Técnicas en Reproducción Asistida.

Revisión Bibliográfica

Dr. Alvaro Monterrosa Castro *

"... También la misma Sara, siendo estéril, recibió fuerzas para concebir; y dió a luz aún fuera del tiempo de la edad, porque creyó que era fiel quien lo había prometido".

A LOS HEBREOS. 11.11

En los últimos años la fertilización in vitro se ha convertido en una realidad terapéutica. De ficción pasó a ser un procedimiento que ha dado nuevas esperanzas a las parejas infértiles, siendo tratamiento para algunas formas de infertilidad humana (1, 2, 3, 4). La posibilidad de captación, selección, capacitación y conservación de gametos; la factibilidad de transferir, manipular y congelar embriones, ha traído implicaciones religiosas, psicológicas, morales, éticas y legales que se debaten a nivel mundial (1, 3, 5, 6, 7).

Desde el nacimiento del primer "bebé-probeta" —Loiuse Brown el 25 de julio de 1978 en Holdhan, Handcanshire, Inglaterra—, producto de las investigaciones de Edwards y Steptoe (8, 9), centros dedicados a la aplicación clínica y a la investigación de nuevas rutas en fertilización artificial han crecido en todo el mundo (1, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). El primer "bebé-probeta" Latinoamericano —Diana Carolina Mendez—, fue obtenido en Bogotá, Colombia en 1985, por Elkin Lucena y Col. (17).

1. FERTILIZACION IN VITRO Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (IVF-ET)

El factor tubárico, fuese por obstrucción o ausencia de trompas de Falopio, fue una de las primeras indicaciones para IVF-ET (8). Posteriormente se han anexado: infertilidad masculina, inmunitaria, por factor cervical y la infertilidad inexplicada (1, 2). IVF-ET es un procedimiento complejo que requiere metodología clínica, quirúrgica y de laboratorio sofisticada. Se

deben seguir una serie de pasos que son presentados a continuación:

1.1. Estimulación Ovárica (Superovulación). Los primeros procedimientos se adelantaron recuperándose el oocito madurado espontáneamente en el ciclo menstrual natural (8, 18). Con el conocimiento de diferentes sustancias endocrinas, sus interrelaciones y su acción en el ciclo ovárico, se establecieron protocolos para producir desarrollo folicular múltiple y conseguir que varios oocitos lleguen simultáneamente a la maduración total (1, 19, 20). Esto permite recuperar mayor número de oocitos maduros, facilitándose la transferencia múltiple de embriones y la criopreservación (7, 18). Trounson et al (21) fueron los primeros en establecer las ventajas de la estimulación ovárica, y Alexander Lopata (1) ha comparado los resultados de algunos de los esquemas propuestos. Citrato de Clomifeno (C.C.), sustancia que estimula la secreción endógena de Gonadotropinas, 50–100 mgs/día, del quinto al noveno día del ciclo, se ha utilizado sola o en combinación con Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), 300–5000 U.I. cuando los folículos en crecimiento son mayores de 18 mm según medición ecográfica (15). HCG se ha adoptado en la mayoría de los programas de IVF-ET, ya que 34–38 horas post-aplicación desencadena la ovulación en un folículo maduro. 36 horas después de administrarse HCG es el momento oportuno para la recuperación de los oocitos (1, 22, 23, 24). C.C. se ha combinado con Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG), asociación farmacológica de FSH y LH, 150–600 U.I. diarias a partir del tercer día del ciclo (27). HMG en combinación con HCG a diferentes dosis, y FSH pura han sido esquemas adelantados en Norfolk, Virginia, por Jones et al (2, 12, 25, 27). Recientemente se está administrando GnRH pulsátil y los análogos de esta hormona liberadora de Gonadotropina (34). En el 4% de los ciclos estimulados se puede presentar el síndrome de hiperestimulación ovárica (26, 28). Esta complicación puede ser leve, moderada o grave. Consiste en crecimiento de los ovarios, alcanzando en circunstancias graves,

* Residente III. Departamento de Ginecología y Obstetricia. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. 1990

diámetro mayor de 10 centímetros y peso superior a los 5 kilos. Se puede presentar hemoconcentración, ascitis, hidrotórax, oliguria y rotura ovárica con la consiguiente hemorragia (28).

1.2. Monitoreo Folicular. Los ciclos estimulados deben ser monitorizados para establecer el crecimiento y secreción de los folículos, lo que permite conocer el momento justo para la recuperación de los oocitos (9, 10, 22, 29). La dosificación periódica de estradiol sérico es un buen recurso, el ascenso escalonado de los títulos es indicativo de estimulación satisfactoria (1, 29). La dosificación de LH sérica y urinaria han sido utilizadas para establecer el momento previo de la ovulación (1, 15). La ultrasonografía ha tenido auge en los últimos años y con transductores abdominales o vaginales se puede realizar seguimiento de los folículos en crecimiento y precisarse su número, tamaño y localización (4, 22, 23, 28, 29, 30). Los folículos maduros suelen alcanzar 16-20 mm de diámetro y los oocitos de ellos obtenidos tienen mayor posibilidad de fertilización que los obtenidos de folículos de menor diámetro (1, 3). La citología cervico-vaginal funcional y el test de moco son otros estudios que evalúan la función ovárica (29).

1.3. Recuperación de Oocitos. Inicialmente se utilizó minilaparotomía, acto que fue reemplazado por laparoscopia, método impulsado por Renaout et al. (24, 31). Con la paciente en Trendelenburg, anestesia general y distendiendo el abdomen con CO₂ se pasa laparoscopia operatorio convencional. Con la ayuda de una segunda punción los ovarios son expuestos y fijados. A través del laparoscopia y utilizando agujas especialmente diseñadas, se procede a puncionar todos los folículos maduros (15, 32). El líquido folicular es succionado y la cavidad folicular lavada. El material obtenido mediante el dispositivo de aspiración es colocado en un medio de cultivo y trasladado al laboratorio, sometiéndose a análisis en cámara de flujo laminar y microscopía de disección para determinar la presencia de oocitos. Ellos son observados en su morfología para establecer la maduración y clasificarlos de acuerdo con el grado de dispersión de la corona radiante, el cumulus ooforus y la expulsión del primer cuerpo polar (15). Los totalmente maduros pasan a otro medio de conservación y son incubados durante seis horas (22, 33). Los inmaduros se incuban en condiciones especiales por 24 horas para observar si alcanzan la maduración total (15). Los alterados morfológicamente son descartados.

Algunos autores consideran que el CO₂ utilizado para el neumoperitoneo y los anestésicos generales son adversos para el oocito (32, 35, 36), por lo que se está prefiriendo la recuperación por vía ultrasonográfica (23,

24, 29, 30, 38). Susan Lenz (23, 24) es una de las fuertes impulsoras del método. Se realiza bajo anestesia local de la pared abdominal, previo llenado de la vejiga con solución salina o con orina espontánea y utilizando Scanner sectorial con transductor de punción ajustado que permite observar en el monitor la línea de puntos electrónicos que indican la trayectoria de la aguja. Se identifican los folículos, los cuales son transvesicalmente puncionados, aspirados y lavados (32). El líquido folicular obtenido es enviado a laboratorio para cumplir el análisis descrito (15). Hematuria pasajera ha sido la única complicación reportada (23, 31). Recientemente se está recurriendo a la obtención de oocitos por ultrasonografía transvaginal (24), evitándose la anestesia local, el compromiso vesical y las molestias propias de la punción abdominal (32, 36, 38).

1.4. Preparación de Espermatozoides. El semen fresco se obtiene por masturbación del cónyuge o del donante, cuatro horas después de la recuperación de los oocitos y noventa minutos antes de la inseminación (12, 13, 33). Maha Mahadevan del Queen Victoria Medical Center, de Victoria, Australia, describió una técnica para la preparación de semen fresco y congelado (33).

Después de la licuefacción espontánea se procede por medio de centrifugación, decantación, dilución y paso sucesivo por caldos de cultivo para retirar el líquido seminal, detritus, bacterias y espermatozoides anómalos, seleccionándose, capacitándose y concentrándose 50.000 a 100.000 gametos morfológicamente normales, con buena movilidad en 10 a 50 microlitros de medio de cultivo (21, 36, 38, 39). Carolina Lucena y Elkin Lucena, de Cecolfes, Colombia (40), consideran la técnica de migración-sedimentación, utilizando el tubo de Tea-Jondet, un método simple, práctico, fisiológico y efectivo para la selección de los espermatozoides. Se evitan los efectos deletéreos de la centrifugación, e impulsan esta técnica como la más efectiva y adecuada alternativa para seleccionar los gametos masculinos en un programa de IVF-ET. Cuando se utilizan espermatozoides criopreservados, son descongelados, incubados y seleccionados los que se encuentran con buena movilidad (37). Las tasas de fertilización son similares cuando se utilizan espermatozoides frescos o congelados (41).

1.5. Fertilización in Vitro. En una atmósfera de CO₂ al 5% en aire, humedad del 95% y en un medio de cultivo a base de agua ultrapura, glucosa, lactato, piruvato, electrolitos, sulfato de estreptomycin, penicilina G-sódica y suero de cordón fetal humano, son incubados de 12 a 18 horas los oocitos y los espermatozoides (9, 15, 22, 26). Pasado dicho tiempo se explora con microscopio invertido en búsqueda de signos de

fecundación. La existencia del pronúcleo masculino y femenino, así como la expulsión del segundo cuerpo polar son indicios de fecundación normal (29, 33). Si no ha existido fecundación se puede intentar una segunda inseminación con una alícuota de 50.000 gametos masculinos. Los óvulos fecundados se trasladan a medios de cultivo de alta concentración de proteínas donde son incubados 24 a 48 horas. Allí realizan las fases de división celular y tres o cuatro serán transferidos a la cavidad uterina cuando alcancen el estadio de 4 a 8 células (3, 22). Los restantes pueden ser criopreservados para transferencia en próximos ciclos o donados (7-17).

1.6. Transferencia de Embriones. En los primeros procedimientos un solo embrión era transferido a la cavidad uterina (18). Debido al alto número de fracasos, varios embriones al tiempo empezaron a ser transferidos, lo cual se ha traducido en un aumento en la tasa de embarazos (15). Tres o cuatro embriones son llevados a la cavidad uterina (1), lo que ha incrementado, de paso, la frecuencia de embarazo múltiple (18). Para realizar la transferencia, los embriones son colocados en el interior del catéter, el cual es introducido por el canal cervical hasta el útero y allí son depositados los embriones. La anidación y la progresión de la gestación estará dada por la calidad de los embriones, la receptividad endometrial y las condiciones endocrinas (18, 43). Diversos autores (10, 11, 22, 43) han estudiado la fase lútea después de estimulación y aspiración folicular y consideran que no es adecuada la producción de progesterona, lo cual aumenta el porcentaje de fracasos. Están establecidas las bondades de la administración de progesterona natural mientras se documenta la existencia de gestación (11, 43). De existir, se continúa la terapia hasta la semana décimo segunda. Once días post-transferencia se inicia la dosificación de la fracción beta de Gonadotropina Coriónica (1). En los estudios de Norfolk, la presencia de dos títulos superiores a los 10 MUI/MI confirman la existencia de embarazo (27, 43, 44). Dos a tres semanas post-transferencia puede ser observado el saco gestacional utilizando ultrasonido transvaginal, método más sensitivo que el abdominal para detectar embarazos tempranos (38, 45).

1.7. Resultados de IVF-ET. Diversos puntos de vista se han tenido en cuenta para considerar satisfactorio IVF-ET, lo que ha llevado a revisar la definición de embarazo (44). Se opina que el éxito debe ser el nacimiento de un niño vivo (27). Las tasas de embarazo han aumentado, llegando a obtenerse en el 15 a 20% de los ciclos realizados (3, 22, 27, 44). Existe al parecer un aumento en el riesgo obstétrico de parto pretérmino y bajo peso al nacer. El embarazo múltiple guarda relación con el número de embriones transferidos (1, 18) y se desconoce la relación con embarazo ectópico (1).

Al parecer las posibilidades de malformaciones congénitas son iguales a las de la población natural. Anormalidades cromosómicas pueden relacionarse con pérdidas embrionarias tempranas y probablemente contribuyan a la alta tasa de fracasos (4). El equipo de Norfolk considera desconocidos los mecanismos y factores etiológicos que llevan a la alta tasa de abortos tempranos y aceptan que la alteración en el equilibrio estradiol-progesterona, producto de la estimulación ovárica, juega un papel importante (43).

2. TRANSFERENCIA INTRATUBARICA DE GAMETOS (GIFT)

GIFT consiste en colocar los gametos masculinos y femeninos en la porción ampular de la trompa de Falopio, sitio en que se produce la fertilización natural (11, 13, 14, 46), siendo necesario que al menos una de las trompas sea funcional. Gracias al flujo de conocimientos generados a partir de los estudios de Edwards y Steptoe (8, 9), Ricardo Asch y col. -The University of Texas Health Science Center San Antonio (San Antonio, Texas, U.S.A.)-, desarrollaron y describieron en humanos la transferencia intratubárica de gametos (13, 14). GIFT es más fisiológico que IVF-ET, ya que la fertilización se produce en el microambiente de la trompa y el huevo fecundado cumple migración normal llegando a la cavidad uterina 5 o 6 días después, encontrando un endometrio con buena receptividad (16). Al igual que IVF-ET, se debe realizar estimulación ovárica, cumpliéndose iguales esquemas (1, 11, 19). De los folículos desarrollados se recuperan los oocitos ya sea por laparoscopia o ultrasonido (4, 23, 31), se analizan en el laboratorio y se seleccionan los cuatro que tengan integridad y maduración completa (15, 16). Los espermatozoides son sometidos a capacitación y concentración (33), reuniéndose 100.000 móviles en 50 microlitros de medio de cultivo (41, 46). Para la transferencia dos catéteres son preparados, colocando en el interior de cada uno, separados por una burbuja de aire, dos oocitos y los espermatozoides. Bajo anestesia general y por laparoscopia se identifica una de las trompas, la cual es cateterizada hasta el tercio externo y son inyectados los gametos. El procedimiento se repite en el lado contralateral (13, 16, 46). Se realiza terapia con progesterona desde el cuarto día post-transferencia hasta la octava semana de gestación o hasta comprobar la ausencia de embarazo, determinado por fracción beta de gonadotropina coriónica o ultrasonografía. (1, 16, 33, 44, 45). La tasa de embarazos informada por Asch et al es del 28%, superior a la de IVF-ET (14). Yovich et al (16) publicaron en 1988, estudio comparativo IVF-ET / GIFT y encontraron que la tasa de embarazos para IVF-ET fue significativamente menor (12.5%) que en GIFT (35%). Su-

gieren reservar IVF-ET para cuando exista daño tubárico bilateral irreversible.

Elkin Lucena et al (47) han reportado tasas de embarazos del 42%, recurriendo a una variación de GIFT, en la cual la transferencia de gametos a las trompas es realizado por vía transvaginal recurriendo a ultrasonografía (TV-GIFT).

3. INSEMINACION ARTIFICIAL

Desde los años sesenta se han establecido programas para el tratamiento de la infertilidad masculina, recurriendo a la inseminación. El estudio de la biología del espermatozoide y la estandarización de medios de cultivo han permitido seleccionar espermatozoides, capacitarlos, mejorarlos in vitro (33, 39, 41) y realizarse (AIH) Inseminación Artificial Homóloga (48, 49). El usar gametos donados se define como inseminación heteróloga o (AID) Inseminación Artificial de Donante (33, 50). Los gametos pueden ser crioconservados en glicerol y nitrógeno líquido, lo que ha permitido la difusión de los bancos de semen (33, 42). El donante debe ser evaluado clínicamente, conocerse su grupo sanguíneo, establecer la historia genética y estudios de serología (VDRL, hepatitis, HIV) deben ser realizados (50).

3.1. Inseminación Cervical. Fue la primera técnica artificial utilizada en el manejo de la infertilidad, irrigando el cervix directamente con semen fresco de donante. Posteriormente fue diseñada la copa cervical, la cual acomodada en el cuello uterino impide la pérdida de parte de los gametos masculinos (42, 48). Este método continúa teniendo gran aplicación a nivel mundial, ya sea con semen fresco o congelado, donado o del cónyuge (31, 48, 50).

3.2. Inseminación Intrauterina (IUI). En infertilidad por moco cervical hostil u oligoastenozoospermia se puede recurrir a la inseminación intrauterina (39, 49, 51). Para retirar el líquido seminal, desechar gametos anómalos, prostaglandinas, evitar el efecto deletéreo de las bacterias y la posibilidad de reacciones anafilácticas, los espermatozoides deben ser lavados, siendo el swim-up y la centrifugación en gradientes de percoll, dos de los métodos usados (39). El sistema de migración-sedimentación es impulsado por algunos autores (40). La paciente puede recibir o no estimulación ovárica, se efectúa monitoreo folicular y al alcanzar 18 mm, se aplica HCG. 36 horas más tarde se adelanta IUI (39). Por medio de un catéter y por vía vaginal, los espermatozoides son depositados en el interior del útero.

3.3. Inseminación Intratubárica Transvaginal (VITI). Robert Jansen, Jhon Anderson y col. del Royal Prince Hospital, Sidney Australia, han impulsado la inseminación intratubárica (52), señalando que es posible sin anestesia ni cirugía cateterizar las trompas de falopio por vía vaginal y uterina bajo guía ultrasonográfica transvaginal. Debe documentarse la permeabilidad tubárica. Se puede adelantar estimulación ovárica de ser necesaria y el folículo en crecimiento debe evaluarse por ecografía. Con ayuda de transductor transvaginal se cateteriza el cervix, el útero y pasando por el ostium la trompa ipsolateral a la gónada a ovular. 50.000 a 100.000 espermatozoides capacitados in vitro son depositados en la porción ampular de la trompa (52). Estos autores (52) encontraron una alta tasa de cateterización tubárica exitosa y una elevada consecución de embarazos, más concluyen que el momento óptimo para la cateterización así como el equilibrio riesgos-beneficios deben ser establecidos. Elkin Lucena y col. han obtenido tasas de embarazos en el 37.5% de las pacientes sometidas a VITI (47).

3.4. Inseminación Intraperitoneal Directa (DIPI).

Esta técnica se utiliza en casos de infertilidad inexplicada y factor masculino (58). Es requisito fundamental la integridad morfológica y funcional de la trompa (54). Se adelanta estimulación ovárica convencional con su respectivo monitoreo y 36 horas después de administrar HCG se realiza punción del fondo de saco de Douglas, inyectándose en la cavidad peritoneal los espermatozoides que previamente han sido capacitados. La punción puede ser o no bajo ultrasonografía. Lesec et al (55) después de 4 años de experiencia comunican un tasa de éxitos de sólo el 7% por ciclo realizado. De verdad que son tasas sumamente bajas. Consideran los mismos autores, que si bien DIPI es menos exitosa, es menos sofisticada y menos invasiva que GIFT e IVF-ET y con considerables ventajas sobre IUI.

3.5. Inseminación Intrafolicular Directa (DIFI). E.

Lucena y col. de Cecolfes, Colombia (Comunicación Personal) alcanzaron un embarazo realizando inseminación intrafolicular. Utilizando ultrasonografía transvaginal observaron dos folículos crecidos como respuesta a estimulación ovárica, los puncionaron y depositaron en sendos interiores 100.000 espermatozoides capacitados. Es imprescindible la integridad tubárica, para que los gametos o el huevo fertilizado sean captados. Fundamentan la importancia de la técnica, al evitarse la manipulación de la trompa en consideración a los posibles efectos deletéreos que ello implica.

No existen otras descripciones en la literatura.

4. OTRAS TECNICAS

PROST (Transferencia intratubárica del estado pronuclear) y TEST (Transferencia intratubárica de embriones), son nuevas técnicas impulsadas en University of Western, Australia, por el equipo de John Yovich (16). Los óvulos y espermatozoides son obtenidos en las formas descritas (1, 24, 32) y fertilizados in vitro (9, 15, 22). En PROST (16) son colocados en las trompas por laparoscopia cuatro oocitos fecundados en estado pronuclear, fase que se alcanza 12 horas post-inseminación (29, 33). Este método es conocido y popularizado por otros autores bajo la denominación de ZIFT (Transferencia intratubárica de cigotos) (56). En consecuencia estado pronuclear y cigoto vienen a ser diferentes denominaciones de un mismo estadio del huevo fertilizado, aquel en que los pronúcleos masculinos y femeninos son identificados. En TEST (16) se transfieren por laparoscopia a la trompa los oocitos fecundados en estadio de 4 a 8 células. Jovich et al (16) encontraron tasas de gestación superiores al 30% y consideran que son técnicas de reproducción asistida, junto con GIFT, de elección en infertilidad de causa no tubárica.

Claude Renoux et al (53) del Port Royal University Clinic, de París, impulsan IVF-ET con cultivo intravaginal (IVC). Tres oocitos maduros, 100.000 espermatozoides seleccionados y medio de cultivo son colocados

en un tubo que herméticamente cerrado es introducido en la vagina materna por 50 horas. Los embriones obtenidos son evaluados y los normales transferidos al útero. Los autores (53) informan tasas de embarazos del 22% y la simplificación de la técnica de laboratorio al disminuir los costos permite una mayor difusión. IVC está tomando adeptos en todo el mundo. Sterzik et al (57) en reciente publicación reportan sus experiencias, alcanzando 5 embarazos en 22 pacientes (22.7%). Consideran que se minimizan los factores de Stress extracorpóreo y psicológicamente la madre participa activamente en el desarrollo temprano del fruto de la concepción.

5. CONCLUSION

No en toda paciente con infertilidad está indicado un procedimiento de fecundación asistida. La pareja infértil requiere un cuidadoso estudio integral para llegar al diagnóstico que permita seleccionar la terapéutica ideal. Las técnicas de fertilización artificial aunque son una realidad, pueden ser sumamente costosas, altamente sofisticadas, con rígidos controles de calidad, interrogantes aún no resueltos y tasas de éxito limitadas (43). No se debe aceptar que los procedimientos de reproducción asistida sean tomados como una moda y mucho menos que reemplacen la vía natural de concepción humana.

BIBLIOGRAFIA

1. LOPATA, A. concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 40(3): 289-301, 1983.
2. ACOSTA, A.A.; CHILLICK, C.F.; BRUGO, S. et al. In vitro fertilization and the male factor. *Urology* 28(10): 1-9, 1986.
3. WALLACH, E. In vitro fertilization and embryo transfer in 1982 random thoughts. *Fertil Steril* 38(6): 656-657, 1982.
4. ANGEL, R.R.; AITEKEN, R.J.; VANLOOK, P.F. et al. Chromosome abnormalities in human embryos after in vitro fertilization *Nature* 303(26): 336-338, 1983.
5. AMERICAN FERTILITY SOCIETY. Ethical statement on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 41(1): 12, 1984.
6. WARNOCK, M. In vitro fertilization the ethical issues (III). *The Philosophical quarterly* 33: 239-241, 1983.
7. CORREY, J.F.; LEETON, J.F.; WATKINS, R.A. et al. Donor oocytes pregnancy with transfer of deep-frozen embryo. *Fertil Steril* 49(3): 534-53, 1988.
8. EDWARD, R.G.; STEPTOE, P.C.; PURDY, J.M. Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 87: 737-740, 1980.
9. STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G.; WALTER, D.E. Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2: 89-94, 1986.
10. SHER, G.; KNUTZEN, V.; STRATTON, C. In vitro fertilization and embryo transfer: two year experience. *Obstet. Gynecol.* 67(3): 309-315, 1986.
11. BARAD, D.H. Gamete intrafallopian transfer (GIFT). Making laparoscopy more than diagnostic. *Fertil Steril* 50(6): 928-930, 1988.
12. JONES, H.W. Three years of in vitro fertilizations at Norfolk. *Fertil Steril* 42(5): 826-829, 1984.
13. ASCH, R.H.; ELLASWORTH, L.R.; BALMACEDA, J.P. et al. Pregnancy after gamete intrafallopian transfer (GIFT), *Lancet* 2: 1034-1037, 1984.
14. ASCH, R.H.; BALMACEDA, J.P.; ELLASWORTH, L.R. et al. Gamete intrafallopian transfer (GIFT): a new treatment for infertility. *In J Fertil* 30: 41-47, 1985.
15. GONZALEZ, M.; TELLEZ, J.; GUZMAN, F. et al. Morphologic aspect of ovular maturation in an in vitro fertilization gametes transference program. *Arch invest med* 19(3): 213-223, 1988.
16. YOVICH, J.L.; YOVICH, J.M.; EDIRISINGHE, W.R. The relative chance of pregnancy following tubal or uterine transfer procedures. *Fertil Steril* 49(5): 858-864, 1988.
17. LUCENA, E.; OLIVARES, R.; OBANDO, H. et al. Pregnancies following transfer of human frozen-thawed embryos in

- Colombia, South America. *Human Reprod* 1(6): 383-385, 1986.
18. SPEIRSAL,.; LOPATA, A.; GRONOW, M.J. et al. Analysis of the benefits and risks of multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 39(4): 468-471, 1983.
19. VARGYAS, L.M.; MORENTE, C.; SHANGOLD, G. et al. The effect of different methods of ovarian stimulation for human in vitro fertilization and embryo replacement. *Fertil Steril* 42(1): 1-9, 1984.
20. YEE, B.; VARGYAS, J.M.; BROWN, J. et al. Correlation of embryo cleavage rate and pregnancy outcome in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42(2): 324-329, 1984.
21. TROUNSON, A.O.; LEETON, J.F.; WOOD, C. et al. Pregnancies in human by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 212: 681-682, 1981.
22. QUINGLEY, M.M.; WOLF, D.P.; MAKLAND, N.F. et al. Follicular size and number in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 38(6): 678-681, 1982.
23. LENZ, S.; LAURITSEN, J.G. Ultrasonically guided percutaneous aspirations of human follicles under local anaesthesia: a new method of collecting oocytes for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 38(6): 673-677, 1982.
24. LENZ, S.; LEETON, J.; RENAULT, P. Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound. *J. In Vitro Fert Embryo Transfer* 4: 51-56, 1987.
25. JONES, G.S. Update on in vitro fertilization. *Endocrine Reviews* 5: 62-67, 1984.
26. NAVOT, D.; RELOV, A.; BIRKENFELD, A. et al. Risk factor and pronostic variables in the ovariaa hyperstimulations syndrome. *Am. J. Obstet Gynecol* 159(1): 210-215, 1988.
27. LIU, H.C.; JONES, H.W.; ROSENWAKS, Z. The efficiency of human reproduction after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 49(4): 649-653, 1988.
28. ENGEL, T.; JEWELWICS, Z.R.; DYRENFURTH, I. et al. Ovarian hyperestimulation Syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol* 122: 1052-1054, 1972.
29. MANTZAVINOS, T.; GARCIA, J.E.; JONES, H.W. Ultrasound measurement of ovarian follicles stimulated by human gonadotropins for oocyte recovery and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 40(4): 461-465, 1983.
30. WICLAND, M. Sonographics techniques in human in vitro fertilization programs. *Hum Reprod* 3(2 suppl): 65-68, 1988.
31. ROBERTSON, R.D.; PICHER, R.H.; O'NEIL, R.C. et al. An experience of laparoscopic and transvesical oocyte retrieval in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 45(1): 88-92, 1986.
32. SEIFER, D.B.; COLLINS, R.L.; PAUSHTER, D.M. et al. Follicular aspiration: a comparison of an ultrasonic endovaginal transducer with fixed needle guide and other retrieval methods. *Fertil Steril* 49(3): 462-467, 1988.
33. MAHADEVAN, M.M.; TROUNSON, A.O.; LEETON, J.F. Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 40(3): 340-343, 1983.
34. BELAISCH-ALLERT, J. Utilization of GnRH agonist for poor responders in an IVF programs. *Hum Reprod* 4(1): 33-34, 1989.
35. KHAN, I. et al. The effect of pneumoperitoneum gases on fertilization cleavage and pregnancies in human in vitro fertilization and gamete intra fallopian transfer. *Hum Reprod* 4(3): 23-26, 1989.
36. LAVY, G.; RESTREPO, H.; DIAMOND, M. Laparoscopic and transvaginal ova recovery: The effect on ova quality. *Fertil Steril* 49(6): 1002-1006, 1988.
37. ENGLERT, T. et al. Is fresh on frozen semen to be used in vitro fertilization with donor sperm? *Fertil Steril* 51(4): 661-664, 1989.
38. O'SHEA, R.T.; FORBES, K.L.; SCOPOCOSA, L. et al. Comparison of transabdominal and transvaginal pelvic ultrasonography for ovarian follicle assessment in vitro fertilization. *Gynecol. Obstet. Invest.* 26(1): 52-55, 1988.
39. PARDO, M.; BARRI, P.N.; BANCELS, N. Spermatozoa selection in discontinuous Percoll Gradients for use in artificial insemination. *Fertil Steril* 49(3): 505-509, 1988.
40. LUCENA, E.; LUCENA, C.; GOMEZ, M. et al. Recovery of motile sperm using the migration-sedimentation technique in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Hum. Reprod.* 4(2): 163-165, 1989.
41. TELLEZ, J.; GOMEZ, E.; ROSENDO, J. et al. Preparation of human semen for in vitro procedures of fertilization and intratubal transference of gametes. *Arch. Invest. Med.* 20(2): 143-146, 1989.
42. HAMMOND, M.G.; JORDAN, S.; SLOAN, C. et al. Factors Affecting Pregnancy rates donor insemination program using frozen semen. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155(3): 480-485, 1986.
43. LUI, H.C.; JONES, G.S.; JONES, H.W. et al. Mechanism and factor of early pregnancy wastage in vitro fertilization embryo transfer patient. *Fertil Steril* 50(1): 95-101, 1988.
44. JONES, H.W.; ACOSTA, A.A.; ANDREWS, Mc. et al. What is a pregnancy? A question for programs of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 40(6): 728-733, 1983.
45. FOSSUN, G.T.; DAVAJAN, V.; KLETZKY, A.D. Early detection of pregnancy with transvaginal ultrasound. *Fertil Steril* 49(5): 788-791, 1988.
46. BATTES, R.G. et al. Programed gametes intrafallopian transfer (GIFT). *Br. J. Obstet Gynecol* 95(12): 1220-1225, 1988.
47. LUCENA, E.; RUIZ, J.A.; MENDOZA, J.C. Vaginal intratubal insemination (VITI). and vaginal GIFT, endosonographic technique: early experience. *Hum Reprod* 4(6): 658-662, 1989.
48. DIAMOND, M.P.; CHISTIANSO, C.; DANIELL, J.F. et al. Pregnancy following use of the cervical cup for home artificial insemination utilising homologous semen. *Fertil Steril* 39(4): 480-484, 1983.
49. EMPERAIRE, J.C.; VERDAGUER, S. et al. Intrauterine insemination with capacited sperm. The concepional results according to the different types of infertility affecting the couple. *Journal Gynecologie obstetrique et biologie* 18(3): 378-391, 1988.
50. THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY. New guidelines for use of semen donor insemination: 1986. *Fertil Steril* 46(4, suppl12): 95s-110s, 1986.
51. HULL, M.E.; MAGYAR, D.M.; VASQUEZ, J.M. et al. Experience with intrauterine insemination for cervical factor and

- oligospermia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154(6): 1333-1338, 1986.
52. JANSEN, R.P.; ANDERSON, J.C.; RADONIC, I. et al. Pregnancies after ultrasound guided fallopian insemination with cryostored donor semen. *Fertil Steril* 49(5): 920-922, 1988.
53. RENOUX, C.; AUBRIOT, F.X.; DUBUISON, J.B. et al. A new in vitro fertilization technique: intravaginal culture. *Fertil Steril* 49(4): 654-657, 1988.
54. GUASTELLA, G.; CIMINO, C. Intraperitoneal insemination in couples with infertility unrelated to female organic pelvic diseases. *Act Eur Fertl* 17(3): 377-379, 1986.
55. LESEC, G.; MANHES, H.; HARDY, R.I. et al. In vitro transperitoneal fertilization. *Hum Reprod* 4(5): 521-526, 1989.
56. PALERMO, G.; DEVROEY, P.; CAMUS, M. et al. Assisted procreation in the presence of a positive direct mixed antiglobulin reaction test. *Fertil Steril* 52(4): 645-649, 1989.
57. STERZIK, K.; ROSERBUSK, B.; SASSE, V. et al. A new variations of in vitro fertilization: intravaginal culture of human oocytes and cleavage states. *Hum Reprod* 4(suppl): 83-86, 1989.
58. RAGNI, G.; LAMBROSO, G.S.; LAURENTES, L. de et al. Pregnancy after direct intraperitoneal insemination of spermatozoa from a man with severe infertility, after unsuccessful application of other methods of assisted fertilization. *Hum Reprod* 5(2): 225-226, 1990.