



Universidad de Oviedo

Máster Universitario en Biología y Tecnología de la
Reproducción

***"Impacto del Uso del análogo de
la GnRh en el Síndrome de
Hiperestimulación Ovárica"***

AUTORA: Tania Fernández Navarro

TUTORA: Lourdes Sánchez Castro

13 de Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería dar mi más sincero agradecimiento a mi tutora y directora del Trabajo Fin de Máster, la Dra. Lourdes Sánchez Castro. No solo por su dedicación, apoyo y confianza durante este curso, sino también por haberme acogido en la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA, y ser una de las principales responsables de que me embarcara en este emocionante mundo.

GRACIAS a mis padres por guardar la calma todos estos años y confiar incondicionalmente en mí y en cada paso que doy. A mi hermano por seguirme y escucharme, aunque aún no me entienda. Y a Carlos por su infinita paciencia y apoyo diario.

GRACIAS a Pablo, por ayudarme con la parte estadística.

GRACIAS a mis compañeras del Máster Isabel y María, por sus repasos previos a los exámenes, y porque sin ellas ni el Congreso de Sevilla ni el viaje hubiesen sido lo mismo.

GRACIAS a todas y cada una de mis compañeras y compañeros de clase porque sin duda han sido el mejor apoyo en el día a día.

ABREVIATURAS (por orden de aparición)

- ✓ OMS: Organización Mundial de la Salud
- ✓ INE: Instituto Nacional de Estadística
- ✓ FIV: Fecundación *in vitro*
- ✓ TE: Transferencia Embrionaria
- ✓ TRA: Técnicas de Reproducción Asistida
- ✓ ICSI: Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*)
- ✓ ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embryology*
- ✓ RO: Reserva Ovárica
- ✓ FSH: Hormona Folículo Estimulante (*Follicle- Stimulating Hormone*)
- ✓ E₂: Estradiol
- ✓ AMH: Hormona Antimülleriana (*Anti-Müllerian Hormone*)
- ✓ IMC: Índice de Masa Corporal
- ✓ SHO. Síndrome de Hiperestimulación Ovárica
- ✓ hCG: Gonadotropina Coriónica humana (*Human Chorionic Gonadotropin*)
- ✓ SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
- ✓ VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- ✓ SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico
- ✓ LH: Hormona Luteinizante (*Lutein Hormone*)
- ✓ GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina (*Gonadotropin Releasing Hormone*)
- ✓ IU: Unidades Internacionales.
- ✓ HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias
- ✓ RA: Reproducción Asistida
- ✓ ACO: Anticonceptivos Orales

Índice

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Población en estudio	11
Protocolos de estimulación ovárica:.....	11
Punción Folicular	13
Protocolo de laboratorio	14
Protocolo de preparación endometrial	15
Técnicas de criopreservación	15
Transferencia embrionaria	20
Análisis estadístico.....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

INTRODUCCIÓN

La infertilidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como "enfermedad del sistema reproductivo definida por un fallo en la obtención de un embarazo clínico tras 12 meses, o más, de relaciones sexuales sin protección". Se calcula que afecta a unos 70 u 80 millones de parejas en todo el mundo, que un 15% de las que viven en los países occidentales consultarán alguna vez por ello, y que en estas sociedades más avanzadas existe un colectivo creciente de hombres y mujeres que ya tuvieron un hijo con una anterior relación y quieren repetir con otra. Además, la mayoría de los expertos coinciden en augurar un aumento de la esterilidad para los próximos años, algo sin precedentes en nuestra historia. Y es que, manteniendo la misma línea contradictoria que imprime la conducta humana, ya conviven los problemas del control demográfico con los de la dificultad para conseguir embarazo (1).

Los datos demográficos recogidos por el Instituto Nacional de Estadística (INE), revelan que hay un descenso de la natalidad que atiende al efecto combinado de los cambios sociales y económicos a los que se ve sometida nuestra sociedad y, como consecuencia de ello, hay una reducción progresiva del número de mujeres en edad fértil. El aumento de la edad media en el primer nacimiento está vinculado a parámetros sociales como el retraso en el matrimonio, el mayor nivel de estudios de la mujer y su incorporación a la vida laboral, la difusión de la píldora anticonceptiva así como las dificultades para la independencia de los jóvenes debido a una inestabilidad laboral y económica (2).

Conforme se incrementa la edad de la mujer, disminuye su fertilidad. Esto se ha visto en diversos y múltiples estudios analizando el número de hijos según la edad de la mujer en poblaciones que no empleaban métodos anticonceptivos, bien porque no habían sido descubiertos, o bien por ser absolutamente rechazados en ese grupo subpoblacional. Aunque la fertilidad varía, el patrón de cómo disminuye con la edad es bastante similar en los diferentes grupos de población, la caída empieza a ser notable a partir de los 35 años de edad (Fig.1).

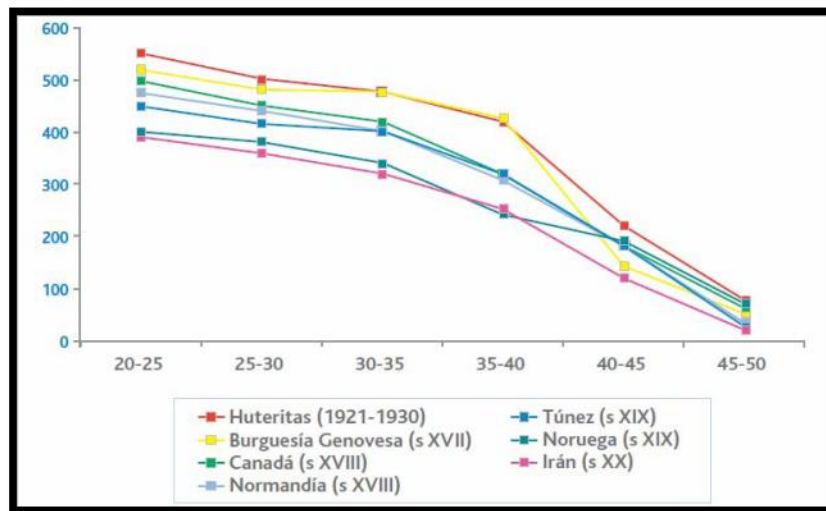


Fig. 1 Fertilidad femenina en 7 poblaciones naturales. *Menken et al* (1986)

Este estudio de *Menken* en Estados Unidos, ya en 1986, llegó a la conclusión de que la frecuencia de esterilidad en la mujer pasaba del 10% entre 20-29 años, al 25 % entre los 30-39 años y se situaba en 50% por encima de los 40 años de edad (3).

Es clásico también el trabajo de *Hendershot y Pratt*, repetido con similares resultados por diferentes autores, en el cual se evidencia cómo la tasa de embarazo, entre las mujeres casadas no estériles tras 12 meses de exposición coital no protegida, caía a medida que se incrementaba la edad. Así, la tasa de embarazo fue del 86% de los 20 a los 24 años; del 78% de los 25 a 29; del 63% de los 30 a los 34 y del 52% de los 35 a los 40 años (4).

La calidad de los ovocitos es un factor clave en la esterilidad femenina que depende directamente de la edad. Como es bien sabido, el aumento de la edad materna tiene un impacto negativo en el desarrollo ovocitario. La calidad ovocitaria se establece durante la vida fetal, los que son menos susceptibles a la no disyunción durante la meiosis se ovulan en primer lugar, quedando así los ovocitos de mala calidad para futuras ovulaciones. Se postula una segunda hipótesis que asume una acumulación de daño dependiente de la edad, así un incremento gradual de daño oxidativo intracelular podría ser el responsable de que la calidad esté menos deteriorada en pacientes más jóvenes, sus óvulos han tenido menos tiempo para acumular daños y se conservan mejor (5) (6).

La infertilidad masculina ha tenido mejores resultados en tratamientos de Fecundación in Vitro (FIV) que los problemas tubáricos de la mujer, que tienen una prognosis especialmente negativa (7). En la actualidad, sólo un tercio de los ciclos de FIV terminan en embarazo y solo un cuarto de ellos terminan en un niño nacido vivo (8) (9) (10) (11) y el fallo recurrente de implantación del embrión (dos o más ciclos de FIV no exitosos) es un problema característico de los mismos (8). A parte de los mencionados, otro factor importante implicado en el éxito de la técnica es la transferencia embrionaria (TE) (12) que es el paso final más importante (13) (14), y a la vez, el más vulnerable e ineficiente (9).

Con todo esto, lo que se ha producido en los últimos años es un aumento en la demanda de las técnicas de reproducción asistida (TRA). En la actualidad, España es el tercer país europeo en volumen de tratamientos, detrás de Francia y Alemania (15).

Desde 1978, el uso de la Fecundación in Vitro (FIV) ha sido muy común, y junto con la introducción de la técnica de la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) en 1992, se han podido resolver muchos problemas de fertilidad en múltiples parejas.

Actualmente, según datos de la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) se estima que más de 3,75 millones de nacimientos en el mundo son resultado de técnicas de reproducción asistida. La mayoría de los ciclos (55,7%) se llevan a cabo en Francia, Alemania, España, Reino Unido e Italia. Teniendo en cuenta el aumento en el uso de estas técnicas, es importante evaluar los riesgos para la salud en los niños (16).

Varios artículos han descrito que los niños concebidos por FIV/ICSI tienen mayor riesgo de sufrir problemas de salud, desde anomalías congénitas hasta defectos de *imprinting*. Aunque el riesgo de desarrollar malformaciones congénitas en niños concebidos por TRA y niños concebidos naturalmente no es estadísticamente significativo, sabemos que los procedentes de FIV tienden a nacer con bajo peso, tienen más cantidad de grasa periférica, hipertensión y mayores concentraciones de glucosa en sangre (16). El riesgo de ocurrencia de una anomalía congénita se incrementa de un 5,8% (embarazos naturales) a un 8,3% (Reproducción Asistida). Sin embargo, también

se ha observado que el sólo hecho de la infertilidad en la pareja, más allá del tratamiento, la predispone a una mayor frecuencia de anomalías (17).

Tanto la reproducción natural como la reproducción asistida dependen de la disponibilidad de ovocitos maduros, ya que sin ellos no es posible que se formen embriones. Aunque las TRA están disponibles para ayudar a conseguir embarazo en estas parejas con problemas reproductivos, la probabilidad de resultados positivos disminuye con la edad (18). Actualmente, las TRA están en continua evolución, y han aparecido otras asociadas como la congelación y descongelación del semen, ovocitos y embriones que permiten tener más opciones dentro de un mismo ciclo o incluso aplazar la transferencia cuando las condiciones no son las adecuadas o ha surgido alguna tipo de complicación.

Antes de iniciar cualquier TRA, es necesario disponer de una información que nos ofrezca una noción de cuál es la reserva ovárica de la paciente. Existen determinados marcadores que nos dan una aproximación al pronóstico en los resultados de las TRA, entre ellos están los marcadores hormonales de respuesta ovárica (RO).

Los marcadores de RO más habituales en la práctica diaria son: la determinación sérica basal de Hormona Folículo Estimulante (FSH), entre el día 3 y 5 del ciclo (19), el estradiol sérico (E_2), la determinación de inhibina B y la determinación de hormona antimülleriana (AMH). Actualmente, ningún marcador tiene un 100% de sensibilidad y especificidad por lo que, todos en conjunto, pueden darnos una orientación.

Además de los marcadores de RO en el resultado del tratamiento también nos va a influir la edad de la paciente, su índice de masa corporal (IMC) y el factor de esterilidad. Por tanto, teniendo en cuenta todos estos parámetros, el objetivo del protocolo para la estimulación ovárica controlada (EOC) será ajustar las dosis de gonadotropinas de manera que se consiga una respuesta multifolicular en cada ovario disminuyendo al máximo el riesgo de complicaciones como cancelación por una respuesta insuficiente o, por el contrario, desarrollo del potencialmente dramático síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) (20) (21).

El SHO es una respuesta iatrogénica exagerada del ovario a los tratamientos de estimulación ovárica. Se asocia de forma característica con la administración exógena de gonadotropinas, principalmente gonadotropina coriónica humana (hCG) y, más raramente, con citrato de clomifeno para inducir la maduración del folículo antes de su captación. Su incidencia en los ciclos de FIV varía entre el 0,6% y el 10% (22).

El SHO es una afección potencialmente mortal que cursa con un crecimiento masivo del ovario, ascitis, hidrotórax, disfunción hepática e insuficiencia renal pudiendo incluso llevar, en el 2% de los casos, a la hospitalización.

Se clasifica en tres categorías diferentes (tabla1): leve, moderada y severa. El síndrome de hiperestimulación ovárica leve demuestra el aumento de peso y malestar abdominal por la inflamación de los ovarios. Mediante ecografía pueden llegar a medirse ovarios de 5-10cm de diámetro. Está asociado con pequeñas cantidades de líquido en la pelvis.

El SHO moderado refiere síntomas más pronunciados, como náuseas y distensión abdominal con dolor. Pueden llegar a observarse ovarios de hasta más de 10cm de diámetro.

En los casos graves, hay evidencia de excesiva acumulación de fluido en el tercer espacio con compromiso hemodinámico severo (23).

Tabla 1. Estadiaje⁷

Grado	Síntomas
SHO leve Grado I	Distensión abdominal Dolor abdominal leve Tamaño ovárico habitualmente menor de 8 cm.*
SHO moderado Grado II	Dolor abdominal moderado Náuseas, vómitos y/o diarrea Evidencia ecográfica de ascitis Tamaño ovárico habitualmente de 8-12 cm.*
SHO grave Grado III	Ascitis clínica, frecuentemente con hidrotórax Oliguria con aumento de la creatinina Hemoconcentración (Hto. > 45% o incremento de > 30%, respecto al valor previo) Hiponatremia Trastornos de la coagulación Trastornos de la función hepática (apreciables en el 25-40% de los casos) Tamaño ovárico habitualmente mayor de 12 cm.*
SHO crítico	Ascitis a tensión o hidrotórax severo Hematocrito >55% Leucocitosis > 25.000/ml Fallo renal. Creatinina >1,6mg/dl. Accidente tromboembólico Síndrome de distress respiratorio del adulto

* El tamaño ovárico puede no estar relacionado con la severidad del SHO en los casos de reproducción asistida debido al efecto de la aspiración folicular.

La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) ha propuesto como índice de calidad la incidencia del síndrome de hiperestimulación grave en menos del 1% de los ciclos estimulados.

El fenómeno cardinal del cuadro es el aumento de la permeabilidad capilar que induce el desplazamiento de líquido y proteínas del espacio intravascular al tercer espacio. Esto provoca una depleción del volumen intravascular responsable de los síntomas del síndrome: hipotensión, oliguria, ascitis, aumento de la viscosidad sanguínea, hiponatremia e hipercaliemia (22).

El aumento de la permeabilidad capilar se debe a la liberación de varias sustancias vasoactivas a la circulación sistémica. El principal agente es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de origen folicular, aunque también se han implicado otros factores: IL-6, cascada de renina-angiotensina, prostaglandinas, sistema de quinina-caliceína, estradiol...

Estos mediadores se liberan tras la luteinización masiva de los folículos provocada por la hCG.

El VEGF folicular tiene tres acciones principales que favorecen el aumento de la permeabilidad capilar:

1. Es un potente promotor de neoangiogénesis
2. Altera la funcionalidad e integridad de la pared vascular
3. Altera las uniones intercelulares induciendo cambios en las fibras de actina (22)

La patogénesis del SHO implica un incremento en el número de células de la granulosa debido al crecimiento multifolicular y la extensa producción de VEGF después de la luteinización de estas células. Tradicionalmente, en los ciclos de estimulación ovárica se administra hCG como sustituto de la oleada natural de LH para inducir la maduración final de los ovocitos. La vida media de la hCG, más larga que la de la LH hace que se alargue el estímulo luteinizante en las células de la granulosa lo que juega un papel crucial en el desarrollo de SHO. Mientras que el estímulo luteinizante ejercido por la hCG exógena es la fuerza que impulsa el SHO temprano que se inicia durante los ocho días después de la punción folicular, el SHO tardío, que comienza pasados los ocho días de la punción, parece estar provocado por la hCG

endógena de embarazo. Cuando la paciente está en riesgo de SHO, la cancelación de la inyección de hCG y abortar el ciclo evitará cualquiera de las formas del síndrome.

Todas las mujeres sometidas a un tratamiento de fertilidad tienen riesgo de sufrir una hiperestimulación ovárica. Sin embargo hay unas más susceptibles que otras, por lo que el conocimiento de los factores de riesgo más comunes es útil para su prevención:

-Mujer menor de 30 años: responden más a las gonadotropinas ya que tienen mayor densidad de receptores y más número de folículos.

-Síndrome de ovario poliquístico (SOP): el hiperandrogenismo, el hiperinsulinismo y el cociente LH/FSH > 2 son condiciones que predisponen a la respuesta exagerada y a la aparición del cuadro.

-Imagen ovárica en la ecografía: "ovarios en collar".

-Niveles elevados de concentración de E₂ inmediatamente antes de la administración de la hCG o incrementos bruscos de los niveles previos a administrar la misma. Se considera alto riesgo con niveles de estradiol > 2.500 pg/ml.

-Formación de un número elevado de folículos de tamaño intermedio (10-14mm).

-Instauración del embarazo y mayor riesgo si éste es múltiple.

-Mujeres que han desarrollado otras hiperestimulaciones en ciclos previos.

-Uso de hCG como soporte de fase lútea en lugar de progesterona.

-Alérgicas: la fisiopatología es similar por la respuesta inflamatoria que se produce en ambos cuadros (liberación de citoquinas e inmunomoduladores).

-Pico endógeno de LH: la hiperestimulación grave muy raramente se puede producir tras el pico endógeno de LH por un desarrollo espontáneo o farmacológico de múltiples folículos, aún sin administrar la hCG. Se han descrito casos en mujeres con ovario poliquístico o hipotiroidismo (22).

El hecho de que pacientes jóvenes y sanas puedan desarrollar complicaciones potencialmente letales (fallo renal, fallo hepático, shock hipovolémico, fenómenos tromboembólicos, síndrome de distrés respiratorio del adulto) supone un problema médico de gran trascendencia por lo que se han desarrollado nuevos protocolos.

Los protocolos de estimulación presentan el riesgo de luteinización prematura folicular (elevación de los niveles de LH durante el estímulo debido a los altos niveles de estradiol) y el de ovulación espontánea, además de complicaciones relacionadas con una respuesta excesiva como es el SHO.

La introducción en la década de los 80 de nuevos fármacos en las pautas de estimulación como los antagonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRh), ha permitido el uso de agonistas para desencadenar la ovulación en lugar de hCG como medida preventiva para evitar el SHO en pacientes de riesgo.

El agonista de la GnRH no sólo induce la maduración final de los ovocitos, sino que también actúa como un agente luteolítico y previene la secreción de sustancias vasoactivas procedentes de los cuerpos lúteos (24). Esto ha podido observarse en los ciclos con pacientes donantes de óvulos (23).

Sin embargo, se observó que el uso de agonista para desencadenar la ovulación provocaba una deficiencia de soporte de la fase lútea y esto afectaba negativamente a las tasas de embarazo tras la transferencia de embriones en fresco en ciclos sin donación de óvulos.

En algunos trabajos publicados, se intenta mantener el soporte de fase lútea administrando 1500 UI de hCG 35 horas después del bolo de agonista de GnRh de forma que se preserve la función lútea siendo aún una dosis demasiado baja para desencadenar un SHO. Sin embargo, la literatura sugiere que aunque el SHO temprano puede evitarse completamente, el tardío se produce aún esporádicamente con este protocolo (24).

También hay trabajos en los que los autores señalan que congelar todos los embriones y realizar la transferencia en el siguiente ciclo tras preparar adecuadamente el endometrio es una opción igualmente válida. En estos casos se minimiza el riesgo de SHO y se mantienen las posibilidades de conseguir embarazo, siempre que se cuente con un programa eficaz de congelación de embriones (23).

Uno de los problemas que presenta el uso de análogos de GnRh es que la tasa de embarazo es ligeramente inferior (entre el 3% y el 5% más baja) debido al efecto negativo que ejercen sobre el endometrio, las trompas de Falopio, el folículo y el ovocito. Las mejoras en los medios y en las técnicas de criopreservación, tanto en

congelación lenta como en vitrificación, permiten aplazar la transferencia al ciclo siguiente y así, poder preparar el endometrio para una mejor implantación del embrión sin verse disminuidas las probabilidades de embarazo.

La segmentación del ciclo junto con la transferencia en la paciente a un endometrio no estimulado ha sido descrita como la mejor solución frente al SHO. Además varios estudios demuestran que esta estrategia no solo previene el SHO, sino que también evita las cancelaciones con el beneficio económico añadido que ello conlleva, no viéndose mermadas las posibilidades de gestación y disminuyendo, a la vez, el número de embarazos ectópicos, aumentando la tasa de niños nacidos vivos (25).

La segmentación del ciclo en un tratamiento de reproducción asistida con riesgo de SHO podría resumirse en tres etapas diferentes:

1. Estimulación ovárica con antagonista y bolo de agonista para evitar el SHO
2. Criopreservación de todos los embriones
3. Tendencia a la transferencia de un solo embrión desvitrificado en un endometrio receptivo previamente preparado

Dado los buenos resultados publicados con este protocolo, en la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), se comenzaron a introducir los ciclos segmentados a finales del año 2011. Aunque eran pocos los casos en riesgo de SHO, se trata de una unidad pública donde los recursos son limitados y se soporta una importante lista de espera. La cancelación de un ciclo de estimulación no solo supone la pérdida de recursos económicos importantes, sino la necesidad de iniciar un nuevo ciclo de tratamiento con la consiguiente repercusión sobre la demora. Coincidiendo con la introducción del agonista para inducir la ovulación, se empezó a introducir la vitrificación como técnica alternativa a la congelación lenta para congelar embriones.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis:

El uso de ciclos segmentados en pacientes en riesgo de SHO no disminuye la posibilidad de conseguir embarazo y evita la cancelación del ciclo.

Objetivos:

Para comprobar si esta hipótesis es cierta nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar si hay diferencias en las tasas de embarazo de los ciclos con transferencia en fresco y los ciclos con transferencia de embriones congelados
2. Comprobar si hay diferencia en las tasas de embarazo y las tasas de cancelación en ciclos donde se ha inducido la ovulación con análogos versus hCG
3. Establecer si la introducción de la vitrificación como método de criopreservación supone diferencias en la consecución final del embarazo

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

Para la realización de este estudio observacional retrospectivo se recogieron los datos de las pacientes que realizaron tratamiento de FIV/ICSI, en la Unidad de Reproducción Asistida (RA) del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), durante el período comprendido entre enero de 2012 y febrero de 2014.

Se estudiaron un total de 867 ciclos, en mujeres con una edad comprendida entre 26 y 41 años, siendo la edad media 36 años. Las Unidades de RA en Hospitales Públicos no admiten a tratamiento a mujeres que han cumplido los 40 años de edad. En nuestra muestra existen pacientes con 41 años debido a que tenían menos de 40 años en el momento de iniciar el tratamiento.

Las pacientes que acuden a la Unidad vienen con un estudio de esterilidad básico: perfil hormonal, histerosalpingografía, cariotipo y serología. En este estudio no se tuvieron en cuenta los factores de esterilidad de cada paciente. Para determinar el resultado de la estimulación ovárica controlada, se tomó el valor del último estradiol antes de la punción, y se tuvo en cuenta el número de ovocitos recuperados.

En la primera consulta en la Unidad se realiza la anamnesis y la exploración general y ginecológica de la mujer, y se estudia qué tratamiento es el más adecuado para cada paciente, en este estudio sólo se consideraran los ciclos de FIV/ICSI. Una vez que tiene lugar la primera consulta pasan a lista de espera, que en la actualidad es de aproximadamente 18 meses.

Protocolos de estimulación ovárica:

Todos los protocolos de estimulación se hicieron con gonadotropinas, en su mayoría recombinantes y en algún caso urinarias. Para poner el ovario en reposo y evitar un pico de LH endógeno, se usaron dos protocolos distintos en función del compuesto usado para realizar el frenado.

Las dosis de gonadotropinas se ajustaron, en ambos casos, en función de la edad y el peso de la paciente, y de marcadores de reserva ovárica como la FSH y el estradiol, medidos en el tercer día del ciclo, o en el recuento de folículos antrales.

✓ **Protocolo largo con agonista**

Se inició el día 21 del ciclo anterior administrando el agonista de la GnRh (acetato de leuprolide). El día 1 de la regla siguiente, empezó a administrarse las dosis de gonadotropinas, que en la mayoría de los casos fue FSH recombinante (en algún caso se administró FSH urinaria). Al séptimo día de ciclo se hizo un control ecográfico y, en los casos en que fue necesario, se ajustó la dosis en función de la respuesta ovárica. Tras 10-12 días de estímulo se repitió el control ecográfico y se indujo la ovulación, en este caso, siempre con hCG.

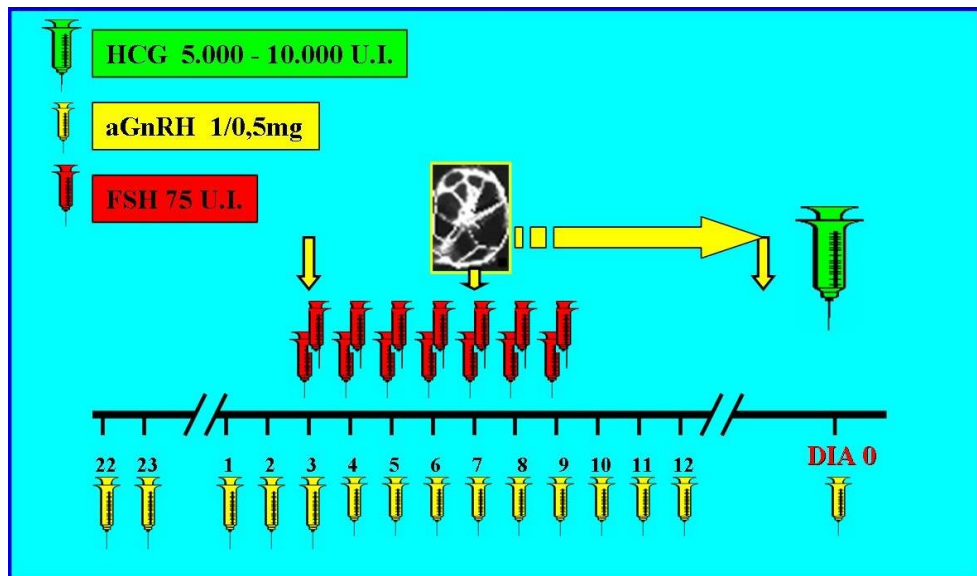


Fig.2 protocolo largo con agonista de la GnRh

✓ **Protocolo corto con antagonista**

Las pacientes tomaron anticonceptivos orales (ACO) en el ciclo previo para mantener el ovario en reposo y poder planificar en la Unidad el ciclo.

En el día 2 ó 3 del ciclo siguiente, se administraron las gonadotropinas, FSH recombinante, y el día 6 se añadió el antagonista de la GnRh en dosis de 0,25 mg/día mediante inyección subcutánea. Cuando se utilizó este protocolo, la ovulación se indujo

con hCG en los casos en los que no presentaban riesgo de SHO y con agonista de la GnRh en aquellos casos que si lo presentaban.

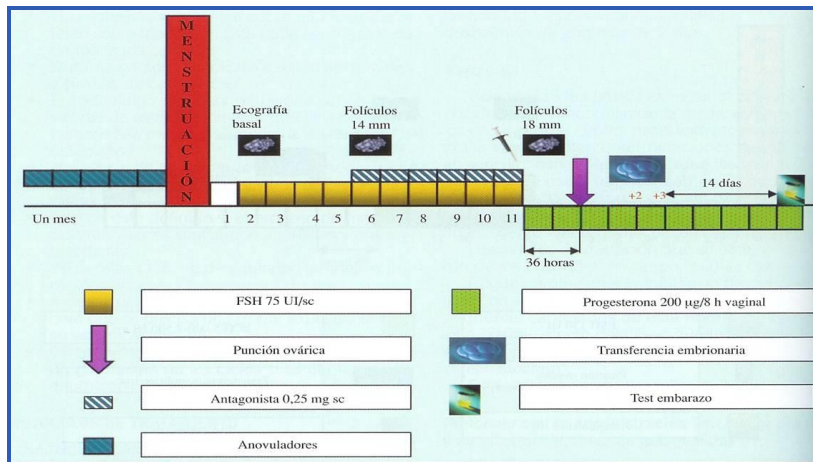


Fig.3 protocolo corto con antagonista de la GnRh (cedido por Bonilla y col. 2009)

En ambos protocolos, entre los días 10-12 del estímulo, dependiendo de la respuesta de la paciente al tratamiento, se llevó a cabo un control ecográfico y se midió el nivel de estradiol (valor del último estradiol) para determinar si el desarrollo folicular era el adecuado. Debe haber folículos de entre 18 y 20mm y un nivel de estradiol de 150-250 pg/ml por cada uno, para considerar la respuesta como normal. También en esta ecografía se observó la calidad y el grosor del endometrio de la paciente (triple línea y un grosor de entre 7 y 14mm).

La ovulación se indujo 36 horas antes de la punción folicular y se utilizaron dos tipos de fármacos: en el **grupo 1** se utilizó hCG recombinante (Ovitrelle® 250µg) y en el **grupo 2** agonista de la GnRh (Procrín® 2mg).

Punción Folicular

La aspiración de los ovocitos se realiza el día 12 ó 14 del ciclo, siempre entre las 36 y las 38 horas después de la inducción de la ovulación. Se lleva a cabo en quirófano, con la paciente en ayunas, sometida a sedación anestésica, en posición de litotomía. La recuperación se realiza mediante punción transvaginal ecoguiada.

El ecógrafo tiene acoplada una aguja conectada a un sistema de aspiración, con la que se punciona el folículo que se observa en el ecógrafo y se aspira el líquido folicular donde se encuentra el ovocito.

Los tubos donde se recupera el líquido folicular se vacían bajo la campana de flujo laminar con superficie calefactada a 37°C, situada en el laboratorio de embriología.

Protocolo de laboratorio

Para la realización de ambas técnicas, FIV e ICSI, se siguieron los protocolos establecidos en el laboratorio de embriología de la Unidad. Los líquidos foliculares procedentes de la punción se examinaron a la lupa y se recogieron todos los ovocitos pasándolos a una placa con medio de cultivo, posteriormente se mantuvieron en una incubadora a 37°C y una atmósfera con 6% de CO₂.

En la mayoría de los ciclos, la ICSI fue la técnica elegida para la fertilización y sólo en algunos casos seleccionados, parte de la cohorte de los ovocitos se inseminaron por FIV convencional.

Los medios de cultivo usados en todos los casos han sido de la casa comercial COOK® y se siguieron los protocolos establecidos por la casa en el cultivo de los gametos y de los embriones.

La fertilización se valoró entre las 16-18 horas post-punción, y sólo se mantuvieron en cultivo aquellos cigotos en los que se observaron 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares, es decir, aquellos ovocitos que fueron fertilizados adecuadamente.

Los embriones se mantuvieron en cultivo 2 ó 3 días post-punción, dependiendo de los casos. La valoración de los mismos se llevó a cabo siguiendo la clasificación de ASEBIR (Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva), puntuando la calidad embrionaria en función del número, tamaño y disposición de las blastómeras y clasificándolos en las cuatro categorías establecidas (A, B, C, D) (26). Los embriones tipo A son los que más capacidad de implantación tienen, al contrario que los embriones tipo D que son los que tienen menos probabilidad de éxito y ofrecen un peor pronóstico. En nuestro caso todos los embriones fueron criopreservados.

Protocolo de preparación endometrial

La preparación endometrial se realizó con un tratamiento de reemplazo hormonal. El día 21 del ciclo anterior, coincidiendo con la fase luteínica, se administró un agonista de la GnRH (*Ginecrin*® depot. 3,75mg) intramuscularmente. El primer día de la regla, que coincide con el primer día del nuevo ciclo, se comenzó con la administración de 6 miligramos de estradiol al día (*Meriestra*® 2mg), en forma de un comprimido oral cada 8 horas.

Tras 12, 13 ó 14 días después de la regla, se hizo un control ecográfico donde se miró el endometrio y el nivel de estradiol. Se consideró que estaba preparado cuando el grosor endometrial era ≥ 7 mm y el nivel de estradiol superior a 100 pg/ml. A partir de ese momento, se administraron 400 miligramos de progesterona (*Progesterona*® 200mg) en dos comprimidos vaginales cada 8 horas. Esta última pauta se continuó hasta el control ecográfico realizado 15 días después de la transferencia, donde se comprobó si había o no embarazo.

El embarazo clínico se confirma cuando se observa por ecografía embrión con latido cardiaco.

Técnicas de criopreservación

En la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA se utilizan tanto técnicas de congelación lenta como de vitrificación.

- ✓ **Congelación/descongelación** (protocolos facilitados por la Unidad de Reproducción del HUCA)

Congelación

La congelación se realizó con Sidney IVF Cryopreservation Kit. Referencia K-SICS-5000 en un sistema de congelación Kryo Planer serieII. Se congelaron los embriones en fase de división D+2 ó D+3, utilizando los medios de congelación de la casa comercial COOK® y siguiendo el siguiente protocolo:

Poner los embriones en la solución 1 durante 10 minutos en el incubador a 37°C.

Pasarlos a la solución 2 y 3 y dejarlos 10 minutos en cada una, esta vez a temperatura ambiente.

Volver a depositar los embriones en la solución 1, y dejarlos 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación ponerlos 10 minutos en la solución 2, también a temperatura ambiente.

Por último, poner los embriones en la solución 3 y cargarlos en la pajueta según el siguiente esquema:

1º. Cargar medio hasta la marca de 2mm

2º cargar aire hasta la marca de 1mm

3º cargar medio hasta la marca de 3mm

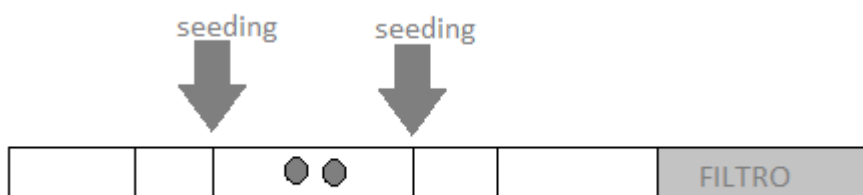
4º cargar aire hasta la marca de 1mm

5º cargar medio hasta que empape el filtro

6º cargar los embriones con ayuda del *flexiplet*, debajo de la lupa y comprobar que quedan depositados en el centro de la columna central

A continuación se lleva la pajueta al sistema de congelación y se escoge el programa de congelación 2, con *seeding* manual.

El *seeding* se realiza de forma manual en los meniscos superior e inferior de la columna central de medio, con una pinza que previamente ha sido sumergida en nitrógeno líquido.



Una vez completado el programa de congelación se desprende la pajueta del porta-pajuelas y se sumerge rápidamente en nitrógeno líquido.

Programa 2 del sistema de congelación Kryo Planer serieII

Temperatura de inicio: +18-20°C

Paso 1: bajada a -7°C en rampa de -2°C/min

Paso 2: mantener 5 minutos la temperatura a -7°C

Paso 3: hacer el *seeding* manual con las pinzas. Tras el *seeding* se continúa el programa de congelación con la opción RUN

Paso 4: mantener 5 minutos la temperatura a -7°C

Paso 5: bajada a -30°C en rampa de -0,3°C/min

Paso 6: bajada a -150°C en rampa de -30°C/min

Todos los pasos se ejecutan automáticamente, excepto el *seeding* manual. Es importante no olvidarse de ejecutar de nuevo el programa con la opción RUN, de lo contrario quedaría estacionado en -7°C.

Descongelación

La descongelación se realizó con Sidney IVF Thawing Kit. Referencia K-SITS-5000 según el protocolo:

Incubar las 4 soluciones a temperatura ambiente.

Sacar la pajueta del banco y descongelar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Incubar los embriones en cada una de las soluciones durante 5 minutos, y tras los cinco minutos en la solución 4, incubar esta misma durante 5 minutos más en la estufa a 37°C.

Pasar los embriones a medio de cultivo y, si es posible, incubar durante toda la noche para comprobar su evolución.

✓ **Vitrificación/desvitrificación**

Vitrificación (27)

La vitrificación se realizó con RapidVit™ Cleave de Vitrolife®. Contiene tres medios para vitrificar embriones en fase de división del día 3. Las soluciones consisten en un medio tamponado con MOPS que contiene gentamicina como fármaco antibacteriano y albúmina sérica humana.

Vitri 1™ Cleave no contiene crioprotectores.

Vitri 2™ Cleave contiene etilenglicol como crioprotector.

Vitri 3™ Cleave contiene etilenglicol, propanediol, ficoll y sacarosa como crioprotectores.

Usar después de calentar a +37°C en condiciones atmosféricas.

A la hora de vitrificar, la cronología es fundamental; debemos asegurarnos de seguir exactamente el protocolo.

Poner 0,5-1ml de cada una de las soluciones en distintos pocillos y mantener a 37°C. Es muy importante que todas las manipulaciones de los embriones se realicen a 37°C (sobre la platina calefactada).

Transferir los embriones desde el cultivo al medio Vitri 1™ Cleave y dejarlos en la solución durante un mínimo de 5 y un máximo de 10 minutos.

Pasar un número adecuado de embriones al medio Vitri 2™ Cleave. Los embriones permanecerán 2 min en esta solución. Si los embriones tienden a flotar hacia la superficie, deberemos recogerlos y volver a ponerlos en el fondo de la placa.

Preparar el dispositivo criogénico.

Hacia el final de los 30 segundos, formar una gota de 20µl de Vitri 3™ Cleave sobre una superficie no tóxica, preferiblemente una placa de cultivo. Esto facilita la carga en el dispositivo criogénico.

Uso del dispositivo criogénico:

Usar un dispositivo de conservación cerrado legalmente comercializado para prevenir el riesgo de contaminación vírica del procedimiento de vitrificación. La tasa de enfriamiento del dispositivo de crioconservación debe ser de al menos 10.000°C al minuto.

A causa de la evaporación y la dilución, la gota de 20µl sólo puede usarse una vez.

Cuando queden 10 segundos, comenzamos a recolectar los embriones. Transferir los embriones dentro de un volumen mínimo de Vitri 2™ Cleave para evitar la dilución de la gota de Vitri 3™ Cleave.

Transferir los embriones a la gota de 20µl de Vitri 3™ Cleave y dejarlos en esta solución durante 30 segundos. Para que los embriones queden correctamente expuestos a la solución Vitri 3™ Cleave, darles 2-3 vueltas en el interior de la gota. Cuando queden 5-10 segundos, recoger los embriones dentro de un volumen mínimo y colocarlos en el dispositivo criogénico. Vitrificar inmediatamente los embriones.

Desvitrificación (28)

RapidWarm™ Cleave contiene cuatro soluciones para calentar embriones vitrificados en fase de división del día 3. Las soluciones consisten en un medio tamponado con MOPS que contiene gentamicina como fármaco antibacteriano y albúmina sérica humana.

Warm 1™ Cleave contiene sacarosa como crioprotector.

Warm 2™ Cleave contiene sacarosa como crioprotector.

Warm 3™ Cleave contiene sacarosa como crioprotector.

Warm 4™ Cleave no contiene crioprotectores.

Usar después de calentar a +37°C en condiciones atmosféricas.



Poner 0,5-1ml de cada uno de los medios en pocillos distintos de una placa de 4 pozos atemperada a 37°C. Es importante que todas las manipulaciones de los embriones se realicen a 37°C (sobre la platina calefactada).

En un criocondensador, acercar el dispositivo criogénico con los embriones vitrificados a lo pocillos preparados.

Colocar rápidamente los embriones vitrificados en Warm 1™ Cleave y dejar que los embriones se desprendan del dispositivo y se hundan hasta el fondo durante 10–30 segundos.

Transferir los embriones a Warm 2™ Cleave y dejarlos en la solución durante 1 minuto. Transferir los embriones a Warm 3™ Cleave y dejarlos en la solución durante 2 minutos. Transferir los embriones a Warm 4™ Cleave y dejarlos en la solución durante 5 minutos.

Finalmente, lavar los embriones en medio de cultivo varias veces y seguir cultivándolos conforme a las prácticas del laboratorio.

Transferencia embrionaria

En todas las pacientes se realizó un test de transferencia embrionaria previo a la estimulación ovárica, anotando si había alguna dificultad y las complicaciones anatómicas que la paciente pudiera tener para el paso del catéter. El catéter de prueba siempre fue de la casa COOK Sydney IVF® Embryo Transfer Set (Ref K-JETS-7019-SIVF).

La transferencia embrionaria en fresco se realizó aproximadamente entre las 48 y las 72 horas después de realizar las punciones foliculares. En el caso de embriones congelados el protocolo que se siguió fue el siguiente: tras descongelarlos se dejaron a cultivo durante toda la noche para ver si su evolución era buena y se transfirieron al día siguiente.

En primer lugar, se colocó a la paciente en posición de litotomía y con ayuda de un espéculo se visualizó el cérvix, posteriormente, se realizó un lavado de la vagina y el cérvix con suero fisiológico.

Gracias a la ecoguía, se colocó la funda del catéter a través del endocérvix, hasta llegar hasta el punto de útero en que se deseaba colocar a los embriones.

Posteriormente, se cargaron los embriones que se iban a transferir en el catéter sin utilizar más de 0,2ml de medio. Primero se cargó una columna de medio, posteriormente una columna de aire seguida por una columna de medio en cuyo interior estaban colocados los embriones, centrados, y finalmente tras una columna de aire se cargó la última columna de medio.

A continuación se introdujo el catéter en su guía hasta llegar al útero, con cuidado no tocar el fundus en la medida de lo posible, y se descargó su contenido. Finalmente se comprobó si el embrión se había descargado, y si no fuera así, hubo que repetir la operación de cargado y colocación del embrión cerca del fundus hasta hacer la transferencia correctamente.

Se anotó todo lo relacionado con la transferencia: si hubo sangrado, qué catéter se utilizó, si se necesitó instrumentación adicional (Pozzi), y si hubo que repetir la transferencia

En la mayoría de los casos, y de acuerdo con la pareja tratada, se transfirieron 2 embriones; sólo en aquellas situaciones en las que el riesgo de embarazo triple era bajo, se transfirieron 3 embriones que es el máximo permitido por la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. Los casos de transferencia de 1 embrión se produjeron cuando no se disponía de más embriones para transferir o si la pareja no aceptaba el riesgo de un embarazo gemelar.

Tras la transferencia las pacientes tuvieron un aporte de progesterona como soporte de la fase lútea, y a los 15 días, se realizó un test de embarazo con la primera orina de la mañana para confirmar la presencia de embarazo.

Análisis estadístico

Las variables continuas se describen mediante frecuencias absolutas y relativas. Se utilizó un modelo de regresión logística para calcular las odd ratios e intervalos de confianza al 95% de forma univariante y ajustado por edad.

RESULTADOS

Número de embarazos en pacientes a las que se les realizó transferencia de embriones en fresco VS. transferencia de embriones congelados

En la tabla2 se muestra el número de pacientes que consiguieron embarazo tras haber realizado transferencia de embriones en fresco frente a las pacientes en las que se les transfirieron los embriones una vez descongelados. Se observa que en la mayoría de se realizó una transferencia en fresco.

Tabla2 de contingencia técnicaGRUPOS * EMBARAZO

Técnica	No embarazo	Embarazo	Total
Embriones en fresco	546	139	685
Embriones congelados	149	33	182
Total	695	172	867

P-valor 0.601

Tabla3 de contingencia técnicaGRUPOS * EMBARAZO

Técnica	No embarazo	Embarazo	Total
Embriones en fresco	79,7%	20,3%	100,0%
Embriones congelados	81,9%	18,1%	100,0%
Total	80,2%	19,8%	100,0%

P-valor 0.601

En la tabla3 se muestran las tasas de embarazo en pacientes donde se realizó la transferencia de embriones en fresco frente a pacientes a las que se realizó la transferencia de embriones congelados.

Como podemos comprobar, no se observan diferencias significativas (con un valor de P de 0.601) en las tasas de embarazo en las mujeres con transferencia en fresco y las tasas de embarazo en las mujeres con transferencia de embriones congelados.

Tasa de cancelación en ciclos con ovulación inducida por hCG Vs. Agonistas de la GnRh

En la tabla4 se muestra el número de ciclos que tuvieron que ser cancelados sin llegar a punción por riesgo de SHO tras haber desencadenado la ovulación con hCG frente a las pacientes en las que se desencadenó con antagonistas de la GnRh.

Tabla4

Medicamento	Transferencia	Ciclos cancelados	Embarazo
hCG (Ovitrelle)	12	5 (41.6%)	3 (25%)
Análogo GnRh (Procrín)	18	0	6 (33.3%)

P-valor 0.0124

Se observa que hay diferencia significativa en el número de ciclos de tratamiento cancelados: no se cancela ninguno con el análogo frente al 41,6% de los ciclos inducidos con hCG.

Sin embargo, no se observan diferencias significativas (con un valor de P de 0.0124) en las tasas de embarazo con embriones congelados en las mujeres en las que se desencadenó la ovulación con Ovitrelle® frente a las mujeres en las que se llevó a cabo con Procrín®.

La tasa de embarazo global de embriones en fresco en la unidad es del 30% (datos facilitados por la Unidad de Reproducción del HUCA), por lo que tampoco habría diferencia con la tasa global de embarazo que tiene dicha Unidad.

Tasa de embriones recuperados tras protocolo de Vitricación Vs. Congelación lenta

En la tabla5 se muestra la tasa de embriones que fueron recuperados tras haber sido criopreservados siguiendo el protocolo de vitricación frente a los que sobrevivieron tras el protocolo de congelación lenta.

Tabla5

	Vitricación	Congelación lenta
Sobreviven	97 (79,5%)	136 (85%)
Lisan	25 (20,5%)	24 (15%)
total	122	160

P-valor 1.0

Las tasas recogidas son del 85% de embriones recuperados tras congelación lenta frente al 79,5% tras vitricación, de lo que concluimos que no se observan diferencias significativas (con un valor de P de 1) en las tasas de supervivencia de embriones criopreservados por una técnica u otra.

DISCUSIÓN

El SHO es uno de los efectos adversos descritos en las técnicas de Reproducción Humana Asistida. A pesar de que la incidencia de las formas graves es sólo del 1 al 2%, es la principal fuente de morbilidad derivada de estas técnicas (29).

Desde hace años se han publicado trabajos como los de *Pattison et al.* en 1994 o *Mocanu et al.* en 2007, donde se ha descrito cómo la incidencia y la duración del SHO están estrictamente relacionadas con la introducción de las hormonas de estimulación ovárica y el número de embriones implantados (30) (31).

Se han desarrollado nuevos protocolos de estimulación ovárica que incluyen agonistas de la hCG para inducir la ovulación. Estos llevan asociada la criopreservación de los embriones evitando la transferencia en fresco en las pacientes con alto riesgo de SHO. Ha sido, por tanto, una técnica ampliamente adoptada en los laboratorios de Reproducción Asistida para evitar dicha complicación tal como aparece recogido en varios artículos (23) (22) (32).

De acuerdo a nuestro estudio, de las 867 mujeres que se han estudiado, en 685 se ha realizado transferencia de embriones en fresco, mientras que en 182 se ha hecho con embriones congelados.

Algunos artículos han señalado que la transferencia de embriones congelados reducen las tasas de embarazo (29). En nuestro grupo de estudio lo que podemos comprobar es justo lo contrario. De las 685 en las que se hizo transferencia en fresco, el 20,3% de las pacientes consiguieron embarazo frente al 18,1% de las mujeres que lo consiguieron tras haber recibido embriones descongelados. Esto pone de manifiesto que, en la población estudiada, la congelación de embriones no es una desventaja para la consecución de la gestación y que sería por tanto, interesante en futuros trabajos, calcular la tasa de embarazo acumulada en aquellos ciclos donde se ha hecho transferencia en fresco y transferencia de congelados para ver si la criopreservación supone una ventaja añadida. Por otro lado, dado que no hay diferencias significativas entre ambos grupos en la consecución de un embarazo, la introducción de ciclos segmentados en esta población parece estar indicada para minimizar el riesgo de SHO.

Estos resultados se ven apoyados por autores como *Shaiker, Queen, Ferraretti* o *Fitzmaurice*. Todos ellos han publicado que la congelación de los embriones y su siguiente transferencia en el momento adecuado reporta altas tasas de embarazo con una reducción significativa del riesgo de desencadenar SHO por parte de la paciente (29).

Una revisión publicada en *Fertility and Sterility* por el grupo de *Roque* el pasado año, muestra que el uso de transferencia de embriones congelados, comparado con transferencia de embriones frescos, mejora significativamente las tasas de embarazo en las pacientes de alta respuesta, y por tanto en riesgo de sufrir SHO (33).

Sin embargo, una revisión de *Cochrane* concluye que la evidencia es aún insuficiente para poder concluir que realmente esta técnica sea un éxito frente a la prevención del SHO, debido a las grandes variaciones que pueden presentarse en las diferentes Unidades de Reproducción a la hora de ponerla en práctica como puede ser el protocolo y los medios de criopreservación, la experiencia de quién realice la técnica, o el protocolo de preparación endometrial (29) (33).

En nuestro caso, de los 182 ciclos en los que se hizo transferencia de embriones congelados, sólo 30 estaban en riesgo de SHO. Esto pone de manifiesto que la pautas de estímulo en esta Unidad de Reproducción están bien ajustadas por edad y por los marcadores de RO. Esta población se dividió a su vez en pacientes en las que se usó hCG o análogo para desencadenar la ovulación. Cuando se estudiaron ambos grupos se observó que había diferencia significativa en las tasas de cancelación, siendo mucho mayor en el grupo de las de hCG. En este grupo la tasa de cancelación fue del 41,6% frente al 0% en el grupo del análogo. Además se observó, que no había diferencias significativas en las tasas de embarazo en ambos grupos de pacientes. Por lo que, como ya hemos señalado previamente, el uso del análogo no merma posibilidad de conseguir embarazo y por otro lado supone una mejora ya que la paciente no sufre el estrés emocional de ver cancelado el ciclo y sus expectativas de embarazo. Tratándose de una Unidad Pública no hay que perder de vista el impacto económico, ya que no se pierde la medicación de dicho ciclo, ni se aumentan costes con los gastos que supone el ingreso de la paciente por un SHO severo.

Atendiendo a los protocolos de criopreservación, nuestros resultados mostraron nuevamente que en esta Unidad están bien ajustados. Ambas técnicas, tanto vitrificación

como congelación lenta, han demostrado tener una alta tasa de supervivencia embrionaria: 85% en congelación lenta frente a 79,5% en vitrificación.

El hecho de que no muestren una diferencia significativa entre ellas nos permiten asegurar resultados, pudiendo elegir la técnica a seguir en función de la disponibilidad y la carga de trabajo del laboratorio. En este caso nuestros resultados no coinciden con lo publicado por varios autores que defienden una diferencia marcada a favor de la vitrificación (34). Habría que completar este trabajo viendo que no hay diferencias significativas en la tasa de embarazo entre ambas técnicas para poder poner a punto los protocolos persiguiendo la optimización de los recursos en base a los resultados.

CONCLUSIONES

1. No hay diferencias significativas en las tasas de embarazo de los ciclos con transferencia en fresco y los ciclos con embriones criopreservados
2. El uso de ciclos segmentados en pacientes en riesgo de SHO, previene dicha complicación, no disminuye la posibilidad de conseguir embarazo y evita la cancelación del ciclo
3. La introducción de la vitrificación como método de criopreservación no supone diferencias en la tasa de supervivencia embrionaria

BIBLIOGRAFÍA

1. Fertilidad SEFSE de. Estilo de vida y fertilidad / Lifestyle and Fertility [Internet]. Editorial Medica Panamericana Sa de; 2011. Recuperado a partir de: <http://books.google.es/books?id=boCypwAACAAJ>
2. Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Nyboe Andersen A, ESHRE Reproduction and Society Task Force. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Hum Reprod Update*. febrero de 2012;18(1):29-43.
3. Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science*. 26 de septiembre de 1986;233(4771):1389-94.
4. Hendershot GE, Mosher WD, Pratt WF. Infertility and age: an unresolved issue. *Fam Plann Perspect*. octubre de 1982;14(5):287-9.
5. Van Rooij IAJ, Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Looman CWN, Habbema JDF, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. marzo de 2003;79(3):482-8.
6. Te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. abril de 2002;8(2):141-54.
7. Porcu G, Lehert P, Colella C, Giorgetti C. Predicting live birth chances for women with multiple consecutive failing IVF cycles: a simple and accurate prediction for routine medical practice. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2013;11:1.
8. El-Toukhy T, Campo R, Sunkara SK, Khalaf Y, Coomarasamy A. A multi-centre randomised controlled study of pre-IVF outpatient hysteroscopy in women with recurrent IVF implantation failure: Trial of Outpatient Hysteroscopy - [TROPHY] in IVF. *Reprod Health*. 2009;6:20.
9. Tiboni GM, Colangelo EC, Leonzio E, Gabriele E. Assisted reproduction outcomes after embryo transfers requiring a malleable stylet. *J Assist Reprod Genet*. julio de 2012;29(7):585-8.
10. Chambers AE, Nayini KP, Mills WE, Lockwood GM, Banerjee S. Circulating LH/hCG receptor (LHCGR) may identify pre-treatment IVF patients at risk of OHSS and poor implantation. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2011;9:161.

11. Phillips JAS, Martins WP, Nastri CO, Raine-Fenning NJ. Difficult embryo transfers or blood on catheter and assisted reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* junio de 2013;168(2):121-8.
12. Spitzer D, Haidbauer R, Corn C, Stadler J, Wirleitner B, Zech NH. Effects of embryo transfer quality on pregnancy and live birth delivery rates. *J Assist Reprod Genet.* febrero de 2012;29(2):131-5.
13. Pacchiarotti A, Mohamed MA, Micara G, Tranquilli D, Linari A, Espinola SMB, et al. The impact of the depth of embryo replacement on IVF outcome. *J Assist Reprod Genet.* mayo de 2007;24(5):189-93.
14. Singh N, Gupta P, Mittal S, Malhotra N. Correlation of technical difficulty during embryo transfer with rate of clinical pregnancy. *J Hum Reprod Sci.* septiembre de 2012;5(3):258-61.
15. De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod Oxf Engl.* abril de 2012;27(4):954-66.
16. Fauser BCJM, Devroey P, Diedrich K, Balaban B, Bonduelle M, Delemarre-van de Waal HA, et al. Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online.* febrero de 2014;28(2):162-82.
17. Un nuevo trabajo científico analiza el riesgo de anomalías congénitas en bebés nacidos por Reproducción Asistida [Internet]. *Pregna.* [citado 13 de mayo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.pregna.com.ar/2012/05/un-nuevo-trabajo-cientifico-analiza-el-riesgo-de-anomalias-congenitas-en-bebes-nacidos-por-reproduccion-asistida/>
18. Mac Dougall K, Beyene Y, Nachtigall RD. «Inconvenient biology:» advantages and disadvantages of first-time parenting after age 40 using in vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl.* abril de 2012;27(4):1058-65.
19. Sharara FI, Scott RT Jr, Seifer DB. The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol.* septiembre de 1998;179(3 Pt 1):804-12.
20. Creus M, Peñarrubia J, Fábregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod Oxf Engl.* noviembre de 2000;15(11):2341-6.
21. Oehninger - 2_oehninger.pdf [Internet]. [citado 15 de mayo de 2014]. Recuperado a partir de: http://revista.samer.org.ar/numeros/2010/vol25_n1/2_oehninger.pdf

22. Azcona B, Campo G, Zabaleta J. Síndrome de hiperestimulación ovárica. *An Sist Sanit Navar.* enero de 2009;32:19-27.
23. Devroey P, Adriaensen P. OHSS Free Clinic. *Facts Views Vis ObGyn.* 2011;3(1):43-5.
24. Seyhan A, Ata B, Polat M, Son W-Y, Yarali H, Dahan MH. Severe early ovarian hyperstimulation syndrome following GnRH agonist trigger with the addition of 1500 IU hCG. *Hum Reprod Oxf Engl.* septiembre de 2013;28(9):2522-8.
25. Polyzos NP, Devroey P. Significantly lower ectopic pregnancy rates after frozen embryo transfer: implications toward segmentation of in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril.* diciembre de 2012;98(6):1419-20.
26. asebir2-100609061907-phpapp01.pdf [Internet]. [citado 26 de mayo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://s3.amazonaws.com/ppt-download/asebir2-100609061907-phpapp01.pdf?response-content-disposition=attachment&Signature=pKuvCLb1k7pjc4v407v12QN6ChU%3D&Expires=1401145406&AWSAccessKeyId=AKIAI6DXMWX6TBWAHQCC>
27. RapidVit Cleave 26119-03 dr2.indd - Product insert_RapidVit Cleave.pdf [Internet]. [citado 15 de mayo de 2014]. Recuperado a partir de: http://www.vitrolife.com/Global/Fertility/Products/Product-insert-pdfs/Product%20insert_RapidVit%20Cleave.pdf
28. RapidWarm Cleave 26120-03 dr2.indd - Product insert_RapidWarm Cleave.pdf [Internet]. [citado 15 de mayo de 2014]. Recuperado a partir de: http://www.vitrolife.com/Global/Fertility/Products/Product-insert-pdfs/Product%20insert_RapidWarm%20Cleave.pdf
29. Absalan F, Ghannadi A, Kazerooni M. Reproductive outcome following thawed embryo transfer in management of ovarian hyperstimulation syndrome. *J Reprod Infertil.* julio de 2013;14(3):133-7.
30. Pattinson HA, Hignett M, Dunphy BC, Fleetham JA. Outcome of thaw embryo transfer after cryopreservation of all embryos in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* diciembre de 1994;62(6):1192-6.
31. Mocanu E, Redmond ML, Hennelly B, Collins C, Harrison R. Odds of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) - time for reassessment. *Hum Fertil Camb Engl.* septiembre de 2007;10(3):175-81.
32. Tomás C, Alsbjerg B, Martikainen H, Humaidan P. Pregnancy loss after frozen-embryo transfer--a comparison of three protocols. *Fertil Steril.* noviembre de 2012;98(5):1165-9.
33. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* enero de 2013;99(1):156-62.

34. Levron J, Leibovitz O, Brengauz M, Gitman H, Yerushalmi GM, Katorza E, et al. Cryopreservation of day 2-3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. marzo de 2014;30(3):202-4.