

## **Fertilización in vitro: conceptualización**

Dra. Fiorella Bagnarello González  
Ginecóloga obstetra, subespecialista en Medicina  
Reproductiva Humana

### **RESUMEN**

La fertilización in vitro se define como la técnica de reproducción asistida que involucra fecundación extracorpórea. La técnica consiste en una estimulación ovárica controlada mediante medicamentos aplicados a la mujer con la intención de obtener múltiples folículos, los cuales contienen los ovocitos que serán aspirados posteriormente vía vaginal. Esos ovocitos serán fertilizados en el laboratorio (“in vitro”) y, posteriormente, los ovocitos que sean fertilizados y progresen adecuadamente a embriones serán transferidos a la cavidad uterina.

Retos que implica: no todos los ovocitos son candidatos a fertilizar, existen diversas causas de fallo de fertilización, una vez fertilizados no todos progresan en su división celular a embriones y no todos los embriones tienen máxima capacidad de implantación.

El objetivo de este resumen es brindar información adecuada y basada en evidencia científica, con el fin de eliminar conceptos erróneos y desmitificar la técnica de fertilización in vitro.

### **Infertilidad**

La infertilidad es una condición común con implicaciones psicológicas, económicas, demográficas y médicas. Se define como falla para concebir luego de 12 meses de relaciones sexuales frecuentes sin utilizar

métodos anticonceptivos en pacientes femeninas menores de 35 años o luego de 6 meses de relaciones sexuales frecuentes sin uso de métodos anticonceptivos en mujeres de 35 años o mayores. (1)

La fecundabilidad consiste en la probabilidad de conseguir un embarazo en un ciclo menstrual. Esto ocurre del 20 al 25% de parejas sanas y no supera el 35%, aún cuando se programa cuidadosamente el momento del coito. (2) La fecundidad es la probabilidad de que un solo ciclo dé lugar a un nacido vivo. Esta perspectiva es útil cuando se aborda y se compara la eficacia de diferentes opciones de tratamiento, ya que es importante que las parejas sean concientes de que el patrón de referencia para esa comparación es del 20 al 30% y no del 100%. (3)

### **Epidemiología de la infertilidad**

Estudios en poblaciones naturales indican que la fertilidad de la mujer alcanza el máximo entre los 20 y los 24 años, disminuye relativamente poco de los 30 a los 32 años y después se reduce de forma progresiva con más rapidez a partir de los 37 años, y aceleradamente a partir de los 40. (3)

En general, la tasa de fertilidad es de un 4 a un 8% menor en mujeres de 25 a 29 años, de 15 a un 19% menor entre los 30 a 34 años, de 26 a 46% menor en las de 35 a 39 años y hasta 95% menor en las de 40 a 45 años. (4)

El descenso de las tasas de recién nacidos vivos relacionados con la edad no solo refleja la reducción de la fertilidad sino también el aumento de abortos. Así como la fertilidad disminuye con la edad, la incidencia de abortos espontáneos identificados clínicamente aumenta conforme lo hace la edad. Las tasas de abortos espontáneos en

los ciclos de concepción natural son generalmente bajas y estables antes de los 30 años: 7 a 15% y después aumentan entre los 30 y 34 años: 8 a 21%, a los 35 a 39 años: 17 a 28% y a partir de los 40: 34 a 52%. (4)

### **Prevalencia de la infertilidad**

El 85% de las mujeres se logran embarazar en un año. 5 a 15% parejas aparentemente normales se embarazarán en los siguientes 12 meses de intentarlo, así que para los 24 meses el 95% de las parejas se logran embarazar. (3) El tiempo necesario hasta la concepción en parejas que logran el embarazo se resume así: en 3 meses se embarazan el 57%, en 6 meses el 72%, en 1 año el 85% y en 2 años el 93%. Estos porcentajes están basados en un patrón de referencia desde 1956 y se han confirmado en estudios más recientes. (5, 6)

A nivel mundial, la prevalencia de infertilidad es mayor en Europa del Este, África Norte, Medio Oriente y Oceanía. (7) Alrededor del 10% a un 15% de las parejas tienen algún tipo de problema de infertilidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Según los datos de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESRHE), 1 de cada 6 parejas en todo el mundo experimenta algún tipo de problema de infertilidad por lo menos una vez durante su vida reproductiva.

### **Causas de infertilidad**

La OMS realizó un estudio de 8.500 parejas infértiles y utilizó criterios de rutina diagnósticos para determinar causas de infertilidad. En países desarrollados el factor femenino se reportó en un 37%, factor masculino en 8% y mixto en un 35%. (8) 5% tenían factor idiopático o inexplicado

y 15% se embarazaron durante el estudio. Dentro de las causas más frecuentes femeninas identificables se determinó: un 81% por desórdenes ovulatorios; un 25% por endometriosis; un 15% por adherencias pélvicas; un 12% por obstrucción tubaria; un 11% por anomalías de trompas y un 7% por hiperprolactinemia.

Es difícil determinar la frecuencia según los distintos factores causales, un estudio en Inglaterra de 700 parejas llevado a cabo por especialistas en infertilidad (9) reportó los siguientes resultados: factor masculino, 26%; disfunción ovulatoria un 21%; daño tubario un 14%; endometriosis un 6%; problemas coitales un 6%; factor cervical un 3% e infertilidad inexplicada un 28%.

Según ESRHE, del 20 al 30% de los casos de infertilidad son explicados por causas fisiológicas en los hombres, del 20 al 35% por causas fisiológicas en mujeres y de 25 a 40% de los casos son debido a un problema de ambos. Del 10 al 20% de los casos no se encuentra ninguna causa. La infertilidad también se asocia con factores de estilo de vida como fumar, peso corporal y el estrés.

### **Selección natural**

Es importante señalar que el proceso reproductivo, que se da en forma espontánea en nuestra especie, es extremadamente selectivo e ineficiente. De 100 cigotos en estadio de cuatro células (24 a 36 horas desde la fecundación) no más de 30 llegan espontáneamente al estado de blastocisto, momento en que tienen la potencialidad de anidarse en el útero de la mujer.

De los embriones que llegan a manifestarse como clínicamente evidentes, es decir, ya se observa un saco

gestacional (tres semanas a partir de la fecundación) otro 17 a 20% se perderá espontáneamente como aborto clínico. De estos más del 70% muere como expresión de errores cromosómicos incompatibles con la vida y generados durante la fecundación. (10)

Después de la fecundación, el cigoto (producto de la unión de un óvulo u ovocito y un espermatozoide) comienza un proceso de división, que ocasiona un incremento del número de células llamadas blastómeros, que van en constante división, que va desde las dos células luego de la fecundación hasta una mórula, la cual tiene 16 blastómeros y, finalmente, un blastocisto que es el estadio de desarrollo previo a la implantación en el útero materno. Figura 1.

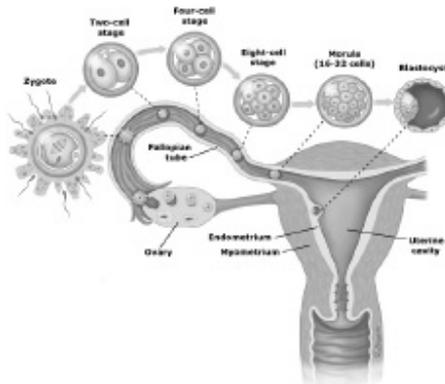


Figura 1. Fertilización del ovocito y migración del cigoto hasta la implantación in vivo.

Debe existir una integridad de 5 componentes básicos para que se lleve a cabo la fecundación natural con éxito, a saber:

Factor masculino: el espermatozoide debe depositarse en el cuello uterino en el momento próximo a la ovulación,

ascender hasta las trompas de Falopio y tener la capacidad de fecundar el ovocito (célula femenina que al unirse al espermatozoide dan origen a un cigoto).

Factor endocrino-ovárico: debe producirse la ovulación y debe existir un perfecto estado metabólico y hormonal para que se lleve a cabo con éxito no solo la ovulación sino el transcurso del embarazo.

Factor cervical: el cuello uterino debe capturar, filtrar, nutrir y liberar el espermatozoide en el útero, término resumido como capacitación espermática para que los espermatozoides ya capacitados puedan ascender a las trompas de Falopio.

Factor uterino: el útero debe ser receptivo a la implantación del embrión y capaz de soportar el crecimiento y desarrollo del embrión.

Factor tuboperitoneal: las trompas deben de capturar el óvulo desde el ovario y transportar con eficacia el espermatozoide desde el útero hasta el óvulo y, posteriormente, transportar el cigoto (unión del óvulo y espermatozoide) a lo largo de la trompa hasta el útero.

### **Tratamiento de la infertilidad**

La evaluación de la infertilidad se ha diseñado para estudiar la integridad de cada uno de esos componentes y poder identificar cualquier anomalía que pudiera impedir la concepción. Cuando se llega al diagnóstico de las causas de infertilidad y no es posible resolverlas desde el escalón más bajo iniciando por corregir, específicamente, cada uno de los factores, por ejemplo, un trastorno hormonal, se procede a aumentar el grado de complejidad hasta llegar a inducción de ovulación y relaciones sexuales dirigidas, o

bien, inseminaciones intrauterinas (IIU), según sea el caso.

Está establecido que las tasas de embarazo son significativamente más bajas después de la tercer inseminación, independientemente del método de inducción de la ovulación. (11) Las guías europeas (Dinamarca, Inglaterra, Gales, Francia, Holanda) sugieren 3 a 6 inseminaciones, dependiendo de la causa de la infertilidad. (12) Es aquí donde parejas que no han logrado embarazarse por baja complejidad deben seguir al siguiente escalón que es la fertilización in vitro (FIV).

Existen otras indicaciones que implican necesidad de FIV como su primer y única opción de tratamiento, por ejemplo, pacientes con obstrucción bilateral de trompas de Falopio, endometriosis moderada o severa, factor masculino moderado o severo, pacientes con insuficiencia ovárica prematura que en este caso requieren donación de óvulos, pacientes con disminución de su reserva ovárica (ya que el tiempo de concepción es crítico y el éxito con otras terapias es baja).

En otros casos más complejos como el caso de factor uterino sí es severo, tales como el síndrome de Asherman (distorsión irreparable de la cavidad uterina que les imposibilita la implantación del embrión), anomalías mullerianas (malformaciones congénitas del útero y trompas de Falopio), pacientes a quienes se les haya tenido que extraer el útero por alguna indicación médica, por ejemplo, requieren la necesidad de una gestación subrogada o por sustitución en conjunto con la FIV.

Según la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Red Lara) la donación y adopción de gametos (ovocitos y espermatozoides) está indicada en muchos

países en parejas heterosexuales infértiles en que uno o ambos miembros de la pareja carecen de gametos. También esta indicada cuando uno de los miembros de la pareja es portador de enfermedades ligadas a genes que de ser transmitidos pueden ocasionar enfermedades severas en la descendencia. Existe consenso también que la donación debe ser gratuita, sin que por ello se niegue el uso de alguna forma de compensación por concepto de traslado o ausencia laboral para llevar a cabo el procedimiento.

Las principales indicaciones de donación de gametos son pacientes que carecen de gametos por falla ovárica prematura, azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), ovariectomía, pacientes de edad avanzada, pacientes con síndrome de Turner que cursan generalmente con falla ovárica prematura, víctimas de cáncer que han perdido sus gametos debido a sus tratamientos quimioterapéuticos o de radioterapia.

Existen contraindicaciones al tratamiento de infertilidad como lo son las enfermedades de fondo que comprometan la vida de la paciente en caso de gestación, o bien, si tienen contraindicación para utilizar los medicamentos para la inducción de ovulación. Condiciones como el estado civil de la pareja e, inclusive, enfermedades como HIV no deben considerarse impedimentos para negar tratamiento por infertilidad.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) consisten en todos los tratamientos o procedimientos que incluyen la manipulación tanto de ovocitos como de espermatozoides o embriones humanos, para el establecimiento de un embarazo. Esto incluye, fertilización in vitro y la transferencia de embriones (FIV-

TE), la transferencia intratubárica de gametos (GIFT), la transferencia intratubárica de cigotos (ZIFT), la criopreservación de ovocitos y embriones, la donación de ovocitos y embriones, y el útero subrogado. TRA no incluye inseminación (inseminación intrauterina artificial) usando espermatozoides de la pareja ni de un donante.

En las inseminaciones el semen es capacitado en el laboratorio y se introduce mediante un catéter al interior de la cavidad uterina, para que los espermatozoides lleguen de manera natural a través de las trompas de Falopio a fertilizar a los ovocitos que, generalmente, son estimulados mediante medicamentos aplicados a la mujer. Para este procedimiento se requiere al menos una trompa de Falopio permeable.

### **Fertilización in vitro**

Se define como técnica de reproducción asistida que involucra fecundación extracorpórea. En general, la técnica consiste inicialmente en una estimulación ovárica controlada mediante medicamentos aplicados a la mujer de forma subcutánea o intramuscular con la intención de obtener múltiples folículos, los cuales contienen los ovocitos que serán aspirados posteriormente vía vaginal guiado por ultrasonido. Esos ovocitos serán fertilizados en el laboratorio (in vitro) y, posteriormente, los ovocitos que sean fertilizados y progresen adecuadamente a embriones de 3 o 5 días serán transferidos a la cavidad uterina. Este proceso que generalmente dura alrededor de 2 semanas es llamado un ciclo de fertilización in vitro.

El primer embarazo luego de la fertilización de un ovocito humano in vitro y el primer nacimiento de un embrión fertilizado in vitro fueron reportados en 1976 y 1978. (13) Más de 5.000.000 embarazos se han logrado

en todo el mundo por fecundación in vitro. (14) En los Estados Unidos, aproximadamente un 1.5% (15) de todos los nacimientos y el 20% (16) de todos los nacimientos múltiples son el resultado de la fecundación in vitro; la tasa es mayor cuando se consideran todos los tipos de concepción asistida médicamente.

En Bélgica y Dinamarca, los bebés concebidos por TRA comprenden el 3.5% de los nacimientos. (17) Como se ha acumulado muchísima experiencia, se han aumentado las tasas de éxito de las TRA y se han ampliado las indicaciones para estos procedimientos.

### **Técnica FIV paso a paso**

#### **Paso 1. Hiperestimulación ovárica controlada**

La inducción de ovulación implica un crecimiento “homogéneo” de una cohorte folicular para producir una mayor cantidad de ovocitos de “adecuada calidad”, por medio del uso de diferentes esquemas de tratamiento.

El primer nacimiento exitoso tras FIV fue alcanzado en un ciclo ovulatorio espontáneo; se obtuvo un solo ovocito y un solo embrión fue transferido. (18) Sin embargo, las tasas de éxito usando este método fueron bajas y la mayoría de los investigadores adoptaron el uso de estrategias de estimulación ovárica para lograr el desarrollo sincrónico de múltiples folículos. Como resultado, varios ovocitos maduros podrían ser obtenidos y fertilizados. La transferencia de múltiples embriones al mismo tiempo aumentó significativamente la posibilidad de que al menos uno se implantara y produjera un nacido vivo. Como consecuencia natural de esta práctica se dio un aumento en las gestaciones múltiples.

Considerando que el desarrollo folicular múltiple puede lograrse mediante medicamentos específicos para inducir la estimulación ovárica se utilizan regímenes que incluyen inyecciones diarias de la hormona folículo estimulante (FSH), o FSH y hormona luteinizante (LH) exógena, ya sean intramusculares o subcutáneas. Un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se utiliza para prevenir el surgimiento endógeno de LH lo cual arruinaría el ciclo de FIV debido a lo que se conoce como una “luteinización prematura”.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) se usa en lugar de LH para iniciar la cascada ovulatoria y se da cuando los folículos son considerados maduros al valorarlos ultrasonográficamente por el médico responsable de la estimulación ovárica. Este control ultrasonográfico desde el inicio del ciclo de FIV es denominado “seguimiento folicular”. Aunque la estimulación ovárica controlada aumenta el número de ovocitos obtenidos, también parece inhibir la receptividad endometrial en cierta medida.

La razón más probable de una receptividad endometrial disminuida es el aumento prematuro de progesterona que ocurre con todas las formas de estimulación ovárica y conduce a un desarrollo prematuro de la ventana de implantación y un grado relativo de disincronía embrión-endometrial, es decir, el endometrio se prepara prematuramente para recibir al embrión y a la hora en que ocurre la transferencia ese momento ya ocurrió. (19, 20, 21)

La magnitud del efecto sobre la receptividad endometrial no es clara, así como de la calidad del embrión. La estimulación ovárica controlada no solo disminuye la receptividad endometrial, pero también puede interferir

con el desarrollo placentario y, a su vez, la evolución del embarazo. (22, 23, 24, 25)

Debido a estas razones, cada vez se utilizan esquemas de inducción de ovulación más conservadores para conseguir una estimulación más fisiológica, con menor cantidad de folículos pero de mejor calidad, reduciendo de esta forma el número de embriones obtenidos y, eventualmente, menos embriones para criopreservar (o congelar) por ciclo.

Existen diversos tipos de protocolos de estimulación ovárica: protocolos largos, cortos, con uso de análogos de la hormona GNRH (agonistas o antagonistas) a criterio médico y según las características específicas de cada paciente.

### **Desencadenantes de la ovulación**

Cuando los folículos ováricos se consideran maduros (folículos con un diámetro promedio de 18 mm o más y un nivel de estradiol del suero de 200 pg/mL por folículo codominantes), se administra un medicamento para desencadenar la cascada ovulatoria.

Preparaciones de hormona gonadotropina coriónica (HCG), tanto urinaria como recombinante están disponibles para desencadenar la ovulación. Un metanálisis no encontró diferencias en los resultados clínicos entre hCG urinaria y recombinante para la inducción de la maduración folicular final (26).

### **Pacientes con respuesta deficiente y alta respuesta**

Aproximadamente el diez por ciento de los ciclos se suspenden antes de la recuperación del ovocito; la tasa aumenta con la edad. Un ciclo puede ser cancelado si no

hay respuesta ovárica suficiente o más bien si es excesiva. Alrededor del 84% de ciclos discontinuados son debido a ausencia o producción insuficiente de ovocitos y un 4% debido a la respuesta exagerada. (27)

El término pobre respuesta se utiliza para describir a las mujeres que requieren grandes dosis de medicamentos para estimular los ovarios, pero producen menos de un número óptimo de ovocitos y cuyos niveles de estradiol son relativamente bajos. Se han definido como bajas respondedoras aquellas mujeres que (1) han tenido una pobre respuesta ovárica después de pasar por un ciclo de FIV, así como (2) las mujeres que tienen probabilidades de tener una pobre respuesta basada en su edad avanzada y una prueba anormal de reserva ovárica (28); sin embargo, existe una amplia variación en los criterios utilizados clínicamente y en estudios de investigación para definir pacientes con respuesta deficiente.

En revisiones sistemáticas de ensayos aleatorios diversas intervenciones no han sido muy eficaces para mejorar la pobre respuesta ovárica en esas mujeres. (29) Las altas respondedoras, por el contrario, producen un gran número de ovocitos maduros y altos niveles de estradiol.

Treinta años de historia llevaron al concepto de estimular “fuertemente” al ovario para obtener un mayor número de ovocitos y poder compensar las ineficiencias del proceso de fertilización en el laboratorio y tener embriones viables que transferir. Edwards, en 1996, cuestiona la verdadera eficacia de la hiperestimulación ovárica controlada e inicia la búsqueda de la estimulación ideal. ¿Cuántos ovocitos se requieren para tener embriones adecuados?

Actualmente, se ha llegado a la conclusión de que la inducción con esquemas más conservadores como los propuestos por Teramoto en Japón son la primera línea en casos de baja reserva ovárica, pueden utilizarse en todas las pacientes, existe menor riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica y embarazo múltiple, ofrece embriones de calidad al ser una estimulación más fisiológica, tiene un menor costo, es más cómodo para la paciente, la tasa de embarazo es competitiva, y al tener menos folículos existen menos probabilidades de embriones congelados.

Paso 2. Aspiración del folículo y obtención de muestra seminal

La recuperación de ovocitos o “captura folicular” en la actualidad se realiza casi exclusivamente por el método de aspiración folicular guiada por ultrasonido transvaginal. Se lleva a cabo 34 a 36 horas después de la administración de hCG. Bajo directa visualización ultrasonográfica y algún tipo de analgesia-anestesia (más comúnmente, propofol intravenoso, aunque también se puede utilizar sedación consciente o bloqueo regional), una aguja se introduce secuencialmente en cada folículo y el contenido folicular es aspirado. (30)

Hay algunas complicaciones de la aspiración folicular transvaginal; (31) solo en una serie se encontró un riesgo importante de infección y la incidencia de la infección de 3% bajó al 0% con el uso de antibióticos profilácticos. (32)

El uso de antibióticos profilácticos no ha sido estudiado extensivamente; datos limitados disponibles sobre el uso de antibióticos antes de la transferencia de embriones no sugieren ningún beneficio en la mejora de las tasas de embarazo clínico. (33). Dado que se han

reportado infecciones en series de casos, la mayoría de los médicos continúan utilizando antibióticos. (34)

Las infecciones se creó que son principalmente debido a la reactivación de procesos crónicos, como en pacientes con hidrosálpinx que albergan la inflamación crónica. Desde que los hidrosálpinx comúnmente se retiran antes de la FIV, la necesidad de antibióticos puede ser menor, aunque su uso puede reducir la colonización normal del tracto genital.

Antes de la aspiración guiada por ultrasonido transvaginal, los ovocitos eran aspirados bajo guía visual directa vía laparoscopia. Este método todavía se utiliza ocasionalmente en conjunto con el GIFT, en mujeres cuyos ovarios no están en la pelvis (como por ejemplo después de transposición ovárica antes de la radioterapia), o si la paciente no tiene ningún canal vaginal (por ejemplo, la ausencia congénita de la vagina).

Mientras la paciente esta siendo sometida a la captura folicular, simultáneamente se obtiene la muestra seminal de la pareja mediante masturbación, la cual será procesada en el laboratorio para poder inseminar los ovocitos recuperados en ese momento.

### **Número de ovocitos para aspirar o capturar**

En análisis de datos de más de 600.000 ciclos de tratamiento en mujeres de diferentes grupos de edad, la tasa de nacidos vivos se elevó con un número creciente de ovocitos obtenido por ciclo, hasta 15 ovocitos. (35, 36, 37) La incidencia de fracaso total de la fertilización después de la fecundación in vitro con factor masculino normal oscila entre el 4 y el 16%, y la probabilidad de fracaso recurrente en ciclos posteriores de FIV es aproximadamente del

30%. (38,39) Por esta razón, la falta de fertilización o la presencia de factor masculino severo requieren el uso de micromanipulación y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). (40)

La disponibilidad de ICSI-FIV ha resultado en tasas de embarazo en parejas con infertilidad por factor masculino comparables a los de las parejas sin infertilidad por factor masculino. (41) Puede lograrse una tasa de fertilización de hasta un 70% con microinyección de espermatozoides recién eyaculados.

También se ha logrado éxito con espermatozoides obtenidos desde el epidídimo (42) o directamente del testículo. (43) Sin embargo, en las parejas sin infertilidad por factor masculino, FIV con ICSI no ofrece ninguna ventaja clínica en comparación con FIV convencional. (44, 45) Así que se recomienda que ICSI debe ser reservada para aquellos con infertilidad por factor masculino severo o fallo previo en la fertilización.

### Paso 3. Clasificación ovocitos y fertilización

La fecundación de los ovocitos se confirma mediante la observación de dos pronúcleos en el cigoto unas 17 horas después de la inseminación o de la ICSI. Después de la fertilización, las células individuales de cada embrión (blastómeros) se dividen cada 12 a 14 horas, alcanzando aproximadamente 8 células a las 72 horas después de la recuperación del ovocito. Entre los días 2 y 4 se subdividen a 16 blastómeros lo que se denomina mórula. La fase de blastocisto es alcanzada al día 5, después de la recuperación o captura, y la implantación se espera para el día 7 después de la recuperación del ovocito, así que la transferencia debe ocurrir antes de este tiempo.

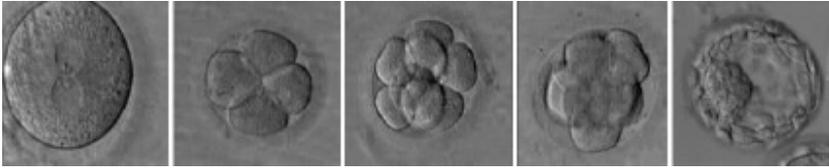


Figura 2. Secuencia de un cigoto hasta un blastocisto in vitro.

Eclosión es un proceso natural en el que un embrión se expande y, eventualmente, se sale a través de la zona pelúcida, con el fin de implantar en la superficie del endometrio (el revestimiento del útero). La eclosión asistida se refiere a un procedimiento de laboratorio por el que la zona pelúcida alrededor del embrión en el día 3 es mecánicamente o químicamente abierta para ayudar al embrión en la eclosión de la zona 3 días después. El procedimiento puede mejorar el porcentaje de embriones que se implanten en casos seleccionados con pobre pronóstico (por ejemplo, más de 2 ciclos de FIV fallidos y embrión de pobre calidad y mujeres mayores). (46,47)

Si se planea el diagnóstico genético preimplantacional (PGD), el cual consiste usualmente en una biopsia embrionaria (del blastómero), se realiza aproximadamente 72 horas después de la aspiración de ovocitos. El cultivo de embriones entonces se continúa mientras se analiza la biopsia del blastómero y hasta la transferencia de embriones en día 5.

### **Selección de embriones**

Los embriones con alto potencial de implantación son seleccionados de una cohorte disponible basados en criterios morfológicos. Monitoreo de Time-Lapse es una nueva tecnología para realizar la evaluación semicuantitativa de morfología del embrión y la cinética

del desarrollo en el tiempo sin retirar el embrión de la incubadora; sin embargo, las revisiones sistemáticas no pueden determinar si agrega valor a la morfología convencional realizada por los embriólogos. (48,49)

#### Paso 4. Transferencia

Después de la fertilización, los embriones se mantienen en cultivo por un periodo variable de tiempo. La mayoría de los programas (52%) transfieren los embriones al útero aproximadamente 72 horas después de la recuperación del huevo (en estadio de división de 4 a 8 células). (50); Hay un ligero aumento en las tasas de embarazo con transferencia en día 3 versus día 2. Las 24 horas adicionales en el cultivo de día 2 a día 3 permite la identificación de los embriones que dejan de dividirse y, por lo tanto, no son viables.

El embrión en día 5 (blastocisto) es la siguiente forma más común para la transferencia (36% de los procedimientos). Las principales ventajas de transferencia en la etapa de blastocisto son la capacidad de realizar PGD y la gran reducción en gestación múltiple con la transferencia de un solo blastocisto.

Si se va a realizar PGD retrasando la transferencia hasta la fase de blastocisto permite tiempo adicional para el análisis genético de la biopsia blastómero. (51) En ausencia de PGD, el fundamento para la transferencia de blastocistos es que por ciclo, las tasas de nacidos vivos, es mayor con la transferencia en fase de blastocistos y pueden transferirse menos embriones (1 o 2), lo que disminuye sustancialmente la tasa de embarazo múltiple de alto orden. (52) No se mejoran las tasas acumuladas de nacidos vivos. Aunque retrasar la transferencia hasta la fase de blastocisto permite la selección de embriones

para transferir de mejor calidad y se asemeja al momento de implantación de un embrión fertilizado naturalmente en vivo, la tasa de nacidos vivos no mejora porque en muchos casos hay menos embriones o ninguno disponible para la transferencia debido a que no progresaron in vitro a día 5.

Los embriones pueden ser transferidos en el útero mediante un catéter a través del cuello uterino hacia el fondo del útero (FIV), o bien, se colocan en las trompas de Falopio para ser llevados al útero por la acción peristáltica de las trompas de Falopio (ZIFT), como normalmente ocurre después de la fertilización in vivo. La vía transcervical es la forma más fácil y la menos traumática para la mujer. El tipo de catéter (suave o duro) y otros aspectos de la técnica de transferencia, tales como el uso del ultrasonido para guiar el procedimiento, pueden afectar el éxito de transferencia. (53, 54, 55, 56, 57) Sin embargo, el entrenamiento y la experiencia del médico sigue siendo un factor importante en el éxito del procedimiento, y los detalles de la técnica deben ser adaptados a cada paciente de manera individual.

Todos los embriones que van a ser transferidos se cargan en el catéter de transferencia en un volumen de alrededor de 20 microlitros. Bajo guía ultrasonográfica, se colocan 1 a 1.5 cm desde la parte superior de la cavidad uterina. El tocar con el catéter la parte superior de la cavidad uterina e inducir calambres uterinos durante la transferencia disminuye el éxito del procedimiento.

Después del procedimiento, el catéter se revisa para asegurarse de que no hay embriones retenidos. Aunque existe la posibilidad teórica de que se movilicen embriones hacia el cuello uterino o hacia las trompas de Falopio después de la transferencia de embriones, los ensayos aleatorios no han encontrado que el reposo en

cama post-transferencia mejora la tasa de implantación (58); sin embargo, comúnmente se recomienda.

El número de embriones transferidos generalmente depende de una serie de factores, incluida la edad materna, el número de ovocitos obtenido y la disponibilidad de embriones para la criopreservación. La transferencia de más de un embrión aumenta la probabilidad de un embarazo, pero también aumenta la probabilidad de gestación múltiple. No más de 2 embriones deben transferirse en mujeres jóvenes. Puesto que la tasa de implantación es menor entre las mujeres mayores se transfieren más embriones a menudo, excepto aquellas mujeres que reciben óvulos de donantes de mujeres más jóvenes.

La Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) sugiere que no hay que transferir más de 3 o 4 embriones en mujeres de 38 y 39 años de edad, y no más de 5 embriones deben transferirse en mujeres de 40 años de edad o mayores. (59) Sin embargo, esto es polémico y algunos autores sugieren no transferir más de 2 embriones sin importar la edad materna. (60) Existen factores específicos del paciente que son importantes, por ejemplo, los ciclos que resultan en un alto número de ovocitos y producen un gran número de embriones para la criopreservación se asocian con mayores tasas de embarazo. (61,62)

Algunos países han restringido por ley el número de embriones que pueden transferirse a la vez. En los Estados Unidos, el número de embriones transferidos es guiado por la ASRM; pero no es regulado por la ley.

### **Criopreservación de gametos**

Tras un tratamiento de FIV quedan embriones que no tienen ese fin reproductivo inmediato que deben ser criopreservados. No se consideran sobrantes hasta que se verifique la gestación. Los embriones solo pueden permanecer unos días *in vitro*, por lo que todos aquellos que no son transferidos son criopreservados.

Con la criopreservación se logra que un ciclo de estimulación hormonal provea a la pareja de más de un ciclo de transferencia, aumentando así las posibilidades de embarazo extendidas en el tiempo con la ventaja de que la paciente no debe someterse nuevamente a los riesgos de la estimulación ovárica y a la captura folicular bajo anestesia. El destino de embriones criopreservados es la utilización de la propia pareja en otro ciclo, donación con fines reproductivos, donación con fines de investigación o cese de su conservación sin otra utilización.

Las ventajas de un programa de congelación son, según la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, que aumentan las tasas de gestación por ciclo de tratamiento y reduce el riesgo de multigestación extrema, con el consiguiente beneficio para la mujer, los fetos y los niños y, finalmente, no representa un riesgo para los cigotos con potencial vital.

Los embriones supernumerarios son una consecuencia inevitable de FIV. Según la ESRHE debe realizarse un consentimiento informado previo al inicio del ciclo que establezca el destino de los embriones. El periodo de conservación debe estar claramente limitado. En Europa hay 2 opciones: 5 años con derecho a renovar un período más (máximo de 10 años) o 3 años con derecho a renovar 2 veces (total 9 años). Pueden extenderse por

razones médicas siempre y cuando la paciente esté en edad de poder embarazarse.

Es necesario contar con la criopreservación en situaciones especiales, por ejemplo, en caso de alguna eventualidad que impida que se le transfieran los embriones a la paciente en ese ciclo como algún proceso infeccioso agudo (ej., apendicitis), un accidente, hiperestimulación de la paciente, como consecuencia de la inducción de ovulación, lo cual contraindica que le transfieran los embriones en ese ciclo.

También existen casos en que deben congelarse los gametos idealmente mediante la técnica de vitrificación (congelación ultra-rápida evita la formación de cristales que pueden dañar las células) en casos de: retraso voluntario de maternidad, situaciones de enfermedades oncológicas para una futura utilización de sus gametos, o bien, eventualidades en el ciclo de FIV, por ejemplo, que la pareja no pudo recolectar la muestra seminal el día de la captura y, por lo tanto, debe transferirse en otro ciclo.

Revisiones sistemáticas de estudios observacionales han encontrado que los niños nacidos después de la transferencia de embriones descongelados tienen mejores resultados perinatales que los nacidos después de la transferencia de embriones frescos (es decir, menores tasas de mortalidad perinatal, la restricción del crecimiento, parto prematuro, bajo peso al nacer) (63, 64)

La razón de mejores resultados de los niños nacidos después de criopreservación en comparación con los niños nacidos después de la transferencia fresca en la mayoría de los estudios se desconoce; pero puede estar relacionada con las diferencias en la receptividad endometrial entre

las mujeres que recibían embriones frescos frente a la transferencia de embriones criopreservados (por ejemplo, los efectos adversos de la estimulación ovárica en los ciclos frescos y la asincronía). Niveles séricos de estradiol asociados con embriones congelados y ciclos de transferencia de óvulo de donante pueden resultar en mejor placentación. También es posible que los embriones que se someten a la congelación y descongelación y progresan son de mejor calidad que embriones frescos.

Una menor incidencia de embarazo ectópico puede ser otro de los beneficios de la utilización de embriones criopreservados. En dos estudios retrospectivos, la tasa de embarazo ectópico en ciclos con blastocistos congelado fue menos del 1% que el 1.5 al 1.8% en ciclos utilizando embriones frescos. (65,66) No hay ninguna base científica para una duración máxima de almacenamiento de embriones. (67)

La pareja tendrá que decidir el destino de los embriones criopreservados: si desea la transferencia de estos embriones en una fecha posterior, donarlos a otras parejas subfértiles, donarlos a la investigación o cese de su conservación sin otra utilización. (68,69)

### **Complicaciones de FIV**

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una complicación potencialmente mortal, puede ocurrir en la inducción de la ovulación. Sus manifestaciones más severas incluyen un crecimiento ovárico masivo y múltiples quistes, hemoconcentración y acumulación de líquido en diversos órganos del cuerpo como corazón, pulmones, cavidad abdominal; estos cambios llevan raramente a insuficiencia renal, shock hipovolémico, episodios tromboembólicos, síndrome de distrés respiratorio agudo

y (raramente) la muerte. (70,71)

Las tasas de morbilidad y mortalidad relacionadas directamente con FIV son bajas. Las complicaciones son predominantemente debido a la recuperación de los ovocitos y a la estimulación hormonal e incluyen el SHO, tromboembolismo, infección, hemorragia abdominal, torsión anexial, reacciones alérgicas y complicaciones anestésicas. (72) Si la fecundación in vitro es exitosa, la mujer está en riesgo de morbilidad y mortalidad relacionada con el embarazo normal (por ejemplo, preclampsia-eclampsia, hemorragia, tromboembolismo, sepsis, embolia del líquido amniótico).

Un metanálisis 2013 incluyendo ocho estudios de cohorte (n: 746.455 participantes) no observó asociaciones significativas entre el tratamiento de FIV y todo tipo de cáncer (RR 0.99, 95 CI 0.74 – 1.32), el riesgo de cáncer de mama (RR 0.89, 95 CI 0.79 – 1.01), o el riesgo de cáncer cervical (RR 1.07, 95 CI 0.45 – 2.55). (73)

### **Resultados**

La tasa de embarazo y de nacidos vivos en el 2011 en los Estados Unidos fue de un 36% de embarazos en ciclos frescos de TRA de embriones no donados y 29% de nacidos vivos. (74)

En los Estados Unidos, más de 450 clínicas de fertilidad proveen los datos sobre los resultados de todos sus ciclos de TRA. Informes de resúmenes anuales con descripciones detalladas de las características de las pacientes, los procedimientos y los resultados están disponibles en línea de los registros en los Estados Unidos en Society for Assisted Reproductive Technology (SART) y los datos europeos en ESHRE.

Según datos de ESRHE, en Europa en el 2011, la tasa media de embarazo por transferencia embrionaria fue 33.2 después de la fecundación in vitro; 31.6 después de ICSI; 23.4 después de la transferencia de embriones congelados y 47.5 después de la donación de óvulos. Las tasas son más altas en los pacientes más jóvenes, menores de 35 años.

### **Razones para el fracaso**

El fracaso puede ocurrir durante cualquier paso en el proceso de fecundación in vitro, y a menudo no se conoce la razón. En algunos casos los folículos no pueden desarrollarse debido a una pobre reserva ovárica, un ovocito maduro puede no ser recuperable debido a dificultades técnicas, puede ocurrir falla en la fertilización por diversas causas, como anormalidades del esperma o la falta de penetración de la zona pelúcida, una falta de activación de ovocitos o un defecto en el ovocito.

Sin embargo, en la mayoría de los casos se producen embriones viables. Por lo tanto, cuando fallan los ciclos es, generalmente, debido a la falla de la implantación del embrión. Es conveniente clasificar a los muchos factores que intervienen en la implantación del embrión en tres categorías generales: calidad del embrión, receptividad endometrial y eficiencia de transferencia. (75)

Pronóstico: las preocupaciones sobre el resultado de estos embarazos han acompañado su creciente prevalencia. Se han estudiado los resultados a corto y largo plazo y los resultados suelen ser tranquilizantes. (76,77).

La infertilidad en sí parece tener un efecto adverso sobre el resultado del embarazo, independiente de su tratamiento. Varios estudios han reportado que las mujeres

con infertilidad no tratada que quedaron embarazadas tenían una mayor frecuencia de resultados adversos que el la población general, y su frecuencia de complicaciones fue similar a la de mujeres infértiles que se sometieron a TRA. Todos los estudios fueron observacionales y muchos factores de confusión potenciales no eran considerados en los análisis. (78, 79, 80, 81, 82)

Soporte más convincente para esta última hipótesis fue proporcionada por un estudio de cohortes poblacionales que comparó el resultado del embarazo de multíparas que fueron sometidas a TRA con resultados similares de la misma mujer en embarazos anteriores o posteriores naturalmente concebidos y la población obstétrica general. Las multíparas que lograron embarazo mediante TRA tuvieron bebés de similar edad gestacional y peso al nacer en comparación con los embarazos antes y después del procedimiento, pero sus bebés nacieron antes y tenían menor peso al nacimiento en comparación a la población obstétrica general.(83)

Con respecto a las cuestiones de desarrollo neurológico: los resultados del neurodesarrollo incluyen desarrollo psicomotriz, cognitivo, conductual y socio-emocional, así como los trastornos mentales (por ejemplo, retraso mental, autismo, trastorno de atención déficit-hiperactividad). La mayor parte de la evidencia disponible sugiere que los resultados del neurodesarrollo de los niños de embarazo único concebidos mediante TRA son similares a los de los niños concebidos naturalmente. Esta evidencia fue resumida en una revisión sistemática en el 2013 que analizaron datos de 80 estudios que compararon los resultados del desarrollo neurológico de los niños nacidos mediante TRA y controles concebidos naturalmente; los estudios incluyeron entre 31 y 2.446.44 niños (84), y los

autores concluyeron:

- Estudios del desarrollo psicomotor de los bebés no mostraron ningún déficit, pero datos sobre el desarrollo cognitivo o del comportamiento eran limitados.
- Estudios en los niños pequeños reportaron de manera consistente desarrollo cognitivo, conductual, socio-emocional y psicomotor normal.
- Estudios a los niños en la infancia media, en general, reportaron un desarrollo normal, pero hubo pocos estudios con seguimiento a esta edad.
- Estudios sobre los resultados del desarrollo neurológico en los adolescentes no fueron concluyentes, pero muy pocos estudios han sido publicados.

Otra revisión sistemática 2013 que solo evaluó el riesgo de trastorno del espectro autista no encontró una asociación entre TRA y este desorden. (85) Además del pequeño número de niños que se han estudiado en la edad escolar y más allá, los estudios están limitados por cuestiones metodológicas como sesgos de selección posible, grupos de control inadecuadas y potencialmente por factores confusores de los padres ya preexistentes.

Por ejemplo, la etiología de la infertilidad, las condiciones médicas de los padres y las características socioeconómicas y de comportamiento de las parejas que se someten a TRA podrían explicar las diferencias en los resultados del neurodesarrollo entre sus hijos y los concebidos naturalmente. Estas características pueden enmascarar algunas verdaderas diferencias entre los dos grupos. Se necesitan estudios grandes, bien controlados con seguimiento a largo plazo basados en evaluaciones

cegadas y validadas.

Aunque las TRA no parecen ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo neurológico adverso, el procedimiento puede dar como resultado mayores gestaciones múltiples que están en alto riesgo de parto prematuro, bajo peso al nacer y los bebés pequeños para edad gestacional, tres factores de riesgo importantes para las secuelas del neurodesarrollo.

### **Las complicaciones obstétricas**

Incluso, entre las gestaciones de embarazo único, un mayor riesgo de complicaciones del embarazo, tales como la placenta previa y desprendimiento, diabetes gestacional, preeclampsia y parto por cesárea se ha asociado con la FIV; sin embargo, el aumento absoluto de riesgo ha sido generalmente pequeño y la mayoría de tales embarazos tienen resultados normales.(86, 87, 88).

Como se comentó anteriormente, existen sesgos en los estudios observacionales de los embarazos de FIV que pueden sesgar los resultados, como la causa de la infertilidad. Como ejemplo, síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una causa común de infertilidad y se asocia con resistencia a la insulina, que desempeña un papel importante en el desarrollo de la diabetes gestacional.

### **Retos que implica FIV**

- 1) Calidad de ovocitos. No todos los ovocitos son candidatos a fertilizar. Existe una clasificación morfológica que determina según sus características una vez que son capturados si tienen la madurez suficiente para ser inseminados
- 2) Fallo en la fertilización. Posterior a la interacción de gametos por ICSI o FIV, aún en casos de

ovocitos y espermatozoides normales existe un fallo de fertilización en un 20 a un 30%. Se ha reportado fallo de fertilización total en FIV utilizando semen de características normales desde un 5 a un 20%. En ICSI se ha reportado un 3%. (89). La etiología de la falla de fertilización es compleja y heterogénea.

3) Arresto en la división. Una vez fertilizados no todos progresan en su división celular.

4) Calidad de los embriones. Los que logran dividirse a día 3, según sus características morfológicas como el número de blastómeros y porcentaje de fragmentación se clasifican en embriones clase 1 a 4, donde los clase 1 y 2 tienen máxima o elevada capacidad de implantación y los 3 y 4 baja capacidad o muy poca posibilidad de implantarse.

5) Falla de implantación. La falla de implantación constituye la causa del 75% de los embarazos que se pierden y, por lo tanto, no son clínicamente reconocidos. La falla de implantación se considera un factor limitante en la reproducción asistida. Los embriones clase 1 y 2 (según la clasificación de Lucinda Veeck) son los que tienen mayor probabilidad de implantación aunque pueden ocurrir embarazos normales con embriones grado 3 y 4. (90)

## **Conclusiones**

Las técnicas de reproducción asistida han tenido grandes avances tecnológicos a través de los años.

El objetivo de este resumen es brindar información adecuada y basada en evidencia científica, con el fin de eliminar conceptos erróneos y desmitificar la técnica de fertilización in vitro.

El hecho de imposibilitarle la atención a los pacientes con infertilidad que requieren técnicas de reproducción asistida de alta complejidad en Costa Rica al impedir la aplicación de la fertilización in vitro afecta directamente los derechos a la vida privada y familiar, los derechos reproductivos y la integridad personal, como bien lo estableció la Corte Interamericana de Derechos Humanos en su sentencia de 28 de noviembre de 2012, Serie C N.º 257. (91)

## Bibliografía

1. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008; 90:S60.
2. Zinaman M. et al. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 1996. 65: 503.
3. Speroff L., Fritz M. *Endocrinología Ginecológica Clínica y Esterilidad*. Lippincott Williams and Wilkins; 7ma Edición 2006. Capítulo 27.
4. Maroulis GB. Effect of aging on fertility and pregnancy. *Seminars Reprod Endocr* 1991. 9:165
5. Guttmacher AF. Factors affecting normal expectancy of conception. *JAMA* 1956, 161:855
6. Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002, 360:151
7. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012; 9:e1001356.
8. WHO Technical Report Series. *Recent Advances in Medically Assisted Conception*. Number 820, 1992, pp 1-111.
9. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291:1693.
10. RedLara. *Publicaciones, Consenso Latinoamericano en aspectos éticos-legales relativos a las técnicas*

de reproducción asistida. Chile 1995

11. Smith JF, Eisenberg ML, Millstein SG, et al. Fertility treatments and outcomes among couples seeking fertility care: data from a prospective fertility cohort in the United States. *Fertil Steril* 2011; 95: 79.
12. Haagen EC, Hermens RP, Nelen WL, et al. Subfertility guidelines in Europe: the quantity and quality of intrauterine insemination guidelines. *Hum Reprod* 2006; 21:2103.
13. Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976; 1:880.
14. <http://www.eshre.eu/press-room/press-releases/press-releases-eshre-2012/5-million-babies.aspx> (Accessed on May 06, 2014).
15. Ory SJ. The national epidemic of multiple pregnancy and the contribution of assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2013; 100:929.
16. Kulkarni AD, Jamieson DJ, Jones HW Jr, et al. Fertility treatments and multiple births in the United States. *N Engl J Med* 2013; 369:2218.
17. Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, et al. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2009; 24:1267.

18. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2:366.
19. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1990; 53:870.
20. Saadat P, Boostanfar R, Slater CC, et al. Accelerated endometrial maturation in the luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation: impact of gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists. *Fertil Steril* 2004; 82:167.
21. Kolb BA, Najmabadi S, Paulson RJ. Ultrastructural characteristics of the luteal phase endometrium in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997; 67:625.
22. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011; 96:344.
23. Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, et al. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod* 2009; 24:1436.
24. Richter KS, Shipley SK, McVeary I, et al. Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced

- success rates of later developing embryos. *Fertil Steril* 2006; 86:862.
25. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, et al. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril* 2008; 89:20.
  26. Al-Inany HG, Aboulghar M, Mansour R, Proctor M. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for ovulation induction in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; :CD003719.
  27. Centers for Disease Control and Prevention. Assisted reproductive technology reports and resources. <http://www.cdc.gov.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/art/ARTReports.htm> (Accessed on November 21, 2014).
  28. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011; 26:1616.
  29. Polyzos NP, Devroey P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil Steril* 2011; 96:1058.
  30. Kwan I, Bhattacharya S, Knox F, McNeil A. Pain relief for women undergoing oocyte retrieval for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;

1:CD004829.

31. Evers JL, Larsen JF, Gnany GG, Sieck UV. Complications and problems in transvaginal sector scan-guided follicle aspiration. *Fertil Steril* 1988; 49:278.
32. Howe RS, Wheeler C, Mastroianni L Jr, et al. Pelvic infection after transvaginal ultrasound-guided ovum retrieval. *Fertil Steril* 1988; 49:726.
33. Kroon B, Hart RJ, Wong BM, et al. Antibiotics prior to embryo transfer in ART. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 3:CD008995.
34. Sauer MV, Paulson RJ. Pelvic abscess complicating transcervical embryo transfer. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:148.
35. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, et al. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 2011; 26:1768.
36. Steward RG, Lan L, Shah AA, et al. Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: an analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2014; 101:967.
37. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, et al. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16:577.
38. Barlow P, Englert Y, Puissant F, et al. Fertilization

- failure in IVF: why and what next? *Hum Reprod* 1990; 5:451.
39. Molloy D, Harrison K, Breen T, Hennessey J. The predictive value of idiopathic failure to fertilize on the first in vitro fertilization attempt. *Fertil Steril* 1991; 56:285.
  40. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17.
  41. Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 2001 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril* 2007; 87:1253.
  42. Nagy Z, Liu J, Cecile J, et al. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 63:808.
  43. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, et al. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995; 10:148.
  44. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of

- non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 357:2075.
45. van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM. Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; :CD001301.
  46. Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghar MA, et al. Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 2000; 15:1061.
  47. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline. *Fertil Steril* 2014; 102:348.).
  48. Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014; 20:617.
  49. Polanski LT, Coelho Neto MA, Nastri CO, et al. Time-lapse embryo imaging for improving reproductive outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 44:394.
  50. Centers for Disease Control and Prevention. Assisted reproductive technology reports and resources. <http://www.cdc.gov.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/art/ARTReports.htm> (Accessed on November 21, 2014).83

51. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Blastocyst production and transfer in clinical assisted reproduction. *Fertil Steril* 2004; 82 Suppl 1:S149.
52. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 7:CD002118.
53. Abou-Setta AM, Al-Inany HG, Mansour RT, et al. Soft versus firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2005; 20:3114..
54. Buckett WM. A review and meta-analysis of prospective trials comparing different catheters used for embryo transfer. *Fertil Steril* 2006; 85:728.
55. Derks RS, Farquhar C, Mol BW, et al. Techniques for preparation prior to embryo transfer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; :CD007682.
56. Mains L, Van Voorhis BJ. Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertil Steril* 2010; 94:785.
57. Brown J, Buckingham K, Abou-Setta AM, Buckett W. Ultrasound versus 'clinical touch' for catheter guidance during embryo transfer in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; :CD006107.
58. Abou-Setta AM, Peters LR, D'Angelo A, et al. Post-embryo transfer interventions for assisted reproduction technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 8:CD006567.

59. Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology, Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil Steril* 2008; 90:S163.
60. Lawlor DA, Nelson SM. Effect of age on decisions about the numbers of embryos to transfer in assisted conception: a prospective study. *Lancet* 2012; 379:521.
61. Combelles CM, Orasanu B, Ginsburg ES, Racowsky C. Optimum number of embryos to transfer in women more than 40 years of age undergoing treatment with assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2005; 84:1637.
62. Stern JE, Goldman MB, Hatasaka H, et al. Optimizing the number of cleavage stage embryos to transfer on day 3 in women 38 years of age and older: a Society for Assisted Reproductive Technology database study. *Fertil Steril* 2009; 91:767.
63. Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C, et al. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod* 2009; 24:2158.
64. Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, et al. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012; 98:368.

65. Ishihara O, Kuwahara A, Saitoh H. Frozen-thawed blastocyst transfer reduces ectopic pregnancy risk: an analysis of single embryo transfer cycles in Japan. *Fertil Steril* 2011; 95:1966.
66. Shapiro BS, Daneshmand ST, De Leon L, et al. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2012; 98:1490.
67. Rigg R, Mayer J, Dowling-Lacey D, et al. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertil Steril* 2010; 93:109
68. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Defining embryo donation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013; 99:1846.
69. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology. Recommendations for gamete and embryo donation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013; 99:47.
70. Elchalal U, Schenker JG. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome--views and ideas. *Hum Reprod* 1997; 12:1129.
71. Braat DD, Schutte JM, Bernardus RE, et al. Maternal death related to IVF in the Netherlands 1984-2008. *Hum Reprod* 2010; 25:1782.
72. Braat DD, Schutte JM, Bernardus RE, et al. Maternal death related to IVF in the Netherlands 1984-2008.

Hum Reprod 2010; 25:1782..

73. Li LL, Zhou J, Qian XJ, Chen YD. Meta-analysis on the possible association between in vitro fertilization and cancer risk. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:16..
74. [https://www.sartcorsonline.com/rptCSR\\_PublicMultYear.aspx?ClinicPKID=0](https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?ClinicPKID=0) (Accessed on December 10, 2013).
75. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Factors affecting embryo implantation after human in vitro fertilization: a hypothesis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:2020..
76. Wilson CL, Fisher JR, Hammarberg K, et al. Looking downstream: a review of the literature on physical and psychosocial health outcomes in adolescents and young adults who were conceived by ART. *Hum Reprod* 2011; 26:1209.
77. Allen VM, Wilson RD, Cheung A, et al. Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28:220.
78. Draper E.S, Kurinczuk J.J, Abrams K.R, Clarke M. (1999). Assessment of separate contributions to perinatal mortality of infertility history and treatment: a case-control analysis. *Lancet*, 353:1746.
79. McElrath T.F, Wise P.H. (1997). Fertility therapy and the risk of very low birth weight. *Obstet Gynecol*, 90:600.
80. Wang J.X, Norman R.J, Kristiansson P. (2002). The effect of various infertility treatments on the risk of

preterm birth. *Hum Reprod*, 17:945.

81. Zhu J.L, Obel C, Hammer Bech B, et al. (2007). Infertility, infertility treatment, and fetal growth restriction. *Obstet Gynecol*, 110:1326.
82. Cooper A.R, O'Neill K.E, Allsworth J.E, et al. (2011). Smaller fetal size in singletons after infertility therapies: the influence of technology and the underlying infertility. *Fertil Steril*, 96:1100.
83. Romundstad L.B, Romundstad P.R, Sunde A, et al. (2008). Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet*, 372:737.
84. Bay B, Mortensen E.L, Kesmodel U.S. (2013). Assisted reproduction and child neuro developmental outcomes: a systematic review. *Fertil Steril*, 100:844.
85. Conti E, Mazzotti S, Calderoni S, et al. (2013). Are children born after assisted reproductive technology at increased risk of autism spectrum disorders? A systematic review. *Hum Reprod*, 28:3316.
86. Romundstad L.B, Romundstad P.R, Sunde A, et al. (2006). Increased risk of placenta previa in pregnancies following IVF/ICSI; a comparison of ART and non-ART pregnancies in the same mother. *Hum Reprod*, 21:2353.
87. Sun L.M, Walker M.C, Cao H.L, et al. (2009). Assisted reproductive technology and placenta-mediated adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol*, 114:818.

88. Healy D.L, Breheny S, Halliday J, et al. (2010). Prevalence and risk factors for obstetric haemorrhage in 6730 singleton births after assisted reproductive technology in Victoria Australia. *Hum Reprod*, 25:265.
89. ASRM/ESRHE. (2012). *Fertil Steril*. 98:1380–94
90. Veeck L., Zaninovic N. (2003). *An atlas of human blastocysts*. New York. Edit Parthenon. Cap. 1, pág15-37.
91. <http://www.corteidh.or.cr/casos.cfm>