado de los embriones en el catéter interno, que se introdujo en la cavidad uterina a través del catéter externo (*técnica after loading*). Todo el proceso se realizó de forma guiada por ecografía transabdominal. La guía externa se introdujo hasta que la punta atravesó justo el orificio cervical interno. Entonces, se retiró el catéter interno y el biólogo procedió a cargar los embriones elegidos, bajo la lupa y con la ayuda de una jeringa (Luer NORM-JECT[®] Tuberkulin, Henke-Sass Wolf, Germany). En las transferencias incluidas en este estudio participaron tres profesionales, y todos utilizaron la técnica de cargado con aire: en primer lugar, se cargó una columna con medio, seguido de una pequeña columna de aire. A continuación, se cargó la columna con los embriones, intentando que quedaran juntos si eran varios, y centrados. A esta columna le siguió otra de aire, y finalmente una columna con medio. Se trató que el volumen total de medio no superara los 0,2 ml.

Una vez cargado, se introdujo el catéter en la cavidad uterina a través de la guía externa, cerca del fondo pero evitando tocarlo. El catéter interno presenta unas líneas en color negro que le permiten al embriólogo determinar la profundidad de inserción. En todas las transferencias, el catéter se insertó hasta que sobresalió la primera marca a través de la guía. Entonces, se presionó el émbolo de la jeringa y se descargó el contenido del catéter en la cavidad uterina. En la mayor parte de los casos, pudo verse la burbuja de aire y líquido que rodeaba a los embriones en el monitor del ecógrafo, suponiendo que fue el lugar de deposición de los mismos. Aunque se asume que la distancia óptima para depositar los embriones es de 1.5 a 2 mm entre la punta del catéter y el fondo uterino, en la práctica clínica no se realiza una medida exacta. Una vez descargado, se retiró cuidadosamente el catéter y el embriólogo procedió a examinar su contenido bajo la lupa, para asegurarse de que los embriones se habían depositado correctamente en la cavidad uterina. En caso contrario, se repitió el cargado y la transferencia hasta que no se observaron embriones retenidos en el catéter. Los casos en los que se repitió la transferencia no se incluyeron en este estudio.

Una vez terminada la TE, la paciente abandonó el quirófano tras reposar unos minutos, sin indicaciones especiales en cuanto a su modo de vida. Durante 15 días después de la transferencia, se aportó Progesterona natural micronizada por vía intravaginal para dar apoyo a la fase lútea. El día 15 tras la transferencia, las pacientes realizaron un test de embarazo bioquímico midiendo los niveles de β -hCG en la primera orina de la mañana. A las 7 semanas, se corroboraría la evolución del embarazo mediante una ecografía ante la presencia de un saco embrionario y latido fetal positivo. La ausencia de latido evidenciaría un aborto. Las tasas de embarazo clínico (TEC) y de implantación (TI), así como la tasa de aborto, no se tuvieron en cuenta en este estudio.

El tiempo de realización de la técnica se midió con un cronómetro, iniciándolo desde que el catéter guía se situó en la salida del orificio cervical interno hasta que se depositaron los embriones y se retiró el catéter. Este intervalo refleja el tiempo de manipulación endometrial (TME). En el momento justo en el que el embriólogo sacó

los embriones del incubador y los cargó en el catéter, se inició de nuevo el cronómetro, que se detuvo cuando se depositaron los embriones en la cavidad uterina y se retiró el catéter (ICDE). Esta medida incluye el tiempo durante el que los embriones permanecieron en el catéter y fuera de las condiciones de incubación. También se tuvo en cuenta la diferencia entre ambos intervalos, que refleja el tiempo transcurrido desde que se situó el catéter en la cavidad uterina hasta que se inició la carga de los embriones en el catéter interno (Pre-ICDE).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS Statistics 17.0 (Chicago, Illinois). Los valores de las variables continuas se expresan como medias y sus errores estándar. Los valores de las variables discretas y categóricas se expresan como frecuencias absolutas y porcentajes. Las comparaciones entre las medias de los grupos en las variables continuas se realizaron mediante pruebas paramétricas (T-Student para muestras independientes), asumiendo que todas siguen una distribución Normal. Las relaciones entre las variables categóricas se contrastaron con la prueba no paramétrica Chi cuadrado de Pearson, aplicando la corrección por continuidad (corrección de Yates) en aquellos grupos con menos de 5 casos. Las relaciones entre las variables ordinales se contrastaron con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En todos los casos, se consideraron como estadísticamente significativos aquellos valores de p menores de 0,05.

4. RESULTADOS

Los resultados del análisis prospectivo llevado a cabo desde el 24 de Enero hasta el 13 de Marzo del 2014, incluyeron un total de 41 ciclos de FIV/ICSI-TE. La edad media de las pacientes fue de $35\pm 0,5$ años, siendo la mínima 27 años y la máxima 40 años. Entre ellos, 29 (70,7%) fueron ciclos en fresco y en 12 (29,3%) se utilizaron embriones criopreservados. La tasa global de embarazo se situó en el 29,3%, con un total de 12 embarazos. Las tasas de embarazo en ciclos en fresco y en criopreservados fueron, respectivamente, del 27,6% y 33,3%. En el siguiente diagrama, se resumen los casos expresados como frecuencias absolutas y porcentajes (**Figura 5**):

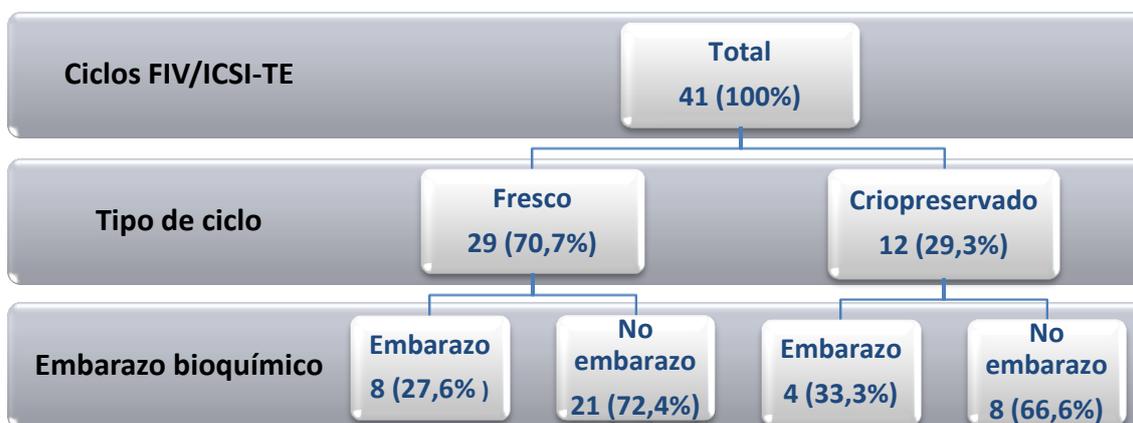
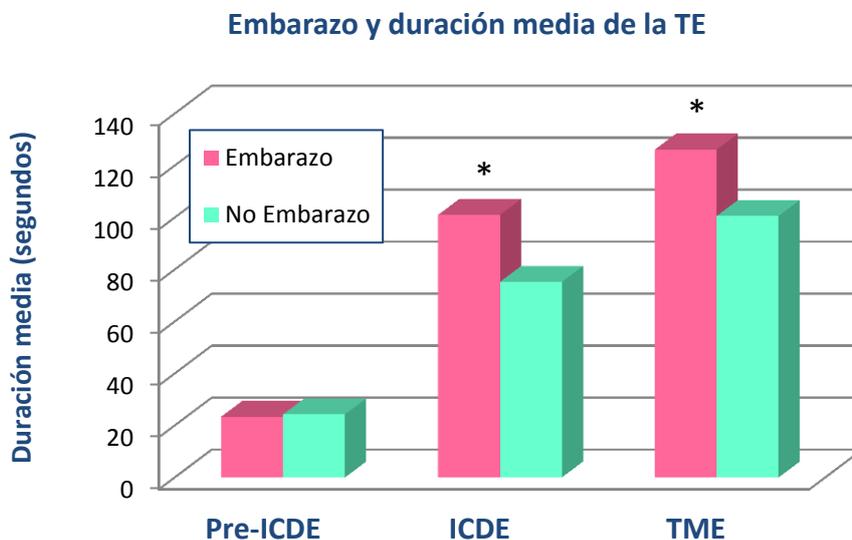


Figura 5. Distribución de la población de estudio según el tipo de ciclo y la consecución de la gestación.

La duración de la técnica de TE se dividió en tres intervalos: Pre-ICDE, ICDE y TME. Los tiempos promedio considerando todos los ciclos fueron de 24 ± 1 segundos, 83 ± 4 segundos y 108 ± 4 segundos, respectivamente. Los tiempos promedio en ciclos con embarazo bioquímico positivo fueron de 23 ± 1 segundos para el Pre-ICDE, 101 ± 10 segundos para el ICDE, y 126 ± 11 segundos para el TME. En los ciclos en los que no se consiguió el embarazo, los tiempos promedio fueron de 24 ± 2 segundos, 75 ± 3 segundos y 101 ± 3 segundos, respectivamente (**Figura 6**). Las diferencias observadas entre las medias de los ciclos en los que hubo embarazo y en los que no, tuvieron significación estadística para los intervalos ICDE y TME, con un p-valor de 0,030 y

0,038, respectivamente. Las diferencias observadas con respecto al Pre-ICDE no tuvieron, por el contrario, significación estadística.



* $P \leq 0,05$ con respecto al grupo "No embarazo"

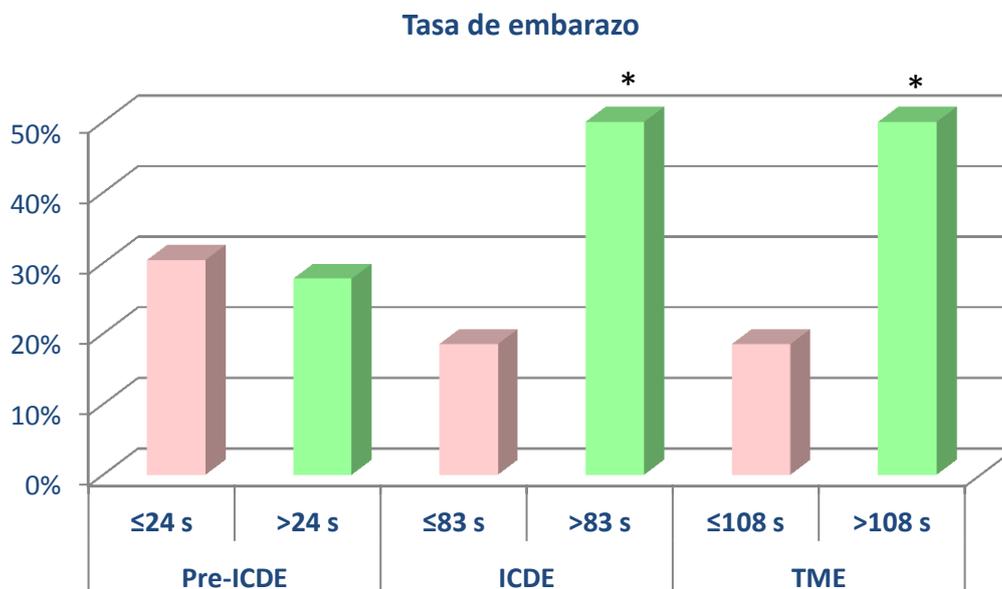
Figura 6. Duración media de Pre-ICDE, ICDE y TME en los grupos de embarazo y no embarazo.

Teniendo en cuenta la totalidad de los ciclos, en el 56,1% el Pre-ICDE tuvo una duración igual o inferior a la media, y en el 43,9% superior. El 65,9% de los ciclos se realizaron en un tiempo igual o inferior a la media para el ICDE y el TME, mientras que el 34,1% tuvieron una duración mayor. Para el intervalo de tiempo Pre-ICDE, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas cuando la duración estuvo por debajo o por encima de la media ($P \geq 0,05$). Para el ICDE y el TME, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de mujeres que consiguieron el embarazo y las que no, con un valor de p igual a 0,038 en ambos casos. La **Tabla III** muestra las frecuencias absolutas y el porcentaje de ciclos que resultaron en embarazo y los que no lo consiguieron dentro de cada intervalo, así como el correspondiente valor de p :

Tabla III. Número y proporción de casos de embarazo, no embarazo y total en los grupos de Pre-ICDE, ICDE y TME según su duración media.

		Embarazo	No Embarazo	TOTAL	p-valor
Pre-ICDE	≤24 s	7 (30,4%)	16 (69,6%)	23 (56,1%)	0,855
	>24 s	5 (27,8%)	13 (72,2%)	18 (43,9%)	
ICDE	≤83 s	5 (18,5%)	22 (81,5%)	27 (65,9%)	0,038
	>83 s	7 (50,0%)	7 (50,0%)	14 (34,1%)	
TME	≤108 s	5 (18,5%)	22 (81,5%)	27 (65,9%)	0,038
	>108 s	7 (50,0%)	7 (50,0%)	14 (34,1%)	
TOTAL		12 (29,3%)	29 (70,7%)	41 (100%)	

Considerando cada intervalo por separado, la tasa de embarazo cuando el Pre-ICDE fue menor o igual a 24 segundos fue del 30,4%, y del 27,8% cuando este tiempo fue mayor. En el caso del ICDE, la tasa de embarazo fue del 18,5% en intervalos menores o iguales a 83 segundos, y del 50,0% en intervalos mayores. Con TME menores o iguales a 108 segundos, la tasa de embarazo también fue del 18,5%, y del 50,0% en duraciones mayores (**Figura 7**).

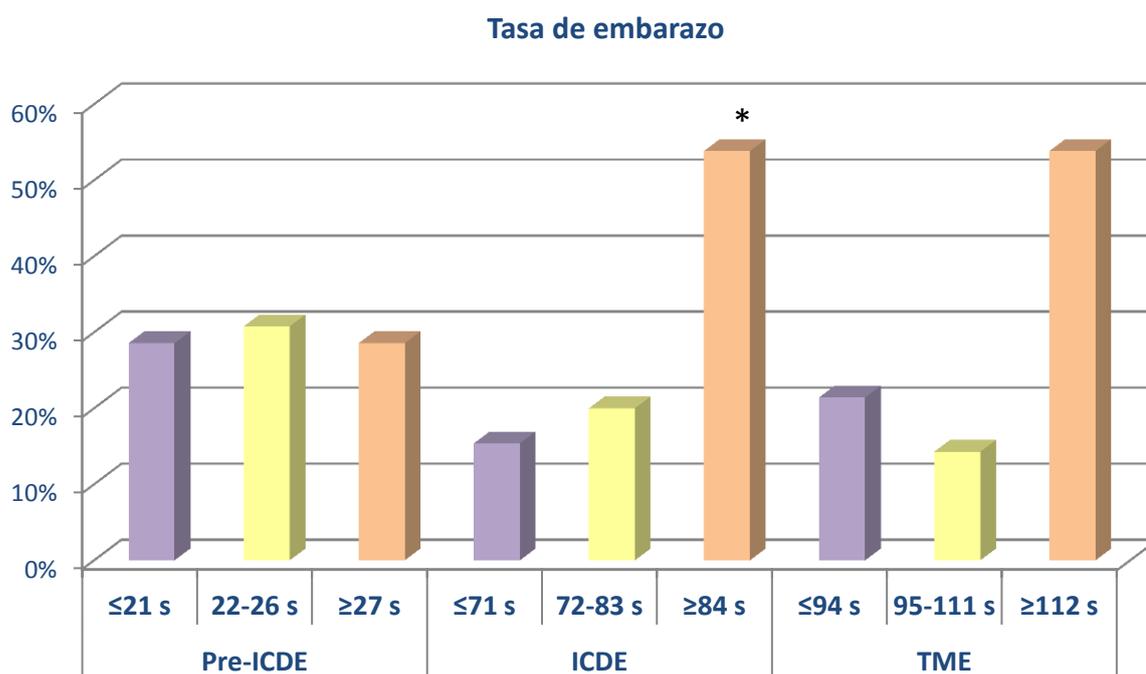


* $P \leq 0,05$ con respecto a los grupos "ICDE≤83s" y "TME≤108s"

Figura 7. TEB para Pre-ICDE, ICDE y TME distribuidos en función de la media global.

Los intervalos Pre-ICDE, ICDE y TME también se dividieron en percentiles para comprobar si existía, asimismo, una relación con la tasa de embarazo. Dentro de la categoría Pre-ICDE, el 34,1% de las transferencias se realizaron en un tiempo menor o igual a 21 segundos, el 31,7% entre 22 y 26 segundos, y el 34,1% restante en 27 segundos o más. En cuanto al ICDE, el 31,7% de los casos tuvieron duración menor o igual a 71 segundos, el 36,6% entre 72 y 86 segundos, y otro 31,7% se alargaron 84 segundos o más. El 34,1% de los casos en la categoría TME, tuvieron una duración menor o igual a 94 segundos, también un 34,1% duraron entre 95 y 111 segundos, y en un 31,7% se prologaron más de 112 segundos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres embarazadas y no embarazadas cuando el Pre-ICDE se dividió en tres percentiles. Las TEB fueron del 28,6% para los grupos de Pre-ICDE menor o igual a 21 segundos y mayor o igual a 27 segundos, y del 30,8% para aquellos casos en los que el intervalo duró entre 22 y 26 segundos. Para el ICDE, sí se observaron diferencias significativas entre mujeres embarazadas y no embarazadas en relación a los tres grupos ($P=0,033$). Con ICDE menor o igual a 71 segundos, la TEB fue del 15,4%, del 20,0% para el grupo de entre 72 y 83 segundos, y del 53,8% cuando el ICDE superó los 84 segundos. Sin embargo, aunque existieron diferencias en las TEB cuando el TME se dividió en tres intervalos, estas no tuvieron significación estadística. Con duración menor o igual a 94 segundos, la TEB fue del 21,4%. Con TME entre 95 y 111 segundos, la TEB descendió al 14,3%, alcanzando el 53,8% para tiempos mayores o iguales a 112 segundos (**Figura 8**).



* $P \leq 0,05$ con respecto a los grupos "ICDE≤71s" y "ICDE=72-83s"

Figura 8. TEB para Pre-ICDE, ICDE y TME distribuidos en percentiles.

La siguiente tabla muestra los resultados del embarazo bioquímico expresados como frecuencias absolutas y porcentajes de cada percentil dentro de las categorías Pre-ICDE, ICDE y TME, y sus respectivos valores de p:

Tabla IV. Número y proporción de casos de embarazo, no embarazo y total en los grupos de Pre-ICDE, ICDE y TME según su duración en percentiles.

		Embarazo	No Embarazo	TOTAL	p-valor
Pre-ICDE	≤21 s	4 (28,6%)	10 (71,4%)	14 (34,1%)	1
	22-26 s	4 (30,8%)	9 (69,2%)	13 (31,7%)	
	≥27 s	4 (28,6%)	10 (71,4%)	14 (34,1%)	
ICDE	≤71 s	2 (15,4%)	11 (84,6%)	13 (31,7%)	0,033
	72-83 s	3 (20,0%)	12 (80,0%)	15 (36,6%)	
	≥84 s	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13 (31,7%)	
TME	≤94 s	3 (21,4%)	11 (37,9%)	14 (34,1%)	0,094
	95-111 s	2 (14,3%)	12 (41,4%)	14 (34,1%)	
	≥112 s	7 (53,8%)	6 (20,7%)	13 (31,7%)	
TOTAL		12 (29,3%)	29 (70,7%)	41 (100%)	

Para cumplir otros objetivos del estudio, se contrastó la duración de los intervalos Pre-ICDE, ICDE y TME entre ciclos en fresco y criopreservados. En los ciclos en fresco, las duraciones promedio fueron de 24 ± 2 segundos para el Pre-ICDE, 82 ± 5 segundos para el ICDE, y 107 ± 5 segundos para el TME. En los ciclos criopreservados, estas duraciones fueron de 23 ± 1 segundos, 86 ± 7 segundos, y 111 ± 7 segundos, respectivamente (**Figura 9**). No se observaron diferencias significativas en la duración media en ninguno de los tres intervalos entre ciclos en fresco y criopreservados.

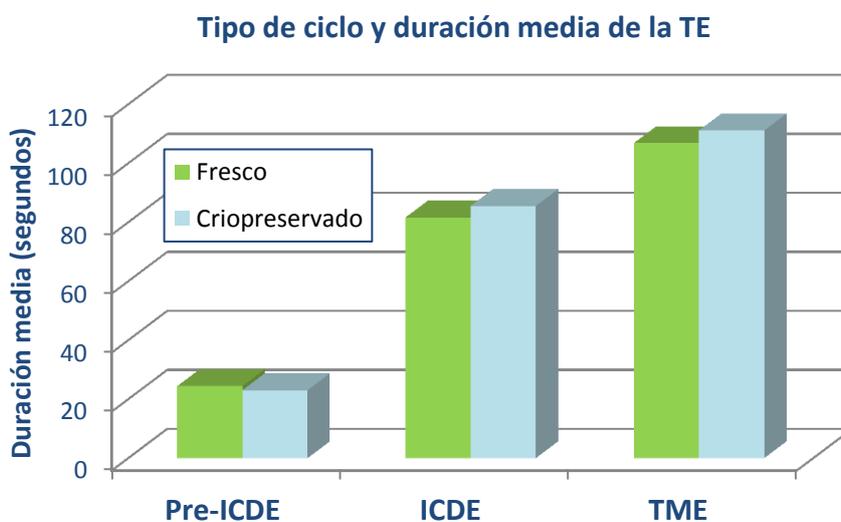


Figura 9. Duración media de Pre-ICDE, ICDE y TME en los grupos de ciclos en fresco y criopreservados.

Además, se buscó una posible relación entre otros factores y la TEB:

Edad de la paciente, niveles de Progesterona y Estradiol, y grosor endometrial

La edad media de las pacientes en ciclos con embarazo y sin embarazo tomó valores similares de $35,0\pm 0,6$ años y $34,7\pm 0,7$ años sin diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias entre los niveles de Progesterona y el último Estradiol tampoco resultaron significativas. En los ciclos en los que se consiguió embarazo, los niveles promedio del último Estradiol fueron de $1286,1\pm 147,8$ pg/ml, mientras que los ciclos de mujeres no embarazadas presentaron niveles promedio mayores ($1757,3\pm 602,2$ pg/ml).

El grosor endometrial sólo se comparó entre los grupos de embarazo y no embarazo con TE en fresco, ya que todos los ciclos con embriones criopreservados

presentaron endometrios mayores de 8 mm. Aunque el grosor endometrial promedio fue menor en los casos en los que se consiguió la gestación, las diferencias no tuvieron significación estadística.

Las medias, sus errores estándar (ESM), y número de casos dentro de cada grupo y en total (N) se recogen en la siguiente tabla, así como los valores de p asociados:

Tabla V. Relación entre la edad de la paciente, los niveles de Progesterona y Estradiol, y el grosor endometrial con el embarazo.

Factor	Embarazo	N	Media	ESM	p-valor
Edad de la paciente (años)	Si	12	35,0	0,6	0,802
	No	29	34,7	0,7	
	Total	41	34,8	0,5	
Progesterona (ng/ml)	Si	7	0,8	0,1	0,363
	No	20	0,9	0,1	
	Total	27	0,9	0,1	
Estradiol (pg/ml)	Si	8	1286,1	147,8	0,053
	No	21	1757,3	131,4	
	Total	29	1627,3	109,7	
Grosor endometrial en ciclos en fresco (mm)	Si	8	8,6	0,8	0,055
	No	21	10,5	0,5	
	Total	29	10,0	0,4	

Tipo de ciclo, calidad y número de embriones transferidos, y día de la TE

El 70,7% de las TE correspondieron a ciclos en fresco, mientras que el 29,3% restante fueron criotransferencias. La TEB obtenida en los ciclos en fresco fue del 27,6%, y del 33,3% en las criotransferencias, sin diferencias significativas.

La calidad embrionaria cuando se transfirió un único embrión, tampoco mostró diferencias significativas entre los ciclos que consiguieron el embarazo frente a los que no lo consiguieron. No obstante, el porcentaje de embarazos fue mayor cuando los embriones fueron de buena calidad (A o B según la clasificación de ASEBIR, con TEB del 50% y 25%, respectivamente).

Tal y como se observa en la **Tabla VI**, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes embarazadas y no embarazadas cuando se transfirió un único embrión o dos embriones.

En los ciclos en fresco, no se encontraron diferencias significativas entre las pacientes que consiguieron la gestación y las que no la consiguieron cuando la TE tuvo lugar en el día +2 de desarrollo o en el día +3. Las TEB resultantes fueron del 21,4% en TE en día +2, y del 33,3% en TE en día +3. Lo mismo ocurrió al considerar el día de la TE de los ciclos criopreservados, donde se alcanzó un 57,1% de embarazos con TE en día +4, y ningún embarazo al transferir en día +3 o +5, sin significación estadística.

En la siguiente tabla, se muestran los resultados del análisis de estos factores en relación al embarazo, expresados como frecuencias absolutas y porcentajes, con sus correspondientes valores de p:

Tabla VI. Relación entre el tipo de ciclo, la calidad embrionaria, el número de embriones transferidos y el día de la TE en fresco y criopreservados con el embarazo.

Factor	Categoría	Embarazo	Frecuencia absoluta	Porcentaje	p-valor
Tipo de ciclo	Fresco	Si	8	27,6%	1
		No	21	72,4%	
	Congelado	Si	4	33,3%	
		No	8	66,7%	
Calidad embrionaria (1 embrión)	A	Si	2	50,0%	0,33
		No	2	50,0%	
	B	Si	2	25,0%	
		No	6	75,0%	
	C	Si	0	0,0%	
		No	0	0,0%	
D	Si	0	0,0%		
	No	3	100,0%		
Embriones transferidos	1	Si	4	26,7%	0,784
		No	11	73,3%	
	2	Si	8	66,7%	
		No	18	62,1%	
Día de la TE en fresco	2	Si	3	21,4%	0,481
		No	11	78,6%	
	3	Si	5	33,3%	
		No	10	66,7%	
Día de la TE en criopreservados	3	Si	0	0,0%	0,245
		No	4	100,0%	
	4	Si	4	57,1%	
		No	3	42,9%	
	5	Si	0	0,0%	
		No	1	100,0%	

Uso del fiador, personal que realiza la TE, y tratamiento hormonal

La TEB cuando se utilizó el catéter Cook Sydney IVF® con ayuda del fiador, fue mayor a cuando no se requirió su uso (40,0% en TE con fiador, frente al 27,8% sin fiador). Sin embargo, las diferencias observadas no tuvieron significación estadística.

Cuando las transferencias fueron realizadas por los dos ginecólogos de la Unidad de Reproducción del HUCA, las tasas de embarazo fueron del 34,6% y del 16,7%. Cuando se tuvieron en cuenta sólo las TE realizadas por el personal en prácticas, la proporción de embarazos fue del 22,2%. Estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas.

En el caso del personal que realizó la carga y descarga del catéter con los embriones, las tasas de embarazo fueron del 24,0%, 20,0% y 66,7% para los tres profesionales. El p-valor obtenido tuvo un valor mayor a 0,005, por lo que estas proporciones tampoco se consideraron significativamente diferentes.

Todos los ciclos de criotransferencia siguieron los mismos protocolos de preparación endometrial, mediante un tratamiento sustitutivo con Estrógenos y Progesterona exógenos. La posible relación entre el tratamiento hormonal y la posibilidad de gestación se contrastó entre los grupos de ciclos con Agonistas y los ciclos con Antagonistas. Los porcentajes de embarazos en cada grupo fueron del 33,3% y 26,90%, respectivamente. Las diferencias entre ambos tampoco fueron significativas.

La **Tabla VII** muestra las frecuencias absolutas y porcentajes de cada uno de estos factores en relación a la consecución del embarazo, con sus correspondientes valores de p:

Tabla VII. Relación entre el uso/no uso del fiador del catéter, el ginecólogo/a y embriólogo/a que participaron en la TE, y el tratamiento hormonal de los ciclos en fresco con el embarazo.

Factor	Categoría	Embarazo	Frecuencia absoluta	Porcentaje	p-valor
Uso del fiador	Cook Sydney IVF®	Si	10	27,8%	0,969
		No	26	72,2%	
	Cook Sydney IVF® + fiador	Si	2	40,0%	
		No	3	60,0%	
Ginecólogo/a	Ginecólogo/a 1	Si	9	34,6%	0,596
		No	17	65,4%	
	Ginecólogo/a 2	Si	1	16,7%	
		No	5	83,3%	
	Otros	Si	2	22,2%	
		No	7	77,8%	
Embriólogo/a	Embriólogo/a 1	Si	6	24,0%	0,091
		No	19	76,0%	
	Embriólogo/a 2	Si	2	20,0%	
		No	8	80,0%	
	Embriólogo/a 3	Si	4	66,7%	
		No	2	33,3%	
Tratamiento hormonal	Agonista	Si	1	33,3%	1
		No	2	66,7%	
	Antagonista	Si	7	26,90%	
		No	19	73,10%	

5. DISCUSIÓN

La consecución del embarazo en los ciclos de FIV/ICSI-TE está claramente relacionada con factores como la edad materna, el número de embriones transferidos, y la calidad de los mismos, junto con un endometrio receptivo (*van Loendersloot y cols.*, 2010). Aunque se conoce que existen muchos otros factores implicados, su papel no está del todo claro y resulta difícil de determinar.

En los últimos años, la técnica de la TE pasó a tener mucha importancia como factor determinante del éxito en la implantación embrionaria. Constituye el último paso en la aplicación de las TRA como tratamiento de la infertilidad, y de su éxito depende que los procesos realizados previamente culminen en una gestación. Son muchos los aspectos que deben considerarse a la hora de realizar este proceso, como el tipo de catéter, la técnica de cargado del mismo, el posicionamiento del catéter en la cavidad uterina, o la presencia de sangre en el catéter, entre otros. Estudios recientes muestran que la duración de la transferencia, medida desde que se cargan los embriones en el catéter hasta que se depositan en la cavidad uterina, podría relacionarse con el éxito de la implantación embrionaria en los ciclos de FIV/ICSI-TE. Matorras y cols. (2004), fueron los primeros en plantear esta hipótesis, y concluyen de sus estudios que el tiempo transcurrido entre la carga y descarga es un factor predictivo del éxito de la FIV, de forma que a medida que aumenta este intervalo se obtienen menores TEC y TI. Posteriormente, se hicieron otros estudios que apoyan estos resultados, especialmente en mujeres mayores de 35 años (*Cetin y cols.*, 2010). Sin embargo, Ciray y cols. (2007), no encuentran diferencias significativas en las TEC y TI en relación a la duración de las transferencias, cuando se transfieren embriones de buena calidad.

Los resultados del presente estudio no concuerdan con los obtenidos por Matorras y cols. ni por otros investigadores que lo apoyan. Así, se observa que la duración media de la TE (ICDE) es mayor en el grupo de pacientes que consiguieron el embarazo (101 ± 35 segundos), frente al grupo de pacientes que no lo consiguieron (75 ± 16 segundos) y a la media total teniendo en cuenta ambos grupos (83 ± 26

segundos). Estas diferencias tienen significación estadística, por lo que se puede decir que existe una relación entre el ICDE y la tasa de embarazo, de forma que a medida que aumenta la duración de la TE, aumenta la posibilidad de conseguir la gestación. El intervalo transcurrido desde la canalización del endometrio hasta el inicio del cargado del catéter (Pre-ICDE) no mostró, sin embargo, diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio. Este tiempo es un simple reflejo de cuánto tarda el embriólogo en identificar los embriones de la paciente en el incubador y llevarlos hasta la cabina de flujo laminar, donde realiza el cargado de los mismos en el catéter. Los embriones de cada paciente son localizados e identificados rigurosamente a lo largo de todo el proceso de FIV/ICSI, por lo que las variaciones durante las TE en el Pre-ICDE son mínimas. No parece ser, por lo tanto, una variable de interés a la hora de predecir los resultados de los ciclos de FIV/ICSI-TE.

Para ajustar más la duración óptima de la TE a la hora de buscar la gestación, se dividieron los ciclos en grupos de ICDE tomando como referencia la media, y posteriormente en tres percentiles. Cuando el ICDE es mayor a 83 segundos, la tasa de embarazo aumenta significativamente hasta el 50,0%, frente al 18,5% cuando este intervalo de tiempo es inferior. Concretamente, las mayores tasas de embarazo (53,8%) se observan cuando el ICDE está por encima de 84 segundos.

Cuando la gestación se produce de forma natural, los embriones se desarrollan en un entorno óptimo dentro del tracto reproductivo de la madre. Cualquier variación en estas condiciones puede tener como consecuencia el fallo en la implantación, ya que el ambiente tras la fertilización es un factor determinante de la calidad embrionaria (*Gad y cols.*, 2012). Por eso, los sistemas de cultivo y las condiciones del laboratorio de FIV se controlan rigurosamente, intentando imitar esas condiciones naturales. Los medios de cultivo están preparados para ofrecer los sustratos energéticos adecuados para cada estadio de desarrollo, y tratan de mantener el pH intracelular dentro del rango óptimo para asegurar que los procesos celulares ocurran de forma controlada. La incorporación de sustancias a los medios de cultivo como tampones, sales o iones, es objeto de muchos estudios, y se busca evitar el estrés de los embriones en desarrollo en la medida de lo posible. La temperatura y CO₂ del

incubador son muy importantes, y se relacionan de forma inversa con el pH extracelular, que controla, a su vez, el pH intracelular (*Behr y Wang, 2004*). Durante el ICDE, los embriones permanecen en el catéter, expuestos a ciertas condiciones ambientales diferentes a las del cultivo, como la luz, la temperatura, los compuestos volátiles e incluso los materiales que componen el catéter (*Matorras y cols., 2004*). Estas variaciones son difíciles de controlar, y aunque sus efectos no son aún del todo conocidos, pueden ser negativos en cuanto al desarrollo y potencial implantatorio de los embriones. Las mejoras en la calidad de los sistemas y medios de cultivo pueden compensar estos efectos, de forma que reducen la influencia de la duración de la TE en el éxito de la implantación. Se necesitan estudios prospectivos controlados que permitan determinar los factores ambientales que afectan a la expresión génica embrionaria, y por lo tanto a su capacidad de desarrollo e implantación.

De acuerdo con el estudio llevado a cabo por Matorras y cols. en 2004, las mayores tasas de embarazo se relacionan con ICDE cortos, menores de 30 segundos. A medida que aumenta la duración del ICDE, se observa un descenso de la tasa de embarazo. Esta correlación negativa es más acusada por encima de los 120 segundos de duración. El escaso número de muestras de nuestra población de estudio no permite establecer los mismos puntos de corte para los intervalos de tiempo, y no se incluye ningún caso con $ICDE \leq 30$ segundos, ni tampoco con $ICDE \geq 120$ segundos. Esto puede formar parte de la explicación a las diferencias en los resultados obtenidos respecto a los publicados por estos autores.

Sin embargo, Matorras y cols. (2004), no pudieron confirmar esa relación en todos los grupos de su estudio. Dentro de las transferencias dificultosas, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ICDE de ciclos que consiguieron embarazo y los que no lo consiguieron. Observaron que el ICDE promedio era mayor en los ciclos con embarazo clínico positivo, algo que no concuerda con su hipótesis. Los autores argumentan que se trata de un tamaño grupal demasiado pequeño, lo que puede ser equiparable a los resultados de nuestro estudio aunque se trate, en este caso, de transferencias fáciles en su totalidad.

Por otra parte, algunas condiciones de la técnica son diferentes, como la inclusión de ciclos de criopreservación en nuestro estudio. Esta podría ser, por si misma, una variable que influye el éxito de las TE. Aunque las diferencias en el porcentaje de embarazos entre ciclos en fresco y criopreservados no son significativas, se observa que dicho porcentaje es ligeramente superior en este último grupo. La tasa de embarazo en ciclos en fresco es del 27,6%, y asciende al 33,3% en las criotransferencias. Existen evidencias que indican que la receptividad endometrial se ve afectada en los ciclos en fresco por los tratamientos de estimulación ovárica. Esto conduce a fallos de implantación en una fase muy temprana, lo que conlleva a un descenso en las tasas de embarazo (*Liu y cols., 2014*). Los estudios actuales demuestran que la exposición embrionaria a las bajas temperaturas durante la criopreservación no afecta negativamente a los resultados, y que incluso se pueden mejorar las TI y TEC con ciclos de TE post-vitrificación. Esto puede relacionarse con una mejor sincronización entre el embrión y el endometrio en los ciclos de preparación endometrial (*Roque y cols., 2013*).

Está ampliamente aceptado que la calidad embrionaria es un factor determinante del éxito de los ciclos de FIV/ICSI. Aunque las diferencias entre los grupos de pacientes con embarazo y sin embarazo no resultaron estadísticamente significativas, se observa un mayor número de embarazos cuando se transfiere un embrión de buena calidad (A o B). La TEB cuando se transfirió un único embrión de calidad A, es del 50%, y del 25% cuando el embrión era de calidad B. Sin embargo, no se consiguió ningún embarazo cuando se transfirió un único embrión de calidad D. Los embriones de calidad óptima podrían verse menos perjudicados al ser expuestos a tiempos largos de TE, ya que parecen mostrarse más resistentes a las condiciones adversas que le puedan afectar, como los factores ambientales (*Ciray y cols., 2007*). Se necesitarían más estudios controlados para confirmar esta tendencia, así como para determinar las posibles características genéticas y metabólicas que les proporcionen esa resistencia.

La misma relación entre el ICDE y la tasa de embarazo, se observa si se tiene en cuenta el tiempo en el que el catéter permanece en la cavidad uterina (TME), con valor promedio de 126 ± 37 segundos en el grupo de pacientes con embarazo bioquímico positivo, frente a valores promedio de 101 ± 16 segundos y 108 ± 26 segundos en los grupos de embarazo negativo y al total, respectivamente. El TME es una medida del grado de perturbación al que se somete el endometrio durante la técnica. Evidentemente, el TME mantiene una estrecha relación con el ICDE, ya que la carga y descarga de los embriones en el catéter interno se realiza mientras el catéter guía permanece dentro del endometrio. Las tasas de embarazo en TME mayores o menores a 108 segundos, son las mismas que las observadas para el ICDE, con diferencias, asimismo, estadísticamente significativas respecto a los demás grupos. Cuando el TME supera los 112 segundos, se obtiene la TEB más alta, del 53,8%. Las diferencias en cuanto a las tasas de embarazo entre los intervalos de tiempo distribuidos por percentiles, sólo tuvieron significación estadística en el caso del ICDE, pero no en del TME. Esto sugiere que la duración de la TE, desde el cargado del catéter hasta la deposición de los embriones, tiene mayor influencia en la tasa de embarazo que el tiempo durante el que el catéter permanece dentro del endometrio.

En la literatura, muchos estudios afirman una correlación negativa entre la dificultad de la TE y sus posibilidades de éxito (*Tomas y cols., 2002; Mains y Van Voorhis, 2010; Singh y cols., 2012; Ghaffari y cols., 2013*). Las TE fáciles requieren una menor manipulación cervical, y suponen un menor grado de disrupción del endometrio. De esta forma, podrían reducirse las contracciones uterinas al no estimular la liberación de Prostaglandinas y Oxitocina (*Mains y Van Voorhis, 2010*). Además, la fuerza aplicada al atravesar el canal cervical en transferencias dificultosas, se asocia frecuentemente con la contaminación del catéter con moco y/o sangre. Aunque no existe acuerdo entre los autores, algunos sostienen que los embriones podrían, de esta forma, quedar retenidos en el catéter durante la TE, y podría comprometerse la implantación por la introducción de sangre en la cavidad uterina (*Ghaffari y cols., 2013*). En nuestra población de estudio, todas las TE se consideraron fáciles, por lo que se supone que existe una menor incidencia de los factores que

afectan negativamente a la tasa de embarazo en las transferencias dificultosas, independientemente del tiempo durante el que el catéter permanece dentro de la cavidad uterina.

Además de la facilidad de las TE, en nuestro estudio existen otros aspectos de la técnica que podrían ser responsables de que el TME pierda relevancia en las tasas de embarazo. El uso de un catéter suave y ecogénico, junto con la guía ecográfica, permiten mejorar los resultados al facilitar la canalización y el depósito de los embriones, y disminuir la manipulación del endometrio (*Schoolcraft y cols, 2001; Buckett, 2006; Mains y Van Voorhis, 2010*). La realización de un test de transferencia previo al día de la verdadera TE, permite conocer las características anatómicas de la cavidad uterina y del canal cervical, facilitando al ginecólogo la realización de la técnica de forma menos traumática. Además, la introducción del catéter interno cargado a través del catéter externo (técnica *after loading*), podría disminuir la contaminación del catéter con moco cervical, aunque no se han demostrado diferencias en los resultados frente a la transferencia directa con el catéter ya cargado (*Mains y Van Voorhis, 2010; Yilmaz y cols., 2013*). Estos aspectos de la técnica, junto con otras variables relacionadas con el éxito de los ciclos de FIV/ICSI-TE como la calidad embrionaria, grosor endometrial, edad de la paciente, etc., podrían estar relacionados con los resultados obtenidos, independientemente de una larga duración del procedimiento.

El análisis de los resultados no muestra relación entre la duración de la TE y de la manipulación endometrial con el tipo de ciclo (en fresco o criopreservado). A pesar de que la duración media del ICDE y del TME es ligeramente superior en los ciclos de embriones criopreservados, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

El análisis de la influencia de otros factores en la TEB, no permite establecer ninguna relación, ya que las diferencias observadas no son significativas en ninguno de los casos. Se necesitan futuros estudios estandarizados y aleatorizados para sacar conclusiones consistentes. No obstante, se observan ciertas tendencias a la hora de analizar la proporción de embarazos positivos y negativos dentro de algunos grupos de pacientes.

La edad de la paciente no resulta ser una variable predictiva del éxito de la TE en nuestro estudio. Los resultados no se corresponden con otros trabajos publicados, donde demuestran que la TEC en ciclos de FIV/ICSI-TE disminuye significativamente a medida que aumenta la edad de la mujer. Esto se relaciona, muy probablemente, con la disminución de la RO que experimentan las mujeres a partir de los 35 años y, especialmente, a partir de los 38 años (*Cetin y cols., 2010; Sociedad Española de Fertilidad, 2012*). Otros factores relacionados con el embarazo, con evidencias que lo demuestran en los estudios publicados, son el número de embriones transferidos y la calidad de los mismos. Estos factores son, a su vez, tiempo-dependientes, ya que a medida que aumenta la edad materna disminuye el número y calidad de los embriones resultantes (*Cetin y cols., 2010*). Como se ha comentado previamente, aunque nuestros resultados no muestran diferencias significativas en las tasas de embarazo con respecto a la calidad embrionaria, se observa un mayor número de gestaciones cuando se transfieren embriones de buena calidad. Esta tendencia al aumento en la proporción de embarazos, también se refleja cuando se transfiere selectivamente un único embrión en lugar de dos.

La estimulación ovárica realizada durante los tratamientos de FIV altera los niveles normales de las hormonas, de forma que podría influir en la morfología y funcionalidad del endometrio, y por lo tanto en su receptividad (*Bosch y cols., 2010; Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013*). Algunos estudios apoyan que el aumento prematuro de los niveles de Progesterona previos al pico de hCG se refleja en menores TEC en los ciclos de FIV (*Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013*). En concreto, concentraciones de Progesterona >1.5 ng/ml en plasma se asocian con un descenso en las tasas de embarazo a término en ciclos de FIV con Agonistas y Antagonistas de la GnRH (*Bosch y cols., 2010*). Esto se debe probablemente a la desincronización del estado madurativo del endometrio frente al desarrollo embrionario. Los niveles altos de Progesterona, o niveles altos de Estradiol junto con el aumento previo de la Progesterona el día de la administración de la hCG, se relacionan con fallos de implantación y tasas de embarazo ectópico significativamente mayores. En estos casos, los embriones deberían ser criopreservados y posponer su transferencia a otro

ciclo para aumentar las probabilidades de éxito (*Wu y cols., 2012*). Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre los valores de Progesterona y el último Estradiol entre los ciclos con y sin gestación, por lo que ninguno de los dos factores tiene un carácter predictivo del éxito de los tratamientos de FIV/ICSI.

El grosor y estructura del endometrio son fundamentales para su receptividad y, por lo tanto, para la implantación embrionaria. En general, el aumento en el grosor endometrial se correlaciona con mayores tasas de embarazo (*Aydin y cols., 2013*). En nuestro estudio, las diferencias entre los ciclos que consiguieron el embarazo y los que no lo consiguieron tampoco son significativas, y curiosamente la media es superior en estos casos. De todas formas, el promedio en los ciclos que consiguieron el embarazo se encuentra entre 7 y 14 milímetros el día de la administración de la hCG, tal y como se esperaba de acuerdo a la bibliografía (*Casper, 2011; Aydin y cols., 2013*). En un estudio reciente, los autores concluyen que el valor predictivo del éxito en los ciclos FIV/ICSI-TE del espesor endometrial y el de su patrón ecogénico son independientes, y el patrón “triple línea” sólo se asocia con mejores resultados cuando el endometrio mide entre 7 y 14 milímetros (*Zhao y cols., 2012*).

De acuerdo con estudios publicados, el día que se realiza la transferencia en ciclos en fresco no parece influir en el resultado final a la hora de buscar la gestación. (*Bastu y cols., 2013*). En los ciclos de embriones criopreservados, se obtienen mejores resultados cuando se vitrifican el día +3 de desarrollo frente al día +2, especialmente en mujeres con respuesta ovárica pobre (*Chi y cols., 2013*). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estos supuestos, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de embarazos cuando la TE tuvo lugar en día +2 y +3 (ciclos en fresco), o en día +3, +4 y +5 (criotransferencias), pero sí se observó un porcentaje de embarazos mucho mayor cuando la TE se realizó en día +4, es decir, cuando se vitrificaron los embriones en día +3 de desarrollo.

En el presente estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las TEB en ciclos en los que se utilizó el catéter Cook Sydney IVF® solo y en los que se utilizó con fiador. Curiosamente, el porcentaje de embarazos resultó mayor en el grupo de TE con el fiador (40%, frente al 27,8% en el grupo en el

que no se usó fiador). El fiador no es totalmente rígido, adaptándose a la forma del canal, y no parece tener efectos negativos en el éxito de la TE según algunas publicaciones. No obstante, debe evitarse en la medida de lo posible, y no introducirlo hasta la cavidad uterina para evitar la estimulación de contracciones (*Mains y Van Voorhis, 2010*). Otros estudios sostienen que el uso del fiador tiene un efecto perjudicial, ya que probablemente aumenta el riesgo de introducir moco y sangre en la cavidad uterina, con un efecto negativo en la implantación y aumentando la posibilidad de que los embriones queden retenidos en el catéter. Estos supuestos son aún controvertidos, y generan discusión entre los autores (*Spitzer y cols., 2013*).

No existe consenso a la hora de determinar la influencia del personal que realiza la técnica de TE en los resultados de la misma. Algunos estudios no encontraron diferencias en las proporciones de embarazos conseguidas por los distintos profesionales con experiencia equiparable (*van Weering y cols., 2005*). Sin embargo, otros autores encontraron una relación entre las tasas de embarazo conseguidas de manera individual por cada profesional y su experiencia en la técnica (*Uyar y cols., 2011*). En base a los resultados de nuestro estudio, a pesar de las diferencias en la proporción de embarazos resultantes cuando la técnica fue realizada por uno u otro ginecólogo/a, no se puede establecer una relación entre este factor y el éxito de los ciclos FIV/ICSI-TE. Así, la experiencia del personal que realiza la TE no parece ser importante a la hora de predecir sus resultados. Esto se observa, asimismo, cuando se analizan las diferencias en las TEB obtenidas entre los profesionales que realizan la carga y descarga del catéter.

De acuerdo con otros resultados publicados, nuestro estudio sugiere que el uso de un protocolo de estimulación con Agonistas de la GnRH o con Antagonistas, no influye en el éxito final de los ciclos de FIV/ICSI-TE. No obstante, es importante destacar el beneficio de los protocolos con Antagonistas ante riesgo de SHEO, al permitir el desencadenamiento de la ovulación con Agonista de la GnRH en lugar de hCG (*Check y cols., 2013*).

6. CONCLUSIONES

En base a lo expuesto anteriormente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La duración de la TE influye en la tasa de embarazo, de forma que a medida que aumenta el ICDE, se incrementa la posibilidad de conseguir la gestación. En nuestro estudio, la duración de la TE por encima de 84 segundos se relaciona de forma positiva con la tasa de embarazo.

2. El TME no tiene una influencia importante en la tasa de embarazo. En el caso de existir, la mayor proporción de embarazos se conseguirían con TME por encima de 108 segundos.

3. Los ciclos en fresco y criopreservados no difieren en cuanto a la duración de la técnica de TE.

4. En nuestro estudio, los factores: edad de la paciente, calidad embrionaria, número de embriones transferidos, día de la transferencia, niveles de Progesterona y Estradiol, grosor endometrial, tipo de ciclo, uso del fiador, tratamiento hormonal, y personal que realiza la técnica, no tienen valor predictivo del éxito de los ciclos FIV/ICSI-TE.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-Setta A, Al-Inany H, Mansour R, Serour G, Aboulghar M. Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2005;20:3114–21.
2. Abou-Setta A. Air fluid versus fluid-only models of embryo catheter loading: A systematic review and meta-analysis. *Reprod BioMed Online.* 2007;14:80–4.
3. ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. [Internet]. 2008. [Citado 15 Marzo 2014]. Disponible en: <http://asebir.com/es/actividad-asebir/publicaciones/cuaderno-asebir/cuaderno-de-embriologia-clinica-criterios-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/>
4. Aydin T, Kara M, Nurettin T. Relationship between Endometrial Thickness and In Vitro Fertilization-Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome. *Int J Fertil Steril.* 2013;7(1):29-34.
5. Bastu E, Celik C, Keskin G, Buyru F. Evaluation of embryo transfer time (day 2 vs day 3) after imposed single embryo transfer legislation: when to transfer?. *J Obstet Gynaecol.* 2013;33(4):387-90.
6. Behr B, Wang H. Effects of culture conditions on IVF outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;1:115.
7. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum. Reprod.* 2010;25:2092–2100.
8. Brown J, Buckingham K, About-Setta A, Buckett W. Ultrasound versus “clinical touch” for catheter guidance during embryo transfer in women. *The Cochrane Database Syst Rev.* 2010;20(1):CD006107.
9. Buckett W. A meta-analysis of ultrasound-guided versus clinical touch embryo transfer. *Fertil Steril.* 2003;80:1037–41.

10. Buckett W. A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertil Steril*. 2006;85:728–34.
11. Casper R. It's time to pay attention to the endometrium. *Fertil Steril*. 2011;96:519-21.
12. Cenksoy P, Fıçıcıoğlu C, Yeşiladali M, Akcin O, Kaspar C. The importance of the length of uterine cavity, the position of the tip of the inner catheter and the distance between the fundal endometrial surface and the air bubbles as determinants of the pregnancy rate in IVF cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;172:46-50.
13. Cetin M, Kumtepe Y, Kiran H, Seydaoglu G. Factors affecting pregnancy in IVF: age and duration of embryo transfer. *Reprod BioMed Online*. 2010;20:380–386.
14. Check J, Choe J, Cohen R, Wilson C. A study to determine the efficacy of controlled ovarian hyperstimulation regimen using a gonadotropin releasing hormone agonist versus antagonist in women of advanced reproductive age with varying degrees of oocyte reserve on outcome following in vitro fertilization-embryo transfer. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2013;40(2):191-2.
15. Chi F, Luo C, Yin P, Hong L, Ruan J, Huang M, Duan T, Tong G. Vitrification of day 3 cleavage-stage embryos yields better clinical outcome in comparison with vitrification of day 2 cleavage-stage embryos. *Zygote*. 2013;22:1-8.
16. Ciray H, Tosun S, Hacifazlıoğlu O, Mesut A, Bahceci M. Prolonged duration of transfer does not affect outcome in cycles with good embryo quality. *Fertil Steril*. 2007;87:1218–21.
17. Coroleu B, Barri P, Carreras O, Belil I, Buxaderas R, Veiga A, Balasch J. Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod*. 2006;21(7):1809-15.
18. Craciunas L, Tsampras N, Fitzgerald C. Cervical mucus removal before embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2014;(14):00095-8.

19. Edgell T, Rombauts L, Salamonsen L. Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(5):486-96.
20. Eytan O, Elad D, Jaffa AJ. Evaluation of the embryo transfer protocol by a laboratory model of the uterus. *Fertil Steril*. 2007;88:485–93.
21. Fatemi H, Popovic-Todorovic B. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(5):530-8.
22. Flisser E, Grifo J. Is what we clearly see really so obvious? Ultrasonography and transcervical embryo transfer—a review. *Fertil Steril*. 2007;87:1–5.
23. Gad A, Schellander K, Hoelker M, Tesfaye D. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. *Anim Reprod Sci*. 2012;134:76-83.
24. Ghaffari F, Kiani K, Bahmanabadi A, Akhoond M2. Comparison of easy and difficult embryo transfer outcomes in in vitro fertilization cycles. *Int J Fertil Steril*. 2013;6(4):232-7.
25. Royalty Free Stock Photos, Vectors and Illustrations. Vector-Early Human Development. [Internet]. [Citado 20 Abril 2014]. Disponible en: http://www.123rf.com/photo_11578745_early-human-development.html
26. Kamel R, y cols. Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil*. 2013;14(3):96-109.
27. Karande V, Hazlett D, Vietzke M, Gleicher N. A prospective randomized comparison of the Wallace catheter and the Cook Echo-Tip[®] catheter for ultrasound-guided embryo transfer. *Fertil Steril*. 2002;77(4):826-30.
28. Katariya KO, Bates GW, Robinson RD, Arthur NJ, Propst AM. Does the timing of mock embryo transfer affect in vitro fertilization implantation and pregnancy rates?. *Fertil Steril*. 2007;88:1462–4.
29. Koot Y, Teklenburg G, Salker M, Brosens J, Macklon N. Molecular aspects of implantation failure. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(12):1943-50.
30. Kovacs P, Sajgo A, Rarosi F, Kaali S. Does it really matter how far from the fundus embryos are transferred?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;162:62–66.

31. Lambers M, Dogan E, Kosteljik H, Lens J, Schats R, Hompes PGA. Ultrasonographic-guided embryo transfer does not enhance pregnancy rates compared with embryo transfer based on previous uterine length measurement. *Fertil Steril.* 2006; 86:867–72.
32. Levi Setti P, Albani E, Cavagna M, Bulletti C, Colombo G, Negri L. The Impact of Embryo Transfer on Implantation—A Review. *Placenta.* 2003;24:S20–S26.
33. Liu L, Tong X, Jiang L, Li T, Zhou F, Zhang S. A comparison of implantation, miscarriage and pregnancy rates of single and double day 3 embryo transfer between fresh and frozen thawed transfer cycles: a retrospective study. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(5):911-5.
34. Madani T, Ashrafi M, Jahangiri N, Abadi A, Lankarani N. Improvement of pregnancy rate by modification of embryo transfer technique: a randomized clinical trial. *Fertil Steril.* 2010;94:2424–6.
35. Mains L, Van Voorhis B. Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertil Steril.* 2010;94:785–90.
36. Mansour R, Aboulghar M, Serour G. Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1990; 54:678–81.
37. Matorras R, Mendoza R, Exposito A, Rodriguez-Escudero F. Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. *Hum. Reprod.* 2004;19(9), 2027–2030.
38. Moore K, Persaud T. Embriología clínica. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
39. Nabi A, Awonuga A, Birch H, Barlow S, Stewart B. Multiple attempts at embryo transfer: does this affect in-vitro fertilization treatment outcome?. *Hum Reprod.* 1997;12:1188–90.
40. Phillips J, Martins W, Nastri C, Raine-Fenning N. Difficult embryo transfers or blood on catheter and assisted reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(2):121-8.
41. Rohen J, Lütjen-Drecoll E. Embriología funcional: una perspectiva desde la Biología del Desarrollo. 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.

42. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, Checa M. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99(1):156-62.
43. Saldeen P, Abou-Setta A, Bergh T, Sundström P, Holte J. A prospective randomized controlled trial comparing two embryo transfer catheters in an ART program. *Fertil Steril*. 2008;90(3):599-603.
44. Sallam H, Agameya A, Rahman A, Ezzeldin F, Sallam A. Impact of technical difficulties, choice of catheter, and the presence of blood on the success of embryotransfer—experience from a single provider. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20:135–42.
45. Sallam H. Embryo transfer—a critique of the factors involved in optimizing pregnancy success. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17(3):289-98.
46. Sallam H. Should embryo transfer always be performed under ultrasound guidance?. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004;24:383–386.
47. Schoolcraft W, Surrey E, Gardner D. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril*. 2001;76:863–70.
48. Simon C, Horcajadas J, García-Velasco J, Pellicer A. El Endometrio Humano: desde la investigación a la clínica. 1ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2009.
49. Singh N, Gupta P, Mittal S, Malhotra N. Correlation of technical difficulty during embryo transfer with rate of clinical pregnancy. *J Hum Reprod Sci*. 2012;5(3):258–261.
50. Soares S. Uso del Atosiban en transferencias embrionarias. *IX Curso de actualidad en investigación en Ginecología y Técnicas de Reproducción Asistida*. 10 Abril 2014; Vigo, España.
51. Sociedad Española de Fertilidad. Libro Blanco Sociosanitario: “La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas”. *Imago Concept & Image Development, S.L.* (Madrid, España). 2011. ISBN: 978-84-615-0589-0.
52. Sociedad Española de Fertilidad. Saber más sobre Fertilidad y Reproducción Asistida. 2012. [Internet]. [Citado 2014 Marzo 12]. Disponible en: http://nuevo.sefertilidad.com/spr_sef_fertilidad.pdf

53. Spitzer D, Haidbauer R, Corn C, Stadler J, Wirleitner B, Zech N. Effects of embryo transfer quality on pregnancy and live birth delivery rates. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(2):131-5.
54. Strickler R, Christianson C, Crane J, Curato A, Knight A, Yang V. Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertil Steril.* 1985;43:54–61.
55. Tomas C, Tikkinen K, Tuomivaara L, Tapaninen J, Martikainen H. The degree of difficulty of embryo transfer is an independent factor for predicting pregnancy. *Hum Reprod.* 2002;17:2632.
56. Tur-Kaspa I, Yuval Y, Bider D, Levron J, Shulman A, Dor J. Difficult or repeated sequential embryo transfers do not adversely affect in vitro fertilization pregnancy rates or outcome. *Hum Reprod.* 1998;13:2452–5.
57. Urbina M, Lerner Biber J. Fertilidad y Reproducción Asistida. 1ªed. Venezuela: Médica Panamericana; 2008.
58. Uyar A, Bener A, Ciray H, Bahceci M. Physician experience in performing embryo transfers may affect outcome. *Fertil Steril.* 2011;95(5):1860-2.
59. van Loendersloot L, van Wely M, Limpens J, Bossuyt P, Repping S, van der Veen F. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010;16(6):577-89.
60. van Weering H, Schats R, McDonnell J, Hompes P. Ongoing pregnancy rates in in vitro fertilization are not dependent on the physician performing the embryo transfer. *Fertil Steril.* 2005;83(2):316-20.
61. Woolcott R, Stanger J. Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Hum Reprod.* 1997;12:963–6.
62. Wu Z, Li R, Ma Y, Deng B, Zhang X, Meng Y, Chen X, Liu P, Qiao J. Effect of HCG-day serum progesterone and oestradiol concentrations on pregnancy outcomes in GnRH agonist cycles. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(5):511-20.
63. Yılmaz N, Oruç AS, Zeyrek T, Görkem U, Inal HA, Engin-Üstün Y, Gülerman C. Effect of the afterloaded external guidance embryo transfer technique on pregnancy rates in single embryo transfer cycles. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2013;14(3):153-6.

64. Zhao J, Zhang Q, Li Y. The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;28:10-100.