

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Máster Universitario en Biología y
Tecnología de la Reproducción

“COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE
CICLOS FIV/ICSI EN TRANSFERENCIA DE
EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS”

Alumna:

Mariela Esther Andrade Euvín

Tutor:

Dr. Ángel Plácido Llaneza Coto

Junio 2014

AGRADECIMIENTO

Sin duda alguna, en primer lugar debo agradecer a Dios por haberme permitido el realizar una más de mis metas propuestas.

A mis padres y hermano, que a pesar de estar lejos, la distancia nunca fue un obstáculo para sentir su apoyo incondicional.

A mi prima, Graciela, que con su cariño y atención sentí el calor de familia muy de cerca.

A todo los docentes del máster que compartieron su tiempo y conocimientos para ayudar a nuestra formación, de manera muy especial al Dr. Plácido Llana Coto, mi tutor y ejemplo durante este periodo, y de quien me llevo los mejores conocimientos como profesional y ser humano.

A los buenos amigos que pude hacer durante este tiempo, que al final se convierten en la familia que uno escoge.

A todos, GRACIAS, es difícil estar lejos de casa y sentirse como en ella, pero por todos ustedes esto ha sido posible.

ABREVIATURAS

FIV-TE: Fertilización InVitro y Transferencia de Embriones

HOC: Hiperestimulación Ovárica Controlada

HMG: Gonadotropina Menopáusica Humana

hCG: Gonadotropina Coriónica Humana

LH: Hormona luteinizante

FSH: Hormona Folículo-estimulante

E₂: Estradiol

SHEO: Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

TEC: Transferencia de Embriones Congelados

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

INDICE GENERAL

INTRODUCCION	1
Infertilidad	1
Hiperestimulación Ovárica Controlada	1
Punción Folicular	4
Receptividad Endometrial	5
Valoración Endometrial	8
Preparación Endometrial para Transferencia de Embriones Congelados ..	8
Transferencia Embrionaria	9
Implantación Embrionaria	10
Criopreservación	11
Ciclos Segmentados	11
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
PRINCIPAL	13
SECUNDARIOS	13
MATERIALES Y METODOS	14
RESULTADOS	15
.....	21
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

INTRODUCCION

Infertilidad

Se estima que 15% de las parejas que viven en países industrializados son infértiles; es decir, tienen falla para concebir, en edad reproductiva, luego de 12 meses o más de coitos regulares sin anticoncepción. Durante la última década se ha incrementado la demanda de tratamientos de reproducción asistida porque se cree que ahora son más efectivos. (kably, y otros, 2012)

En las ultimas 3 décadas, la Fertilización InVitro y Transferencia de Embriones se ha convertido en el tratamiento más efectivo para las parejas infértiles; siendo las Técnicas de Reproducción Asistida las responsables del 1-3% de los nacimientos anuales. El mejorar la eficiencia terapéutica de FIV-TE depende de la adquisición de embriones de buena calidad y de una implantación exitosa en un endometrio receptivo. (Zhou F, 2009) (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Hiperestimulación Ovárica Controlada

El primer nacimiento por fertilización in vitro, en 1978, se logró en un ciclo natural. Las bajas tasas de embarazo ocasionaron que en 1982 se empezara a practicar la hiperestimulación ovárica controlada, al inicio con mínima estimulación con citrato de clomifeno complementado con Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG) y Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Un problema frecuente en este tipo de esquemas es que provocaba picos prematuros de hormona luteinizante (LH), que cancelaban los ciclos en 20 a 30% de los casos. (Peña, Gutiérrez, Luna, & Romero, 2010)

Esto explica la tendencia a recurrir a los ciclos naturales o con estimulación mínima, y se aúna a la necesidad de lograr endometrios más receptivos fisiológicamente. Se procura transferir menos embriones y mejorar esquemas de selección y criopreservación embrionaria. En los ciclos actuales de mínima estimulación, un excelente coadyuvante son los antagonistas de GnRH. (Peña, Gutiérrez, Luna, & Romero, 2010)

Con el pasar del tiempo, se ha desarrollado diferentes protocolos de HOC, basados en la administración de hormona Folículo-estimulante urinaria o recombinante con el fin de elevar los niveles séricos por encima de los necesarios para el desarrollo folicular por un periodo de tiempo prolongado, permitiendo así el desarrollo y maduración de no solo uno, sino de la cohorte completa de folículos que han alcanzado el estadio hormono-dependiente del desarrollo. Además de la FSH, la LH puede ser también administrada, aunque se ha demostrado que no es absolutamente necesaria para el desarrollo folicular. (Velandó., 2012) (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

La hiperestimulación ovárica es determinante en la obtención de resultados en reproducción asistida. Las opciones varían desde el ciclo natural y de mínima estimulación hasta la estimulación convencional con gonadotropinas diversas y análogos de GnRH. La tendencia es regresar a esquemas más viables para evitar complicaciones, que sean a la vez cómodos y accesibles; esto no significa que haya que sacrificar la efectividad, sino que hay que hacer una buena selección de casos y diseñar esquemas terapéuticos a la medida de las pacientes. (Peña, Gutiérrez, Luna, & Romero, 2010)

Está claro que los niveles supra-fisiológicos de estradiol son alcanzados inevitablemente durante la HOC lo que lleva al desarrollo de múltiples folículos ováricos, cada uno contribuyendo significativamente a la producción de E₂ la cual puede alcanzar niveles de hasta 10 veces o más a los alcanzados en ciclos espontáneos. (Mitwally, y otros, 2008)

El efecto de estos niveles supra-fisiológicos de E₂ en los resultados de FIV-TE has sido objeto de intensos debates con evidencia conflictiva. Algunos investigadores han demostrado que tienen una influencia perjudicial en la oogenesis, calidad embrionaria, receptividad del endometrio y en los resultados perinatales. Sin embargo, otros no encuentran dichos efectos. (Mitwally, y otros, 2008) (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Una serie de estudios han señalado que la HOC afecta el desarrollo ovocitario; demostrando que una recuperación >10 oocitos se correlaciona con una mala calidad de los mismos, así como tasas disminuidas de fertilidad. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Una complicación potencialmente letal de la HOC, la cual aparece en un 1-2% de las mujeres sometidas a tratamientos de FIV, es el llamado Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.

Este se asocia con concentraciones séricas excesivamente altas de E₂, lo cual podría explicar el bajo porcentaje de oocitos de buena calidad y bajas tasas de fertilización observados en pacientes con esta complicación. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Los efectos perjudiciales de las gonadotropinas exógenas sobre el desarrollo embrionario ha sido demostrado en modelos roedores, donde se ha observado que esta hiperestimulación interrumpe y retrasa el desarrollo desde embriones a blastocistos. Sin embargo, los estudios en humanos valorando estos posibles efectos perjudiciales son inconsistentes con los estudios en roedores; al comparar la calidad embrionaria entre ciclos naturales y los sometidos a FIV, se observó que no hay diferencias en las tasas de división, capacidad de desarrollo y grado de fragmentación del embrión. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Una señalización bidireccional entre el oocito y las células de la granulosa es necesaria para el desarrollo folicular y la adquisición de la competencia ovocitaria. La maduración nuclear y citoplasmática del oocito juegan un papel crucial que facilita la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. La exposición del oocito en desarrollo a concentraciones supra-fisiológicas de gonadotropinas puede perturbar la maduración y la finalización de la meiosis, llevando a aneuploidias cromosómicas en oocitos y/o embriones. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Algunos estudios realizados en roedores han demostrado que los tratamientos con estos fármacos contribuyen al aumento en la frecuencia de anormalidades cromosómicas. Cuando se comparan cigotos derivados de ciclos naturales con los obtenidos después de una hiperestimulación, estos últimos muestran una tasa aumentada de aberraciones cromosómicas en el pronúcleo femenino y desarrollo embrionario comprometido. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Aunque la edad materna avanzada es el único factor de riesgo identificado claramente para las aneuploidias cromosómicas en el embrión humano, un número de estudios han reportado altas tasas de aneuploidias cromosómicas y mosaicismos en embriones humanos de FIV. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Se ha sugerido que la hiperestimulación ovárica tiene un efecto epigenético sobre la foliculogénesis y gametogénesis por la posible interferencia con la vía de la homocisteína, un número de intermediarios de esta vía están directamente relacionados en procesos como en la

síntesis de ADN y proteínas, los cuales tiene un importante papel en la gametogénesis. También se ha demostrado que este tipo de estimulación altera el metabolismo del folato en el folículo el cual afectará posteriormente a la foliculogénesis. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

El particular desarrollo endometrial que ocurre en los ciclos de FIV se debe a diversos factores. Una exposición endometrial temprana y aumentada a la progesterona puede explicar tanto la transformación secretora temprana así como la subsecuente detención en la maduración glandular. (Devroey., 2003)

Existen algunas evidencias de que los niveles altos de E₂ resultantes de una HOC pueden afectar la receptividad endometrial al alterar la fase lútea del ciclo, que se ve traducida en la expresión prematura de pinopódos e integrinas. Una vez que se supera el nivel de umbral de estradiol, los receptores de progesterona pueden ser inducidos prematuramente provocando una sensibilidad aumentada a la progesterona, y por lo tanto un desarrollo secretor temprano del endometrio, todo esto se traduce en una asincronía glandular/estromal. La inyección de HCG para lograr la maduración de ovocitos, es otra posible causa de interrupción de la morfología del endometrio en la fase lútea. Por otro lado, se ha demostrado que la GnRH y sus agonistas tienen efectos anti-proliferativos sobre el endometrio. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010) (Devroey., 2003) (Roque, y otros, 2013)

Los mecanismos por los cuales se ejercen estos efectos perjudiciales luego de una HOC están aun pobremente entendidos, más estudios son necesarios para aumentar la seguridad de la hiperestimulación ovárica y para reducir los potenciales efectos sobre el desarrollo embrionario y la implantación, lo cual se traduciría en tasas de embarazo aumentadas y una descendencia sana. (Santos, Kuijk, & Macklon., 2010)

Punción Folicular

La punción folicular se efectúa por vía transvaginal y guiada con ecografía, lo que permite que el procedimiento se realice de forma ambulatoria con el uso de sedación leve. Para realizarla, se utiliza un transductor ecográfico vaginal que tiene una guía de punción por donde se introduce la aguja; esto permite ver los folículos, puncionarlos y aspirar el contenido, que luego es enviado al biólogo. (Remohí, Cobo, Romero, A, & Simón., 2005)

El momento más adecuado para realizar la punción es previo a la ovulación; de manera que se la programa 36 – 38 hrs después de la administración de la hCG. (Remohí, Cobo, Romero, A, & Simón., 2005)

En cuanto la preparación de la paciente, ésta debe estar en ayunas, con la vejiga vacía, y en posición de litotomía. Se administra sedación por vía intravenosa; una vez realizada la punción la paciente se mantiene en observación durante 2 horas para vigilar si aparecen complicaciones circulatorias, y administrar analgesia si es necesario. (Remohí, Cobo, Romero, A, & Simón., 2005)

Receptividad Endometrial

La receptividad endometrial se refiere a la habilidad del revestimiento uterino para aceptar y acomodar al embrión, resultando en un embarazo exitoso; consiste en la adquisición de ligandos de adhesión junto con la pérdida de componentes inhibitorios que pueden actuar como una barrera ante la presencia de un embrión por implantarse. El tiempo de máxima receptividad endometrial se conoce como “ventana de implantación” y se caracteriza por la expresión de varios productos endometriales, de los cuales los pinopódos, las integrinas y el factor inhibidor de leucemia son los mejores descritos. (Fontana, 2008) (Devroey., 2003)

La presencia de un útero receptivo es un factor importante en la determinación de la concepción. Para que se produzca la implantación, un óvulo fecundado llega a la cavidad uterina alrededor del día 17 y permanece allí hasta aproximadamente el día 19; luego ocurre la implantación entre el día 19 y 22. Un buen suministro de sangre hacia el endometrio suele considerarse como un requisito esencial para la implantación. (ElKattan, 2013)

Las hormonas esteroideas desempeñan un papel fundamental en la preparación del endometrio para la implantación. Los E₂ y P₄ son los moduladores dominantes en el desarrollo endometrial, condicionando al útero para la implantación. (Fontana, 2008) (Diedrich, Fauser, & Griesinger., 2007) (Lessey., 2003)

Tanto los compartimentos epiteliales y estromales expresan receptores de progesterona y estrógeno, y la respuesta depende de los niveles de estos receptores, así como de la concentración de las hormonas. (Lessey., 2003) (Ma, Song, Das, Paria, & Dey, 2003)

Es evidente que el patrón cíclico de la expresión de receptores es crucial para alcanzar una receptividad del endometrio e implantación exitosos. Aunque los estrógenos y progesterona son los moduladores clave para la maduración endometrial, sus roles en este proceso son complejos y sofisticados. La actividad hormonal no solo depende de los niveles de estrógenos o progesterona y sus receptores sino también de las tasas de metabolismo de estas hormonas; por ejemplo del up-regulation de las enzimas que convierten el estradiol en estrona o sulfato de estrona o eliminar el sulfato de estrona y E2. Las actividades de estas hormonas también están influenciadas por los efectos de co-activadores y represores. (Diedrich, Fauser, & Griesinger., 2007) (Punyadeera, Verbost, & Groothuis, 2003)

Adicionalmente a los estrógenos y progesterona, se conoce que un número de factores endocrinos median la función endometrial. En los roedores, se piensa que las prostaglandinas facilitan el aumento de la permeabilidad vascular durante la implantación. Aparentemente la hCG tiene efectos directos en el endometrio y su comunicación con el embrión mediante los receptores presentes en las células epiteliales. (Kodaman & Taylor., 2004) (Srisuparp S, 2003)

Algunas citoquinas se encuentran reguladas por estas hormonas y actúan a nivel autócrino-parácrino. Durante la fase folicular, el endometrio sometido a la acción de los estrógenos prolifera y crece. Luego, tras la ovulación, la secreción de progesterona va a producir importantes cambios en la morfología y función endometrial. Los cambios morfológicos clásicos descritos en el endometrio secretor son:

- Disminución progresiva de la mitosis
- Aparición de vacuolas, en el epitelio endometrial, ricas en glucógeno
- Edema en el estroma
- Decidualización e infiltración leucocitaria. (Fontana, 2008)

El endometrio está formado por cuatro componentes básicos: epitelio luminal, epitelio glandular, estroma y vasos. Durante el período peri-implantatorio se van a producir unas

modificaciones específicas que van a hacer que el endometrio sea receptivo para la anidación del blastocisto:

- Epitelio luminal: Es el lugar donde se produce el primer contacto entre blastocisto y endometrio. Estas células van a producir receptor para la interleuquina-1 (IL-1).
- Epitelio glandular: La secreción de las glándulas uterinas cambia cualitativamente y cuantitativamente durante este período.
- Células del estroma: a partir del décimo día post-ovulación las células del estroma sufren cambios morfológicos y funcionales (decidualización). Estas células crecen e inician la síntesis y secreción de prolactina, este proceso ocurre fisiológicamente independientemente de la presencia o no del embrión. Además producen durante este período "Insulin growth factor binding protein-I" (IGFBP-I) que aparece al día 4 post-ovulación y está regulada por la progesterona.
- Vasos: En los roedores la primera respuesta del endometrio al blastocisto es el aumento de la permeabilidad capilar en el lugar en que se producirá la invasión. Esta reacción está desencadenada por la producción local de prostaglandinas por células del epitelio y del estroma. (Fontana, 2008)

Niveles altos de andrógenos y estrógenos, como los que se observan en el Síndrome de Ovario Poliquístico y en la Hiperestimulación Ovárica Controlada, respectivamente, también pueden tener efectos perjudiciales en el endometrio, y por lo tanto en la implantación. (Srisuparp S, 2003)

La comparación de protocolos con agonistas y antagonistas de la GnRH y su relación con el impacto en la receptividad endometrial, aún permanecen en controversia. Sin embargo, nuevos enfoques para la evaluación de la receptividad endometrial han sido sugeridos por medio de la identificación de nuevos biomarcadores moleculares. Algunos estudios han proporcionado evidencia que ambos, agonistas y antagonistas de la GnRH, afectan ligeramente la receptividad endometrial en comparación con los ciclos naturales. En contraste, otros estudios han sugerido que los protocolos con antagonistas tienen un fuerte impacto en la expresión de genes relacionados en la receptividad endometrial humana, así como que los agonistas provocan retraso en este proceso. (Haouzi, y otros, 2010)

Valoración Endometrial

Hasta la fecha, se han realizado múltiples investigaciones acerca de la valoración directa de la receptividad uterina incluyendo datos histológicos, medición de receptores endometriales mediante métodos inmuno-histoquímicos, valoración de la expresión de pinopódos por medio del microscopio electrónico, y más recientemente el rol de las citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de integrina han sido estudiados. Aunque estos métodos son importantes para el fomento del entendimiento de la receptividad uterina, no son prácticos en los ciclos actuales de TE. (Martínez & Lindheim, 2012) (Amir W. , y otros, 2007)

Últimamente, algunos estudios han evaluado el efecto del grosor endometrial y las tasas de embarazo en pacientes sometidas a TRA. Los resultados obtenidos son controversiales. Algunos autores han demostrado una alta probabilidad de embarazo una vez que el endometrio ha alcanzado un grosor determinado; mientras que otros no encuentran una correlación significativa. (Amir W. , y otros, 2007)

Sin embargo, la medición del grosor endometrial y su patrón ecogénico, es una técnica fácil, no invasiva que ha sido usada para valorar la receptividad endometrial previa a la TE. Diversos autores se han referido a zonas discriminatorias, en donde un grosor endometrial por debajo de 7mm se asocia a no embarazos y por encima de 14 mm con una reducción significativa en las tasas de implantación y embarazo. (Amir W. , y otros, 2007)

Preparación Endometrial para Transferencia de Embriones Congelados

La sincronización exacta entre la maduración del endometrio y el desarrollo embrionario es crucial para una implantación exitosa. La preparación endometrial, en ciclos de transferencia de embriones congelados, se puede conseguir exitosamente en un ciclo natural después de una ovulación espontánea o después de la preparación artificial del endometrio mediante el uso de esteroides exógenos con el propósito de simular, lo más cercanamente posible, al perfil esteroideo ovárico normal. (Almeida, y otros, 2004) (Zhu, y otros, 2011) (Roque, y otros, 2013)

La preparación endometrial artificial se realiza mediante la administración de valerato de estradiol por vía oral con una dosis de 6mg/día desde el día 2 del ciclo menstrual (con o sin supresión hipofisaria previa) y que se continúa por 13-15 días. Luego de comprobar un grosor endometrial > 7 - 10mm mediante ultrasonografía, se inicia la administración de progesterona, a una dosis de 400mg dos veces al día, por 48-72 horas dependiendo del día de congelación de los embriones. (Zhu, y otros, 2011) (El-Toukhy, y otros, 2008)

Lo anterior indica que debe existir un tiempo óptimo de preparación para que ocurra la aparición de receptores de progesterona en el endometrio, y que manifiesten la transformación de un endometrio proliferativo a uno receptivo. Esta preparación, junto con la transferencia de embriones de buena calidad, son sucesos claves para el éxito en programas de transferencia de embriones congelados. (Almeida, y otros, 2004) (Diedrich, Fauser, & Griesinger., 2007)

Transferencia Embrionaria

Desde que se obtuvo el primer embarazo mediante FIV, algunos aspectos de este procedimiento han tenido progresos significativos. En contraste, la técnica de Transferencia de Embriones ha permanecido relativamente sin cambios. Este último pero crítico paso de la FIV, ha recibido poca atención hasta hace poco. Debido a que las bajas tasas de implantación han aumentado, dificultando así el éxito creciente de la FIV, el procedimiento de TE esta ahora bajo mayor escrutinio. Aunque la pobre calidad embrionaria o una receptividad endometrial subóptima pueden ser los responsables de fallos en la implantación, la técnica de transferencia en sí es ahora también reconocida como un determinante importante del éxito de la FIV. (Daisy Pezoa L., 2008) (Mains & Voorkis., 2010)

En general el procedimiento comienza colocando el espéculo en la vagina para visualizar el cérvix, el cual se limpia con solución salina o medio de cultivo. Adicionalmente el moco cervical puede ser aspirado usando una jeringuilla estéril. Luego de confirmar la identidad de la paciente, un catéter de transferencia es cargado con los embriones, éste es insertado a través del canal cervical hasta la cavidad uterina donde los embriones son depositados. El catéter es retirado y entregado al embriólogo para confirmar que no haya embriones retenidos. (Mains & Voorkis., 2010)

El objetivo de una TE exitosa es depositar embriones de forma atraumática en un lugar del útero donde la implantación sea máxima. Razones potenciales para una transferencia fallida incluyen disrupción del endometrio por el catéter, inducción de contracciones uterinas, depósito de embriones en un lugar subóptimo o daño a los embriones durante el proceso. (Mains & Voorkis., 2010)

La aplicación de la guía ecográfica (2D Transabdominal, 3D o 4D) para la TE ha sido descrita en más de 150 estudios clínicos, los que indican que la TE eco-guiada proporciona un beneficio en el aumento de las tasas de implantación y embarazos clínicos. (Martínez & Lindheim, 2012)

Implantación Embrionaria

La implantación embrionaria es una compleja serie de procesos que se conectan entre el tejido materno y embrionario, y que requiere un programa de preparación uterina y solamente se podrá llevar a cabo durante un periodo autolimitado de receptividad endometrial que ocurre entre los días 20 y 24 del ciclo menstrual denominado ventana de implantación (dependiente de hormonas ováricas); fuera de la misma el endometrio debe ser indiferente o aún hostil al embrión. Por este motivo es fundamental la existencia de un “diálogo” (interacción) sincronizado entre el endometrio receptivo y el blastocisto funcional que involucre la aparición de factores endócrinos, parácrinos y autócrinos. (Cervantes., 2009) (Fontana, 2008) (Genbacev, y otros, 2003) (Valles & Domínguez., 2004.)

El proceso de implantación embrionaria ha sido dividido básicamente de tres etapas: aposición, adhesión e invasión. Dicho evento representa el paso más crítico del proceso reproductivo en muchas especies. Es considerado el único fenómeno biológico por el cual el embrión en estadio de blastocisto se conecta íntimamente a la superficie del endometrio materno para formar la placenta que proveerá una interfase entre el feto en desarrollo y la circulación materna. (Cervantes., 2009) (Fontana, 2008) (Valles & Domínguez., 2004.)

Al inicio de la gestación, sobre todo en las especies con implantación invasora, el estroma uterino se remodela de manera muy importante: sucede la diferenciación de células fibroblasto-estromales en células de la decidua. Los lípidos, como moléculas de señalización, tienen diversas

vías, con función importante durante el proceso de decidualización. La decidua mantiene una red vascular para la nutrición e intercambio de gases necesarios para el desarrollo embrionario, antes de establecer la función de la placenta. (Cervantes., 2009) (Valles & Domínguez., 2004.)

Los eventos iniciales que ocurren entre el trofoblasto y el endometrio uterino materno han sido motivo de muchos estudios, que permiten poner de manifiesto la diversidad en las estrategias de implantación y placentación de las especies; así como el descubrimiento de la sincronía que debe existir entre los mecanismos fisiológicos, hormonales, celulares, moleculares y genéticos que permiten la interacción entre el embrión y el endometrio, para formar la unidad fetoplacentaria. (Cervantes., 2009) (Genbacev, y otros, 2003) (Valles & Domínguez., 2004.)

Criopreservación

La criopreservación de gametos humanos y embriones es una técnica exitosa en las TRA que conlleva a un aumento en los resultados acumulados mientras que disminuye los costes. Esto es porque este enfoque limita el número de embriones transferidos, mientras que los oocitos/embriones supernumerarios pueden ser usados en ciclos subsecuentes. (Zhou F, 2009) (Kovalevsky & Patrizio., 2005) (Al-Hasani, y otros, 2007)

Aunque hay información indicando que mejor tasas de supervivencia después de la criopreservación mediante el método de congelación lenta, este método está cada vez más discontinuado. La vitrificación de embriones humanos, especialmente en estadios tempranos, se ha convertido en una alternativa preferida ante el método de congelación lenta, debido a la falta de formación de cristales de hielo y a los resultados clínicos y de laboratorio reportados. (Tahani Al-Azawi, 2013)_(Zhou F, 2009)_(Kovalevsky & Patrizio., 2005)_(Al-Hasani, y otros, 2007)_(Zhu, y otros, 2011)

Ciclos Segmentados

Se discute mucho la posibilidad de segmentar los ciclos, posponiendo la transferencia de embriones en fresco con la alternativa del uso de embriones congelados. El endometrio humano se somete a una serie de cambios proliferativos y secretores complejos en cada ciclo menstrual y presenta solo un pequeño periodo de receptividad (ventana de implantación), necesario para la

implantación del blastocisto en el útero. Los cambios morfo-funcionales durante este periodo pueden prevenir o dificultar la implantación. En los ciclos de FIV/ICSI esta receptividad ya se ha visto afectada por los niveles supra-fisiológicos de hormona. (Tahani Al-Azawi, 2013)

El segmentar un ciclo de FIV/ICSI para realizar una transferencia de un embrión congelado es beneficioso en casos de respuesta excesiva a hiperestimulación ovárica controlada. Se conoce que una implantación exitosa y buenos resultados en las tasas de embarazo dependen de un buen embrión y de un endometrio receptivo con un dialogo sincronizado entre los tejidos maternos y embrionarios. (Tahani Al-Azawi, 2013)

Un embrión de buena calidad se relaciona con la edad de la paciente, calidad de los gametos, del programa de hiperestimulación ovárica controlada y la efectividad de los sistemas de cultivo. Sin embargo, las tasas de embarazo y nacimientos después de un programa de FIV siguen siendo bajas, de cada 3 ciclos 2 fallan para embarazo y más de 8 de cada 10 transferencias de embriones fallan para la implantación. (Tahani Al-Azawi, 2013) (Zhou F, 2009) (Kovalevsky & Patrizio., 2005)

Por lo tanto, es importante mejorar el uso de embriones. Se ha reportado que la receptividad endometrial en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos en los ciclos de hiperestimulación ovárica controlada tiene peores resultados que en ciclos naturales. Ciclos de reemplazo hormonal similares a los naturales han sido utilizados para la transferencia de embriones congelados para evitar esos efectos deletéreos antes mencionados. (Zhou F, 2009)

Por lo tanto, las tasas de implantación embrionaria, embarazo clínico y embarazos múltiples podrían ser más altas utilizando protocolos con embriones congelados/descongelados en lugar de transferencia con embriones frescos. (Zhou F, 2009)

HIPOTESIS

La preparación endometrial en los ciclos de transferencia de embriones congelados resulta más fisiológica que en los ciclos en fresco y por tanto la transferencia con embriones congelados refleja tasas más altas de implantación y de gestación evolutiva en comparación con la transferencia de embriones en fresco.

OBJETIVOS

PRINCIPAL

- Evaluar la tasa de gestaciones evolutivas (presencia de embrión intrauterino con LCF positivo entre la semana 6-7 de gestación) en ciclos de frescos y congelados.

SECUNDARIOS

- Comparar la tasa de embarazo entre los ciclos con Transferencia de Embriones en Fresco vs Congelados.
- Determinar si el día de transferencia influye en la tasa de embarazo en ciclos con Transferencia de Embriones en Fresco vs Congelados.
- Observar si el valor promedio de estradiol alcanzados en el último control del ciclo de estimulación Ovárica Controlada (1 o 2 días previos a la administración de Ovitrelle) influye en los resultados de los ciclos en fresco.
- Estudiar la influencia que tiene los valores séricos de estradiol en las tasas de embarazo y en relación a la edad.

MATERIALES Y METODOS

Estudio de tipo descriptivo y diseño no experimental, comparativo, retrospectivo que incluye a las pacientes que acudieron a la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias para realizarse tratamientos de FIV/ICSI y posterior Transferencia Embrionaria (frescos y congelados), durante el periodo 2012-2013.

El universo de estudio lo constituyeron todas las pacientes atendidas en la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA durante el periodo 2012-2013; mientras que la muestra la conformaron las pacientes sometidas a tratamientos de FIV/ICSI y posterior Transferencia Embrionaria (frescos y congelados) en el mismo periodo de tiempo.

La lista de pacientes a estudiar se obtuvo del sistema informático del hospital (SARA) y de las carpetas en el área de estadística. Una vez obtenida la información necesaria fue almacenada en una hoja de Excel, posteriormente se realizó la tabulación de datos y el análisis estadístico mediante el programa SPSS, utilizando la Chi Cuadrada de Pearson y T de Student para establecer la significancia estadística.

Criterios de inclusión.

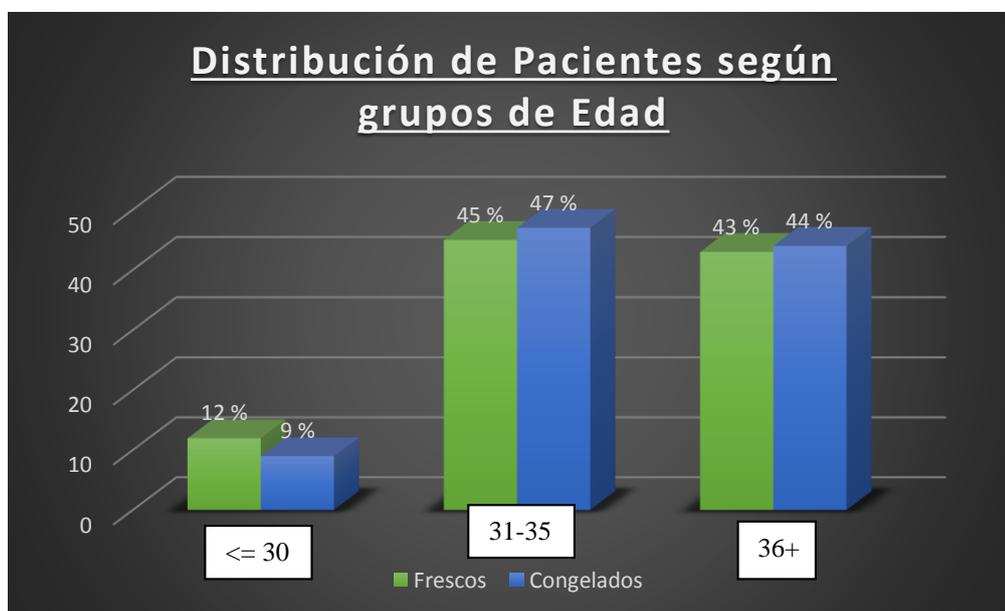
- Mujeres menores de 41 años que acudieron a la Unidad de Reproducción Asistida (HUCA) durante el año 2013
- Mujeres sometidas a FIV/ICSI con posterior Transferencia Embrionaria (frescos/congelados) durante el año 2013

RESULTADOS

La muestra de estudio (n) estuvo conformada por un total de 335 pacientes que acudieron al Área de Reproducción Asistida del HUCA durante el año 2013. Ésta se dividió en dos grupos según el tipo de Transferencia Embrionaria: 1) TEF, conformado por 245 pacientes y 2) TEC, por 90 pacientes.

Al estudiar la variable de edad en las pacientes de la muestra y agruparlas se observó que en el grupo de mujeres <30 años hubo un 9% (TEC) y 12% (TEF), en el grupo de 31-35 años, 47% (TEC) y 45% (TEF) y por último en el grupo de mujeres de 36 años o más, 44% (TEC) y 43% (TEF). En ambos grupos el mayor número de pacientes se encontraban entre los 31 y 35 años.

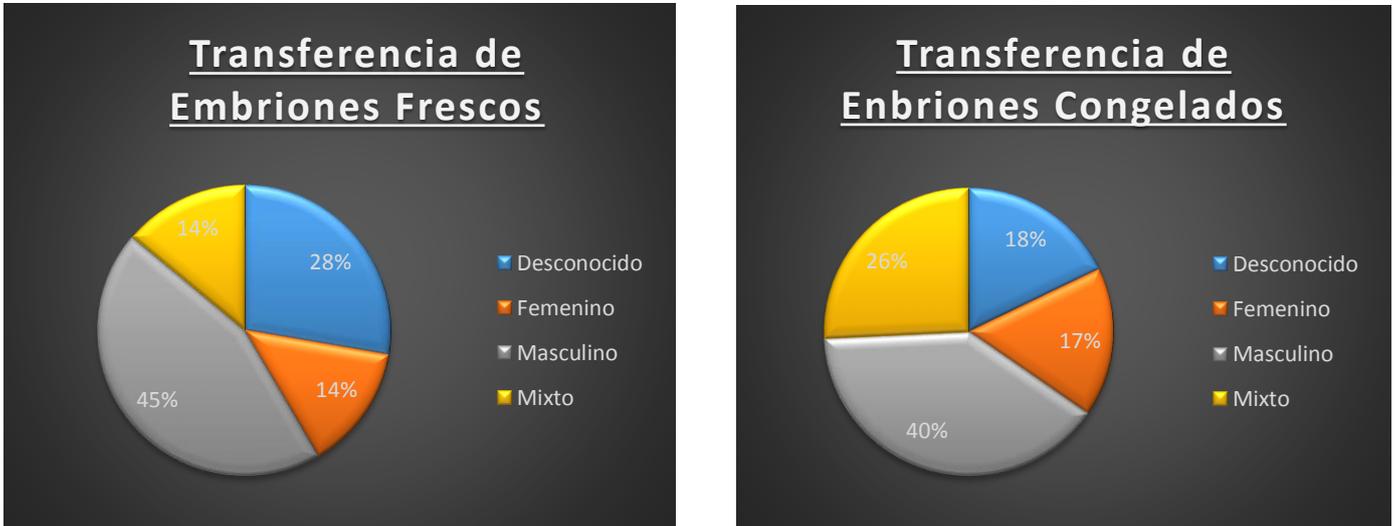
Figura 1



En ambos grupos estudiados el Factor de Esterilidad que predominó fue el Masculino con un 45% (111) para la TEF y un 40% (36) para la TEC; los siguientes grupos representaron una minoría reflejando los siguientes resultados: Causa desconocida: TEF 28% (68) y TEC 18% (16); Factor Femenino: TEF: 14% (33) y TEC 17% (15) y Factor Mixto: TEF 14% (33) y TEC 26% (23).

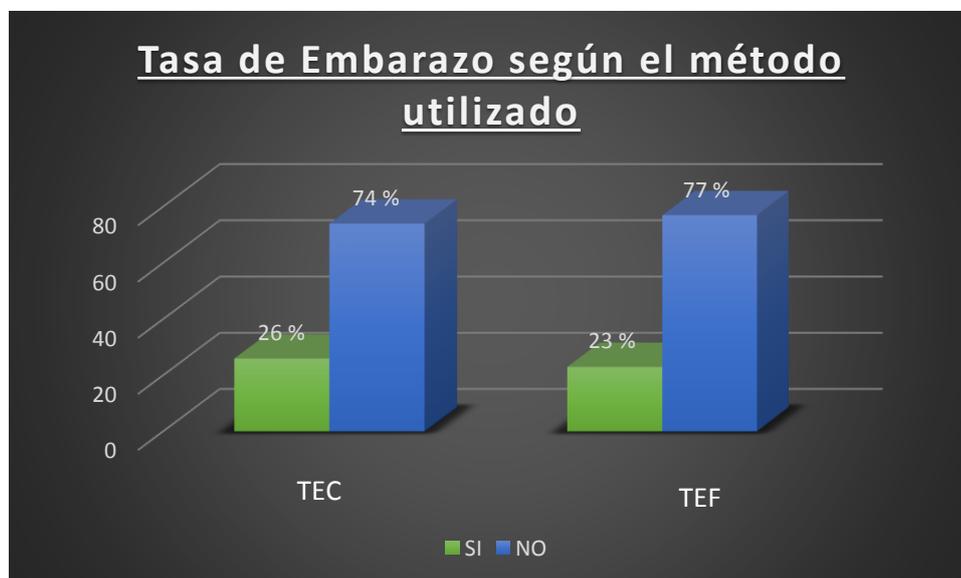
Figura 2

Distribución de Pacientes según el Factor de Esterilidad



Al valorar la tasa de embarazo según el método utilizado se observa que en el grupo de TEF es de 23% (57) mientras que en el grupo de TEC es de 26% (23). A pesar que hay una diferencia en el porcentaje estadísticamente este valor es no significativo (Chi-cuadrado de Pearson: 0.663)

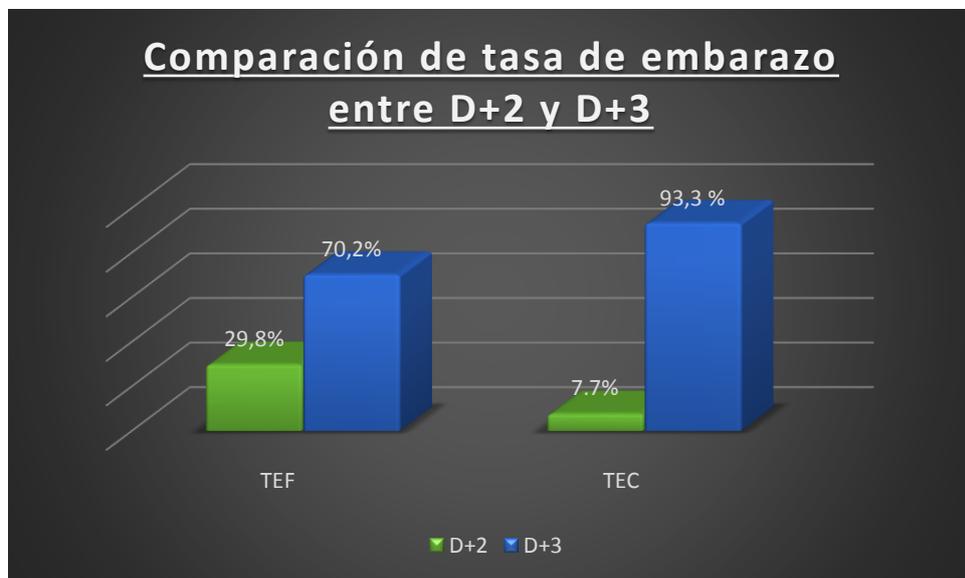
Figura 3



Al valorar la tasa de embarazo según el día de transferencia en ambos grupos de estudio se obtuvieron los siguientes resultados:

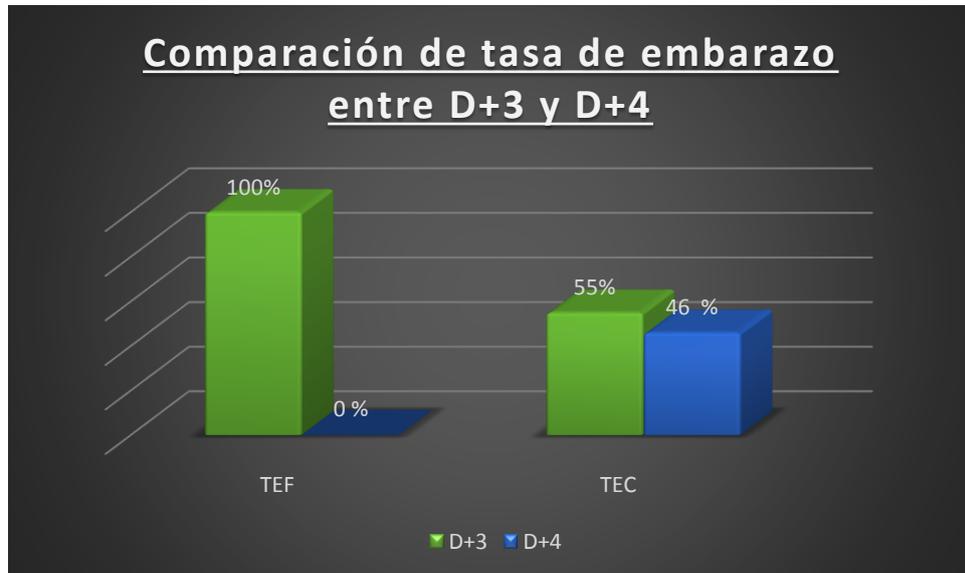
- D+2 vs D+3: mayor tasa de embarazo en D+3 en los dos grupos; 70.2% y 93.3%, TEF y TEC respectivamente. Con una Chi-cuadrado de Pearson (p) de 0.099

Figura 4



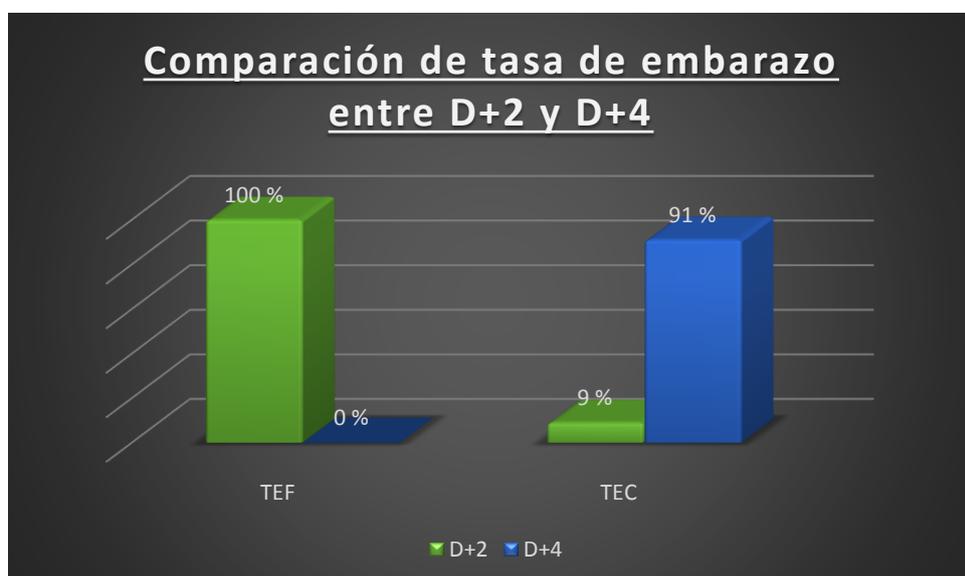
- D+3 vs D+4: en las Transferencias de Embriones en Fresco no se realizó ninguna en D+4, por lo tanto no se pudo calcular significancia estadística al tener un valor de 0. En el D+3 se observó un 100% de embarazos para TEF y un 54.5% para TEC.

Figura 5



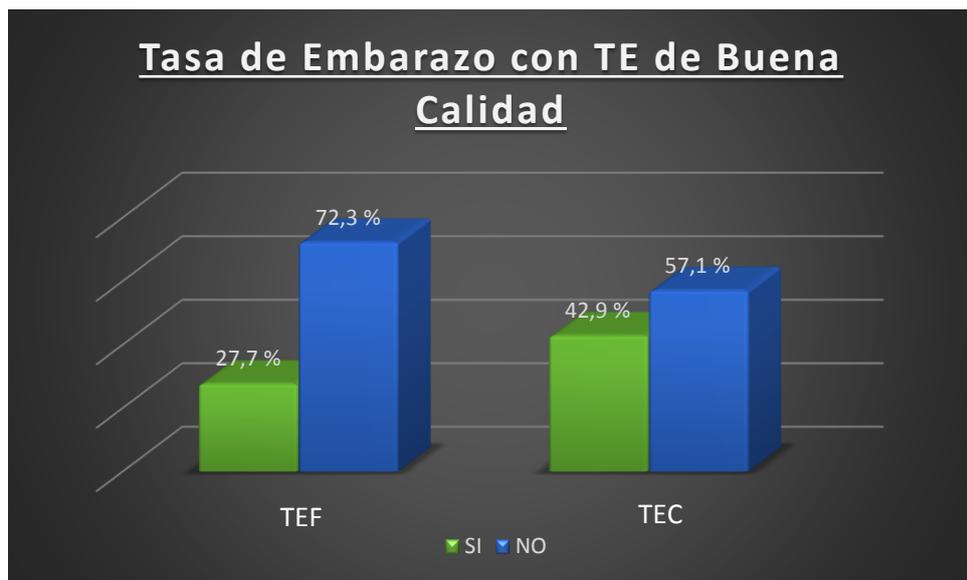
- D+2 vs D+4: Igual que el grupo anterior no se pudo calcular significancia estadística al tener un valor de 0. En el D+2 la tasa de embarazo fue del 100% para la TEF y del 9% para la TEC.

Figura 6



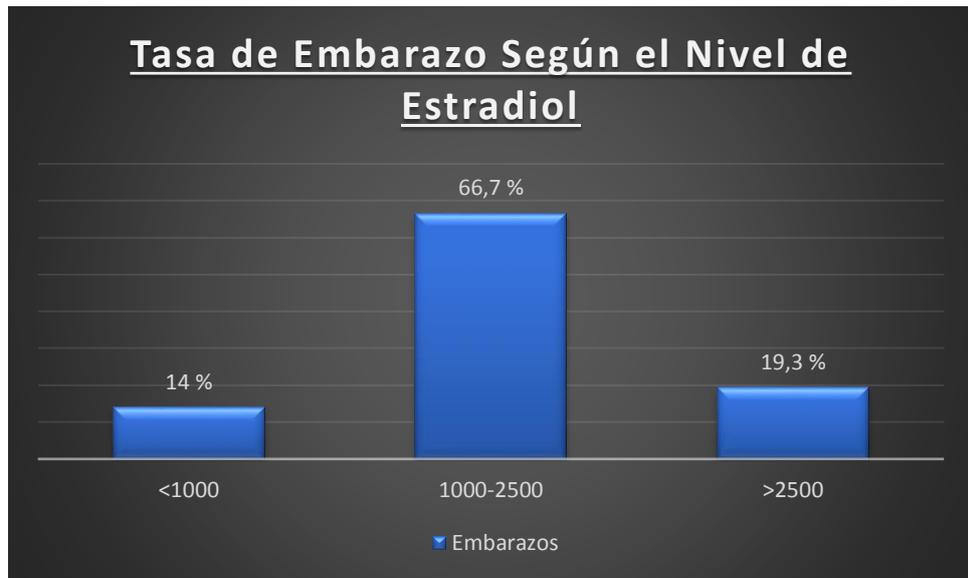
Debido a que generalmente se transfiere más de 1 embrión, se calificó a una transferencia con embriones de buena calidad si por lo menos había uno de calidad A y se obtuvieron los siguientes resultados: en las TEF la tasa de embarazo fue de 27.7% (33) y en las TEC fue de 42.9% (9). Estos resultados fueron estadísticamente no significativos, siendo la Chi-cuadrado de Pearson (p) de 0.163

Figura 7



Al dividir las pacientes a las que se les realizó la TEF según los niveles séricos de estradiol en 3 grupos y valorar la tasa de embarazo y el promedio del grosor endometrial, se observó lo siguiente: $E_2 < 1000$, 14% y 7.5 mm, respectivamente. $E_2 1000 - 2500$: 66.7% y 11 mm. $E_2 > 2500$: 19.3% y 10.4 mm.

Figura 8



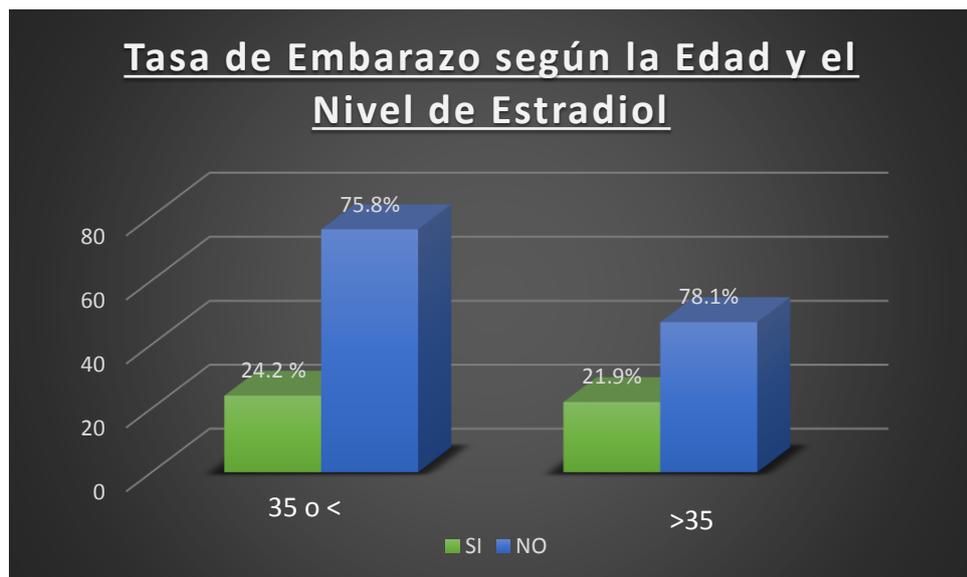
Las pacientes que obtuvieron embarazo por medio de Transferencia de Embriones en Fresco fueron el 23% (57) y tuvieron una media de Estradiol Sérico de 1703.56, con una desviación típica de 719.435. El 77% de las pacientes de este grupo no consiguieron embarazo, y alcanzaron una media de Estradiol Sérico de 1618.21, con una desviación típica de 769.096. Al realizar la Prueba T para la igualdad de medias se obtuvo el valor de 0.457.

Tabla I

Estradiol Sérico	Embarazo	N	Media	Desviación típ.	Error
					típ. de la media
	si	57	1703,56	719,435	95,291
	no	188	1618,21	769,096	56,092

Al clasificar las mujeres estudiadas del grupo de TEF según su edad y valorar la tasa de embarazo se observó que en aquellas pacientes con 35 años o menos tuvieron un 24.2% de embarazos con una media de estradiol sérico de 1645.37 pg/ml; mientras que en mujeres mayores de 35 años fue de 21.9% y la media de estradiol sérico de 1628,32 pg/ml. La Chi cuadrado de Pearson (p) fue de 0.662.

Figura 9



Al analizar el grosor endometrial en las pacientes de TEF según su edad, no se observó gran diferencia. En las mujeres con 35 años o menos la media de éste valor fue de 10.7 mm mientras que en las mayores de 35 años fue de 11 mm.

DISCUSIÓN

Es bien conocido que una implantación embrionaria exitosa, y como resultado, la tasa de embarazo depende de un embrión competente y de la receptividad del endometrio con un diálogo sincronizado entre los tejidos maternos y embrionarios. Con respecto a un embrión competente o de buena calidad, esto está relacionado con la edad de la paciente, a la Hiperestimulación Ovárica Controlada y a la efectividad de los sistemas de cultivo in vitro. (Rahim, Devroey, Diedrich, & Al-Hasani, 2010)

Mientras que factores que afectan la calidad del embrión fueron optimizados, la tasa de implantación no alcanzaban los niveles deseados. Esto llevó a culpar a la receptividad endometrial, la cual se ve afectada por los niveles supra-fisiológicos de hormona. Por otro lado, los métodos de criopreservación, han sido mejorados para dar casi iguales resultados que el estado en fresco. Todo esto lleva a optar por la cancelación de ciclos de transferencia de embriones en fresco y hacer uso de embriones congelados en casos de respuesta excesiva a la Hiperestimulación Ovárica Controlada. (Rahim, Devroey, Diedrich, & Al-Hasani, 2010) La preparación del endometrio, en ciclos de transferencia de embriones congelados, mediante el uso de protocolos de reemplazo hormonal se ha desarrollado con el propósito de simular, lo más cercanamente posible, al perfil esteroideo ovárico normal. (Almeida, y otros, 2004)

En un estudio realizado por Bruce Shapiro (Las Vegas, 2011) en donde comparó las tasas de éxito entre la TEF luego de una hiperestimulación ovárica controlada y la TEC después de la preparación artificial del endometrio. Se incluyeron 53 pacientes para el grupo de Transferencia de Embriones en Fresco y 50 para el grupo de Transferencia de Embriones Congelados, todas normo-respondedoras y <41 años. En los resultados se observó que las tasas de embarazo clínico e implantación fueron significativamente más altas en el grupo de TEC; pudiendo concluir que la receptividad endometrial se encuentra alterada en los ciclos de TEF después de una Hiperestimulación Ovárica Controlada al ser comparado con los ciclos de TEC. (Shapiro, y otros, 2011)

Un estudio retrospectivo realizado en Barcelona (2007- 2009), en el que se incluyeron 508 ciclos correspondientes en donde se diferenciaron dos grupos: en el grupo I: transferencia de embriones en fresco (TE) y en el grupo II: transferencia de embriones congelados (TEC). Se consideraron número de óvulos recuperados, número de óvulos fertilizados, tasas de embarazo, presencia de SHO y edad. Se realizaron 435 transferencias en fresco (85,6%) y 73 transferencias de embriones congelados (14,4%). La tasa de embarazo en el grupo I fue de 47,58% y en el grupo II de 38,35%. No se observaron diferencias significativas en cuanto a tasas de embarazo y entre las TE y las TEC, con lo que recurrir a la congelación de embriones en las pacientes con riesgo de hiperestimulación resulta la mejor opción ya que no disminuye su potencial de embarazo y evita la evolución del síndrome. (Manzur, Canals, Lafuente, López, & Mario, 2010)

En nuestro estudio, al comparar la tasa de embarazos entre el grupo de transferencia de embriones frescos vs congelados se observó que no había diferencia significativa entre ambos; siendo los resultados 23% y 26%, respectivamente. Las pacientes incluidas en nuestra muestra no eran exclusivamente normo-respondedoras como las pacientes del estudio publicado por (Shapiro, y otros, 2011); sin embargo nuestra muestra y resultados, son un poco más similares a las del estudio retrospectivo citado por Manzur, ambos arriba mencionado.

Se realizó una revisión sistemática y meta-análisis realizados en Barcelona por Roque M y colaboradores (2013) con el objetivo de examinar la evidencia disponible para valorar si la criopreservación de embriones y la posterior transferencia permiten obtener mejores resultados en comparación con la transferencia de embriones en fresco; los parámetros que fueron de mayor interés incluían tasa de embarazo viable, embarazo clínico y aborto. Los 3 estudios clínicos incluían 633 ciclos en mujeres de 27-33 años, el análisis de los datos mostró que la Transferencia de Embriones Congelados resultaba en tasas de embarazos viables y clínicos significativamente más altas; sugiriendo así, que se puede obtener una mejor sincronía entre el embrión y el endometrio en ciclos de TEC. (Roque, y otros, 2013)

Los niveles supra-fisiológicos de estrógenos producidos durante tratamientos de Fertilización In Vitro han sido considerados durante algunos años que afectan adversamente a la implantación. (Liu, y otros, 2014)

Mitwally publicó en el 2006 una cohorte de 270 pacientes en donde valoró los niveles de E₂ producidos durante la Hiperestimulación Ovárica Controlada desde el primer día hasta el momento de la administración de la hCG y los resultados de FIV-TE. Observó que aquellos ciclos con bajos y altos niveles de hormona tuvieron significativamente menos tasas de embarazo particularmente en mujeres de 35 años o mayores. Concluyendo así que estos niveles se correlacionan con los resultados clínicos pero teniendo en cuenta la edad de la mujer, aquellas por encima de 35 años parecían ser más vulnerables a los altos niveles hormonales. (Mitwally, y otros, 2008) En nuestro estudio, al agrupar las pacientes por grupo de edad, pudimos observar que en aquellas pacientes con 35 años o menos hubo un ligero aumento en la tasa de gestación (24.2%) en comparación a las mujeres mayores de 35 años (21.9%); sin embargo este resultado no fue significativo estadísticamente (p= 0.662). En ambos grupos el promedio de estradiol sérico, que en este caso se midió antes de la administración de la hCG fue similar en ambos grupos (1645,37 y 1628,32, respectivamente)

Parece ser que el grosor endometrial es una pieza clave en las tasas de embarazo obtenidas en pacientes sometidas a Técnicas de Reproducción Asistida, con influencia de otros factores como la edad; así lo reporta Amir W. , y otros (2007) en un estudio retrospectivo realizado en Israel, donde se realizó la medición del grosor endometrial mediante ultrasonografía transvaginal en el día de la administración de la hCG en pacientes sometidas a Fertilización In Vitro.

Entre los resultados, se observó que este parámetro disminuye en función de la edad de la paciente. El endometrio más grueso fue encontrado en mujeres <25 años (11.9 ± 2.5 mm), y el más fino en mujeres >40 años (9.6 ± 2.3 mm); concluyendo así que las posibilidades de conseguir un endometrio grueso en mujeres > 40 años son más bajas que aquellas más jóvenes y que un endometrio grueso esta correlacionado con tasas más altas de embarazo solo en pacientes más jóvenes. En nuestro estudio se tomó en cuanto a las pacientes que se les realizó Transferencia de Embriones en Fresco y que se midió el grosor endometrial por la misma vía pero 2 -4 días antes de la TE, y se observó que las mujeres de ambos grupos de edad (35 años o < / >35 años) tuvieron un promedio de grosor endometrial similar, 10.7mm y 11mm, respectivamente.

Tradicionalmente la transferencia de embriones se realizaba 2 días después de la recuperación de los ovocitos; sin embargo, los desarrollos en los medios de cultivo han permitido que los embriones se mantengan en el cultivo durante períodos más prolongados, lo que permite

un mayor desarrollo del embrión in vitro. Se ha sugerido que un tiempo más prolongado en el cultivo mejora la exactitud de la selección de los embriones de mejor calidad para la transferencia, ya que en este momento existen características morfológicas adicionales disponibles. La demora de la transferencia un día más puede aumentar la probabilidad de la implantación con éxito y también mejorar la diferenciación endometrial, lo que se acerca un poco más a la situación natural en que el embrión llega al útero de 4 a 5 días después de la ovulación. (Oatway, Gunby, & S, 2008)

Se realizó una revisión Cochrane, con el objetivo de determinar si existen diferencias en las tasas de nacidos vivos y de embarazo cuando la TE se realiza en el tercer día, en comparación con el segundo día, en parejas estériles que reciben el tratamiento de FIV, incluida la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Se incluyeron 10 estudios que enrolaron 2027 mujeres, pero solamente 3 estudios informaron las tasas de nacidos vivos y 4 informaron las tasas de embarazos en curso. Los odds-ratios agrupados (tercer día en comparación con el segundo día) fueron 1,07; IC del 95%: 0,84 a 1,37 para los nacidos vivos y 1,05; IC del 95%: 0,83 a 1,32 para los embarazos en curso. De diez estudios, el odds-ratio agrupado para el embarazo clínico fue de 1,26; IC, de 95%: 1,06 a 1,51. Como conclusión, aunque se demostró un aumento de la tasa de embarazo clínico con la transferencia de embriones al tercer día, actualmente no existen pruebas suficientes de buena calidad que sugieran una mejoría en los nacidos vivos cuando la transferencia de embriones se demora desde el segundo al tercer día. (Oatway, Gunby, & S, 2008)

Respecto a la revisión recién mencionada y al compararla con nuestra investigación, podemos decir que las conclusiones son similares, ya que nuestros resultados también revelan que las tasa mayores de embarazo se encuentran al realizar transferencias de embriones en día 3 en ambos grupos (TEF y TEC), con los siguientes porcentajes 70.2% y 93.3%, respectivamente.

CONCLUSIONES

- La tasa de embarazos en el grupo de Transferencia de embriones congelados es ligeramente mayor que en el grupo de frescos, pero no estadísticamente significativo.
- La transferencia de embriones en D+3 resulta en una mayor tasa de embarazo tanto en Transferencia de Embriones Frescos como Congelados.
- Cuando existe niveles séricos de Estradiol más próximos a los valores fisiológicos se observa mayor tasa de embarazo.
- En mujeres menores de 35 años existe un ligero aumento en la tasa de embarazo, a pesar que no es estadísticamente significativo, demostrando que tal vez estas pacientes toleran más los niveles supra-fisiológicos de hormona.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hasani, S., Ozmen, B., Koutlaki, N., Schoepper, B., Diedrich, K., & Schultze-Mosgau., A. (2007). Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online*, 288-293.
- Almeida, M. L., Llata, E. S., Resendiz, V. B., Haliscak, R. S., Vega, P. G., & Ayup., S. H. (2004). Grosor endometrial y predicción del embarazo en reproducción asistida. *Ginecol Obstet Mex*, 72, 116-119.
- Amir, W., Micha, B., Ariel, H., Liat, L., Jehoshua, D., & Adrian., S. (2007). Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 87(4), 799-884.
- Amir, W., Micha, B., Ariel, H., Liat, L.-G., Jehoshua, D., & Adrian., S. (2007). Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology. . *Fertility and Sterility*, 799-804.
- Cervantes., R. E. (2009). Los esfingolípidos en la implantación embrionaria. *Ginecol Obstet Mex*, 77(9), 428-435.
- Daisy Pezoa L., J. S. (2008). EFECTO DEL REPOSO POST-TRANSFERENCIA EMBRIONARIA TRANSCERVICAL EN LA TASA DE EMBARAZO. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 73(5), 303 – 307.
- Devroey., C. B. (2003). The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Human Reprod Update*, 9(6), 515-522.
- Diedrich, K., Fauser, B., & Griesinger., P. D. (2007). The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update.*, 13(4), 365-377.
- ElKattan, E. A. (2013). Ultrasonographic markers of endometrial receptivity of letrozole and clomiphene citrate in unexplained infertile women. *Mid East Fertil Soc J.*, 84-88.
- El-Toukhy, T., Coomarasamy, A., Khairy, M., Sunkara, K., Seed, P., Khalaf, Y., & Braude, P. (2008). The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*, 89(4), 832-839.
- Fontana, V. A. (2008). “Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embriionario. *Rev Química Viva*(2).
- Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., Krtolica, A., Ilic, D., Singer, M., . . . Fisher., S. (2003). Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, 405–408.

- Haouzi, D., Assou, S., Mahmoud, K., Tondeur, S., Rème, T., Hedon, B., . . . Hamamah., S. (2010). Controlled Ovarian Hyperstimulation for In Vitro Fertilization Alters Endometrial Receptivity in Humans: Protocol Effects. *Biol of Reprod*, 82, 679–686.
- kably, A., salazar, C., Serviere, C., Velázquez, Pérez, E., Santos, R., . . . Gaviño, F. (2012). Consenso Nacional Mexicano de Reproducción Asistida. *Rev Mex Rep*, 5(2), 68-113.
- Kodaman, P., & Taylor., H. (2004). Hormonal regulation of implantation. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 745– 766.
- Kovalevsky, G., & Patrizio., P. (2005). High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril*, 325-330.
- Lessey, B. A. (2011). Assessment of Endometrial Receptivity. *Fertility and Sterility*, 96(3), 522-529.
- Lessey., B. (2003). Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*, 809-815.
- Liu, L., Tong, X., Jiang, L., Li, T., Zhou, F., & Zhang., S. (2014). 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)*, 127(5), 911-915.
- Ma, W., Song, H., Das, S., Paria, B., & Dey, S. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sc*, 2963–2968.
- Mains, L., & Voorkis., B. V. (2010). Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertil Steril*, 94(3), 785-790.
- Manzur, P., Canals, J., Lafuente, R., López, G., & Mario, B. (2010). Eficacia de la Transferencia de Embriones Congelados en 471 pacientes con riesgo de hiperestimulación ovárica. *Fertilidad*, 383-388.
- Martínez, A. M., & Lindheim, S. R. (2012). *Optimizing Embryo Transger outcomes: Determinants for improved Outcomes using the oocyte donation model*. . Obtenido de <http://www.intechopen.com/books/advances-in-embryo-transfer/optimizing-embryo-transfer-outcomes-determinants-for-improved-outcomes-using-the-oocyte-donation-mod>
- Mitwally, M. F., Bhakoo, H. S., Crickard, K., Sullivan, M. W., Batt, R. E., & Yeh, J. (2008). Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment

- outcome in women undergoing in vitro fertilization – embryo transfer. *Fertil Steril*, 86(3), 588-596.
- Oatway, C., Gunby, J., & S, D. (2008). Transferencia de Embriones al tercer día versus al segundo día después de la fertilización in vitro o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. *Biblioteca Cochrane Plus*.
- Peña, E. P., Gutiérrez, A. G., Luna, E. P., & Romero, F. R. (2010). Estimulación ovárica controlada. Tiempo de reevaluar. *Rev Mex de Med Rep*, 3(1), 1-9.
- Punyadeera, C., Verbost, P., & Groothuis, P. (2003). Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 393-410.
- Rahim, A., Devroey, P., Diedrich, K., & Al-Hasani, S. (2010). Cancellation of fresh embryo transfer: A future perspective. *Mid E Fertil Soc J*, 15, 240-242.
- Remohí, J., Cobo, A., Romero, J., A, A. P., & Simón., C. (2005). *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. (Segunda Edición ed.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Roque, M., Lattes, K., Serra, S., Solà, I., Geber, S., Carreras, R., & Checa., M. A. (2013). Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 99(1), 156-162.
- Santos, M., Kuijk, E., & Macklon., N. (2010). The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction*, 23-24.
- Shapiro, B., Daneshmand, S., Garner, F., Aguirre, M., Hudson, C., & Thomas., S. (2011). Evidence of impaired endometrial receptivity after ovaria stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril*, 96(2), 344-348.
- Srisuparp S, S. Z.-D. (2003). Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*, 457-464.
- Tahani Al-Azawi, S. T.-H. (2013). Can we improve implantation by cancellation of fresh embryo transfer? *Mid E Fertil Soc J*, 9-12.
- Valles, C. S., & Domínguez., F. (2004.). Embryonic-endometrial interactions at implantation in humans. *Gynecol Obstet Invest*, 57(1), 28-30.
- Velando., L. E. (2012). Estimulación Ovárica en Reproducción Asistida. *Rev. Peru. Ginecol. Obstet*, 58(3).
- Zhou F, L. X. (2009). A frozen-thawed embryo transfer program improves the embryo utilization rate. *Chin Med J*, 122(17), 1974-1978.

Zhu, D., Zhang, J., Cao, S., Zhang, J., Heng, B., Huang, M., . . . Duan T, T. G. (2011). Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles - time for a new embryo transfer strategy? *Fertil Steril*, 95(5), 1691-1695.