

Complicaciones de las técnicas de reproducción asistida

Dr. Alejandro D Teppa Garrán

Laboratorio de Bioenergética del Transporte Celular. Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Altos de Pipe.

INTRODUCCIÓN

La reproducción humana ha tenido un crecimiento vertiginoso en el transcurso de las últimas dos décadas; sin embargo, como todo procedimiento médico conlleva sus riesgos, los cuales son poco frecuentes y de poca trascendencia en su mayoría, pero en ocasiones pueden llegar a comprometer la vida misma del paciente. Por ello, los médicos especialistas en esta área, deben estar al tanto de las posibles complicaciones que estas técnicas implican y de esta forma estar preparados para prevenirlas y tratarlas.

Abortos

En Medicina Reproductiva las tasas de fecundación y gestación no se correlacionan con productos a término, pues se ha observado, entre varios aspectos, una mayor incidencia de abortos, los cuales oscilan alrededor de un 25% (1-3), una cifra mucho mayor que la esperada para abortos espontáneos de aproximadamente 15% (4); se piensa que se debe a varios factores: disfunción estroma-glandular endometrial, insuficiencia del cuerpo lúteo, embarazo múltiple, factores emocionales (5), edad materna avanzada y su asociado incremento en la prevalencia de anomalías cromosómicas (6).

Embarazos ectópicos

Históricamente el primer embarazo tras fertilización *in vitro* (FIV), ocurrido en 1976 fue ectópico (7). La presencia de embarazos ectópicos, varía de acuerdo a la selección de la paciente y la técnica usada, entre un 4% y un 8% (8,9), cifras siempre mayores que el 0,8% presente en la población general (10). Sin embargo, el principal acondicionante son las patologías tubáricas (10).

Embarazos múltiples

La presencia de embarazos múltiples en mujeres

tratadas con desarrollo folicular múltiple (DFM) es ampliamente conocida, estos han proliferado desde la aparición de las drogas inductoras de la ovulación. Son en su mayoría bicigóticos (3), destacando una baja frecuencia en gemelares pese a aumentar a tan sólo 1% la partición espontánea embrionaria, a diferencia del 0,45% observada en ovulaciones naturales (11). Las gonadotropinas provenientes de la orina de mujeres menopáusicas, surgieron para tratar casos diagnosticados de anovulación (12); no obstante, con el tiempo se usaron para el DFM, basado en el mayor reclutamiento de una cohorte de oocitos, incrementando los porcentajes de embarazos por ciclo no estimulados de 4,6% a un 11,8% al usar citrato de clomifeno y hasta un 17,7% al usar menotropinas (13). Aumentando aún más con los nuevos conocimientos del ciclo menstrual y el uso de las urofolitropinas, FSH altamente purificada y las nuevas preparaciones de FSH recombinante (14); así como la incorporación de los análogos de GnRH, aconsejándose el empleo de estos últimos sólo en casos seleccionados como bajas respondedoras o pacientes del grupo II de la OMS, clasificadas como disfunción del eje hipotálamo-hipofisario, entre las cuales se podría incluir a las pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) (15).

La evidencia clínica recopilada hasta el momento, no indica que el uso de estas drogas inductoras de la ovulación o sus combinaciones, aumenten el riesgo de malformaciones congénitas vistas en la población general (16,17). El embarazo múltiple tiene sus propios riesgos tales como: parto prematuro, ruptura prematura de membranas, retardo del crecimiento intrauterino, malformaciones, anemias, preeclampsias, diabetes gestacional, hemorragia posparto, tromboflebitis, y problemas de tipo financiero y psicológico para la familia (18-20).

El ecosonograma transvaginal demuestra en estos casos la presencia de más de 4 folículos mayores de 12 mm, como predictivo para embarazo múltiple o la presencia de 6 folículos mayores de 15 mm (20,21).

La reducción embrionaria reporta buenos resultados, con baja incidencia de abortos al realizarse en la semana siete del embarazo, mediante aspiración simple transvaginal (22); sin embargo, es un método que presenta sus connotaciones éticas y religiosas, por lo que se puede esperar la reducción espontánea, la cual ocurre en el 16% de los casos y generalmente antes de la semana nueve (23).

Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO)

Se caracteriza por un engrandecimiento ovárico con múltiples quistes, y pérdida del volumen intra-vascular por permeabilidad capilar creciente. Su primera clasificación data de 1967 (24), complementada luego por hallazgos ecosonográficos y de laboratorio (25). Se detalla a continuación:

A-SHO leve:

- Grado 1: estrógeno urinario total > 150 µg/24 h y pregnandiol > 10 mg/24 h.
- Grado 2: lo anterior más crecimiento ovárico no mayor de 5 cm.

B-SHO moderado:

- Grado 3: SHO leve más distensión abdominal, crecimiento ovárico entre 5 cm y 12 cm y aumento de peso no mayor de 5 kg.
- Grado 4: el grado 3 más náuseas, vómitos y diarrea.

C-SHO severo:

- Grado 5: el SHO moderado acompañado de ascitis, hidrotórax, crecimiento ovárico mayor de 12 cm y aumento de peso > 5 kg.
- Grado 6: el grado 5 más oliguria, hipercoagulabilidad, hemoconcentración, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, desequilibrio electrolítico, disfunción hepática y raras veces descrito edema vulvar masivo (26,27).

La incidencia de acuerdo a una revisión de Golan y col. es 8%-23% para el leve, 0,005%-7% en el moderado y 0,008%-10% para el severo (28). Estos mismos autores proponen una nueva clasificación en 1989, basada en que la forma leve parece una respuesta normal a la hiperestimulación y carece de significado clínico (29), añadido a la constante inclusión de pacientes como formas graves por la facilidad ecográfica para el diagnóstico de ascitis.

Entre los factores de riesgo para SHO están las pacientes anovulatorias del grupo II de la OMS, más acentuado con SOP (30); pacientes jóvenes, pequeñas y delgadas, con múltiples folículos inmaduros e intermedios y altos niveles de estradiol (25,31,32); el uso de hCG como suplemento de fase lútea y el uso de agonistas de GnRH en protocolo de estimulación (33).

El síndrome se inicia 3 a 8 días después de la administración de hCG, aumentando el riesgo la aparición de un embarazo (34). El signo del collar es descrito también como factor de riesgo, mediante ecosonografía se aprecia la presencia de folículos pequeños y numerosos, dispuestos cual collar en la periferia del ovario, relacionado con más frecuencia al SOP (35,36). SHO espontáneo con el embarazo, es decir sin historia previa de inducción de la ovulación, es muy raro, con pocos casos descritos, sobre todo en su forma severa (37-42).

La fisiopatología del síndrome no está clara, ocurre un aumento del tamaño de los ovarios, con formación de múltiples quistes y extravasación de líquido intravascular por aumento de la permeabilidad vascular. Entre los factores involucrados en este aumento de la permeabilidad vascular están: la prolactina (28), las prostaglandinas (43), la prorrénina (44), las citocinas (45), el óxido nítrico (46) y el factor de crecimiento endotelial vascular (47). Se observan elevados la aldosterona, la actividad de la renina en plasma, la desoxicorticosterona y la hormona antidiurética (48).

En la prevención del SHO, existen varias estrategias, tales como: 1. Administrar antagonistas GnRH durante un largo período antes de la inducción de la ovulación (49,50). 2. Cancelar los ciclos de inducción de la ovulación con valores de E2 > 2 000 pg/ml y/o con reclutamiento folicular múltiple; no obstante, si el objetivo es el DFM para técnicas de reproducción asistida (RA), se recomienda bajas dosis de hMG y/o acortar el período de estimulación (46). 3. No utilizar o disminuir la dosis de hCG (de 10 000 a 5 000 UI), considerando que el síndrome es un proceso posovulatorio (29), o sustituir la hCG con antagonistas GnRH como inductor de pico de LH, si éste último no forma parte del protocolo de estimulación (51). 4. Eludir la hCG endógena a través de la criopreservación de los oocitos o de los embriones logrados mediante FIV, postergando su utilización (52). 5. Sustituir la hCG por progesterona como suplemento de fase lútea (46). 6. El cuestionado beneficio del uso de albúmina

endovenosa al 5% durante y después de la punción folicular para aumentar la presión oncótica (53). 7. La aspiración folicular (54). 8. La profilaxis, identificando las pacientes de alto riesgo.

Tardías: cáncer de ovario y menopausia precoz

Los mecanismos biológicos implicados en la etiología del cáncer de ovario están poco claros, siendo de origen multifactorial, es natural que aparezcan varias hipótesis para explicar estos mecanismos que correlacionan con los estudios epidemiológicos, entre éstas, hay dos hipótesis que se han impuesto al explicar la mayoría de los factores de riesgo reconocidos: una es la ovulación incesante (55), la cual postula que el traumatismo menor repetido a la superficie epitelial del ovario producto de la ovulación continua aumenta la probabilidad del cáncer de ovario; mientras la otra hipótesis (56-58), se refiere a las gonadotrofinas, postulando que la exposición del ovario a cifras circulantes elevadas y sostenidas de éstas, aumenta la probabilidad de cáncer en el mismo. Por lo que ambas hipótesis colocan a estas drogas inductoras de la ovulación como factores de riesgo. No obstante, pese a que hay estudios que respaldan esta asociación (59,60), existen otros estudios (61), con resultados contrastantes, por lo que se espera que estas pacientes alcancen las edades de mayor riesgo así como ampliar el número de casos.

En cuanto a la menopausia precoz, se piensa que se desencadena al caer el número de folículos ováricos de cierto umbral (62). Se sabe que la reserva ovárica folicular declina continuamente desde la vida fetal (63,64), y se degeneran más del 99,9% de la población folicular (65). Mientras que el número de folículos ovulatorios que resultan de un solo ciclo de DFM puede ser equivalente al producto de 2 años de ciclos normales (66), es natural suponer el impacto sobre la reserva folicular, lo cual podría sugerir la aparición de una menopausia precoz.

Citrato de clomifeno (CC)

Fue sintetizado en 1956 (67). Es un derivado trifeniletileno, el cual se presenta en las preparaciones usadas para inducir la ovulación con una mezcla racémica, constituida en un 62% por el isómero (trans) citrato de enclomifeno, el cual le proporciona una acción estrogénica; mientras que el isómero (Cis) citrato de zuclomifeno, constituye el 38% restante, presentando la acción antiestrogénica

y otorgándole mayor tiempo de vida media a la mezcla.

Entre los efectos colaterales observados durante su utilización están los embarazos múltiples, síntomas visuales tales como escotomas y miodesopsias (68,69), fase lútea deficiente (70); mayor riesgo de embarazo ectópico, anormalidades del moco cervical y del endometrio, así como la presencia de vaporones o calorones, ocasionado por su acción antiestrogénica (71); más raramente náuseas, depresión, cambios en el carácter, urticaria, dermatitis alérgica, pérdida de pelo, fatiga y poliuria (72).

Este medicamento ocasiona muchas complicaciones, iatrogénicas en muchos casos, por errores en su manejo, entre los que se cuentan: administrarlo sin una evaluación mínima de la pareja, no controlar el tratamiento, no tratar por suficientes ciclos, utilizarlo en pacientes ovulatorias o en esterilidad de causa desconocida, administrarlo sin evaluar andrógenos suprarrenales, utilizar hCG sin control del desarrollo folicular, no repetir la prueba poscoital durante el tratamiento, utilizarlo en fase lútea deficiente de duración normal (72,73).

Los niveles de LH son incrementados durante la administración de CC, por lo que es potencial un incremento en la producción de andrógenos, debido a ello el uso concomitante con dexametasona o prednisona favorecerá la ovulación en estas pacientes (63,74). Este medicamento es posible combinarlo con otros fármacos: hCG, progesterona y/o dexametasona; así como aprovechar los múltiples esquemas de tratamiento que se han actualizado, en paralelo con un detallado conocimiento del desarrollo folicular, para intensificar el beneficio de la paciente (75).

De la inseminación artificial

Es la técnica más accesible de RA, la cual se define como el depósito de forma no natural de espermatozoides en el tracto reproductivo de la mujer, con el fin de conseguir una gestación, en la cual puede usarse tanto semen proveniente del cónyuge o de un donante (76). Esta técnica incluye complicaciones tales como salpingitis (77), la cual parece ser de origen ascendente y más propiamente provenir de la presencia de microorganismos en el semen (2).

Las técnicas de preparación del semen, tales como el *lavado* (78), o los gradientes de Percoll (79), además de seleccionar los espermatozoides de mayor movilidad, son eficaces en disminuir los

microorganismos uretrales, aunque la *E Coli* no se elimina con los gradientes de Percoll (80); sin embargo, no se recomienda tanto añadir antibióticos a los medios de cultivo como cubrir a la paciente, debido al escaso beneficio que representa (81). Otras complicaciones propias del método incluyen las reacciones alérgicas, cuyos alérgenos provienen del mismo semen (82), o son introducidos durante la preparación del mismo, como el suero de albúmina bovino, antibióticos o el Percoll. En cuanto al incremento en los títulos de anticuerpos anti-espermatozoides, se hace más evidente en aquellas mujeres con títulos ya existentes (83), o cuando el tratamiento de inseminación artificial se prolonga por más de 6 meses, lo cual no es la pauta (1).

De las técnicas de micromanipulación

Se han desarrollado diversas técnicas de micromanipulación (84), unas conocidas como macroinseminación, entre las cuales están la perforación de la zona pelúcida con medios químicos (85) y la disección parcial de la zona por medios mecánicos (86); y otras catalogadas propiamente como microinseminación, que incluyen la microinyección de espermatozoides en el espacio perivitelino (SUZI) (87), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (88), y la donación de citoplasma de oocitos normales (89). Estos procedimientos incluyen riesgos propios de la FIV así como los relacionados con el procedimiento de micromanipulación.

Están presentes riesgos propios de la estimulación ovárica como el SHO, cáncer genital y hemorragia de la pituitaria (90). Complicaciones asociadas con la recuperación transvaginal de oocitos se ven en el 0,3%-3% de los casos, incluyendo sangrado, infecciones pélvicas y perforación de vísceras abdominales (91); y asociadas a la recuperación vía laparoscópica están las hemorragias, perforaciones intestinales, infecciones y embolia gaseosa (6). Entre otros riesgos presentes están los abortos espontáneos (92), embarazos ectópicos (9) y múltiples (49). Se reportan tasas de malformaciones congénitas del 3% lo que se considera dentro de los límites esperados para la población general (93); no obstante, existen muchas discusiones al respecto, reportando sobre todo mayor incidencia de alteraciones cromosómicas sexuales (94), aunque estos resultados son discutidos por otros autores (95,96); sin embargo, es de notar, que muchos de estos pacientes sesgan la muestra al tener mayor edad y entrar al grupo de más prevalencia

de alteraciones cromosómicas.

Los resultados de estas técnicas dependen de: protocolo de estimulación folicular, desarrollo endometrial, preparación y calidad de las pipetas, técnica de microinyección, de transferencia embrionaria, grado de fragmentación embrionaria, cantidad y concentración de la polivinilpirrolidona (agente usado para retardar la motilidad de los espermatozoides), y la experiencia (97); obteniendo altas tasas de fecundación (60%-65%), con tasas menores de embarazos (35%) (97-99).

Estas técnicas reportan excelentes resultados para resolver esterilidad de causa masculina, por lo que también existen complicaciones en las maniobras realizadas a los hombres con el fin de obtener los espermatozoides. Entre estas maniobras están la aspiración microepididimal de espermatozoides (MESA) (100), cuyas complicaciones son: hematomas, dolor e infección (101); por lo que para evitar un procedimiento quirúrgico mayor, surgen como alternativas la aspiración percutánea del epidídimo (PESA) o la PESA modificada, las cuales disminuyen el costo y las complicaciones del procedimiento, y evitan el efecto tóxico de la contaminación de los espermatozoides con la sangre (102-104). Espermatozoides del testículo son también posibles de recuperar (TESE) (105-107), las complicaciones pueden ser: hematomas, sangrado, dolor y se reporta una atrofia testicular del 5% en modelos animales, lo cual depende de la vía de obtención, ya sea por aguja fina o por extracción de tejido (103). Hoy en día se estudia el uso de la inyección de espermátidas (ROSNI), que puede ser aplicable en el tratamiento de la azoospermia no obstructiva en humanos (108); no obstante, su aplicación está sujeta a la investigación acerca del momento en que ocurre la expresión genética de los alelos dependiendo de su origen (impronta genómica) (109), para garantizar un desarrollo normal del embrión, debido a que se cree que ésta ocurre antes de la espermiogénesis (110).

De la criopreservación

El uso del glicerol como agente crioprotector data de 1949, y la demostración de que el espermatozoide congelado y almacenado en hielo seco, usando el glicerol, permitía la fertilización y el desarrollo de una progenie normal fue realizado por Sherman unos años más tarde (111). El semen congelado permite verificar la calidad de la muestra, sobre todo si se trata de semen de donante, debido al

riesgo de transmitir infecciones graves, aunque se obtienen tasas menores de embarazos (112). La criopreservación de oocitos tiene ventajas éticas sobre la de embriones, aunque trae consigo varios inconvenientes, al disminuir su supervivencia con la descongelación (113), aumento del riesgo de aneuploidías (114), cambios en la organización del citoesqueleto (114,115), modificación de la zona pelúcida (116), y secreción prematura de los gránulos corticales (117).

El primer embarazo con embriones congelados se reportó en 1983 (118). Las ventajas de congelar embriones es que pueden ser transferidos en un ciclo natural posterior y aumentar las posibilidades de lograr un embarazo, sin incrementar los riesgos y costos. Sus desventajas implican fundamentalmente consideraciones éticas (119). Existen varios factores que afectan la sobrevivencia de los embriones criopreservados: estado del desarrollo al momento de la congelación, velocidades de congelación y descongelación y el criopreservante usado (120).

De la fertilización *in vitro* (FIV)

Es la técnica de RA más clásica y convencional. En su realización están implicadas varias fases en el manejo de gametos, cigotos y embriones, existiendo puntos clave, de cuya correcta aplicación dependerá directamente, la obtención de mejores resultados (121). Puede verse complicaciones, al incluir en su realización tiempos de estimulación ovárica, recuperación de oocitos, valoración de la maduración oocitaria, preparación del semen, inseminación de los oocitos, utilización de la criopreservación y de la transferencia (121).

El éxito o falla de la transferencia de embriones envuelve al menos cinco variables (122): 1. la técnica; 2. el número de embriones transferidos, los mejores resultados se obtienen con la transferencia de tres embriones, al equilibrar el riesgo de abortos y embarazos múltiples; 3. cuándo transferir, al poderse transferir solamente gametos (GIFT) o cigotos en distintas fases de desarrollo (clasificados de acuerdo al número de blastómeras íntegras, grado de fragmentación, morfología citoplasmática, número de células y características de la zona pelúcida) (121); 4. el estado de desarrollo endometrial al momento de la transferencia y 5. el soporte hormonal posterior.

En centros especializados se alcanzan tasas de embarazos del 32% por ciclo aspirado o 51% por ciclo con transferencia de embriones, con tasas de

alrededor del 3% de embarazos ectópicos (119). Los resultados de la FIV con transferencia de embriones, en sus indicaciones específicas como factor masculino francamente anormal, son superiores a los obtenidos mediante GIFT; no obstante, en las demás indicaciones no existe tal superioridad, por lo que es preferible usar GIFT, que es una técnica más sencilla (119).

Hay que considerar la experiencia del centro de RA (123), que en sus inicios obtienen tasas menores de embarazos con mayor frecuencia de complicaciones. Otros parámetros a considerar son la edad de la mujer, porque se obtienen mejores resultados en pacientes jóvenes; y el tiempo de esterilidad, el cual a medida que se incrementa, disminuye la tasa de éxitos, lo cual es aplicable a cualquier técnica de RA (124).

Impacto ético y psicológico

Las connotaciones éticas comenzaron con el nacimiento de Loise Brown en 1978, el primer recién nacido usando técnicas de FIV; desde entonces se ha originado un intenso debate mundial, en los centros de investigación, clínicas y universidades, hasta llegar a los congresos y el interés público. Los temas abarcan: la selección del sexo, anencefalia y transplante de órganos, la esterilización, investigación en preembriones, reducción selectiva de embarazos múltiples, terminación del embarazo, uso de tejidos embrionarios o fetales para aplicarlos en terapéutica clínica, donación del material genético para reproducción humana, madres subrogadas, diagnóstico preimplantación, la clonación humana y el proyecto del genoma humano y sus consecuencias (125-128). Se han promulgado varias leyes en el orbe: ley de Fecundación Humana y Embriológica, Reino Unido, 1990; ley de Donación y Utilización de Embriones y Fetos, España, 1988; ley de Protección del Embrión. Derecho Penal, Alemania, 1990; ley sobre Investigación en Embriones, Suecia, 1991; ley sobre Medicina Reproductiva, Austria, 1992, etc. (125).

La infertilidad y la esterilidad son un problema que origina un gran impacto psicológico en la pareja (129). Su diagnóstico y tratamiento representan una experiencia estresante para muchos pacientes (citas diarias, ultrasonidos, análisis de sangre, relaciones sexuales programadas, pruebas poscoitales, períodos de abstinencia, procedimientos invasivos, etc.) y además está relacionado con un sentimiento de pérdida de control sobre la situación. Muchos de

estos pacientes ven las técnicas de RA con un pensamiento mágico, con posibilidades de éxito mayores que las reales; por lo que la frustración es mayor, debido a que estos intentos son más costosos y desgastantes (129). Así que el terapeuta en medicina reproductiva, debe dar todo su apoyo a la pareja y explicarles claramente todas las posibles complicaciones de estos procedimientos.

REFERENCIAS

1. Horvath PM, Bohrer M, Sherden RM, Kemmann E. The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1989;52:288-291.
2. Dodson W, Haney AF. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 1991;5:457-467.
3. Allen MC, Herbert CM III, Maxson WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril* 1985;44:569-580.
4. Pritchard JA, MacDonald PC, Gant NF. *Williams Obstetricia*. 3ª edición. Barcelona: Salvat Editores; 1990.
5. Lunenfeld B, Lunenfeld E, Insler V. Gonadotropinas humanas. En: Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Reproducción Humana*. 1ª edición. España: McGraw-Hill-Interamericana; 1997.p.249-277.
6. Schlegel PN, Girardi SK. In vitro fertilization for male factor infertility. *J Clin Endoc Metab* 1997;82:709-716.
7. Steptoe P, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976;1:880-882.
8. Shelden R, Kemmam E, Bohrer M, Pasquale S. Multiple gestation is associated with the use of high sperm numbers in the intrauterine insemination specimen in women undergoing gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 1988;49:607-661.
9. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI. Ovarian superstimulation in the treatment of infertility due to peritubal and periovarian adhesions. *Fertil Steril* 1989;51:834-837.
10. Dubuisson JB, Aubriot FX, Mathieu L, Foulot H, Mandelbrot L, De Joliere JP. Risk factors for ectopic pregnancy in 556 pregnancies after in vitro fertilization: implications for preventive management. *Fertil Steril* 1991;56:686-690.
11. Derom C, Derom R, Vlietinck R, Maes H, Van den Berghe H. Iatrogenic multiple pregnancies in Ests Flanders, Belgium. *Fertil Steril* 1993;60:493-496.
12. Lunenfeld B, Menzi A, Volet B. Clinical effects of human menopausal gonadotropin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1960;51:587-589.
13. Pellicer A, Cano F. Desarrollo folicular múltiple en inseminación artificial. En: *Cuadernos de Medicina Reproductiva. Inseminación Artificial*. 1ª edición. España: Editorial Médica Panamericana; 1995.p.15-44.
14. Gast MJ. Evolution of clinical agents for ovulation induction. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:753-759.
15. World Health Organization 1976. WHO Technical Report Series, N° 514.
16. Shoham Z, Zosner A, Insler V. Early miscarriage and fetal malformations after induction of ovulation by Clomiphen citrate and human menopausal gonadotropins in vitro fertilization, and gamete interfallopian transfer. *Fertil Steril* 1991;55:1-10.
17. Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Ovulation induction and risk of neural tube defects. *Lancet* 1994;344:445-446.
18. Melgar C, Rosenfeld D, Rawlinson K, Greenberg M. Perinatal outcome after multifetal reduction to twins compared with non reduced multiple gestations. *Obstet Gynecol* 1991;78:763-767.
19. Seoud MA, Toner JP, Kruithoff C, Muasher S. Outcome of twin, triplet, and quadruplet in vitro fertilization pregnancies: the Norfolk experience. *Fertil Steril* 1992;57:825-834.
20. Dickey R, Olar TT, Taylos SN, Curole DN, Rye PH, Matulich EM. Relationship of follicle number, serum estradiol, and other factors to birth rate and multiparity in human menopausal gonadotropin induced intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril* 1991;56:89-92.
21. Castellvi RM, Gómez E, de los Santos MJ, Remohi J, Pellicer A. Factores determinantes de embarazos múltiples en mujeres sometidas a inseminación artificial con estímulo simultáneo del desarrollo folicular múltiple. *Clin Invest Ginecol Obstet* 1992;19:76-81.
22. Itskovitz-Eldor J, Drugan A, Levron J, Thaler Y, Brandes JM. Transvaginal embryo aspiration- a safe method for selective reduction in multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992;58:351-355.
23. Bollen N, Camus M, Tournaye H, Wisanto A, Van Steirteghem AC, Devroey P. Embryo reduction in triplet pregnancies after assisted procreation: a comparative study. *Fertil Steril* 1993;60:504-509.
24. Rabau E, Serr DM, David A, Mashiah S, Lunenfeld B. Human menopausal gonadotropins for anovulation and sterility. *Am J Obstet Gynecol* 1967;98:92-98.
25. Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril* 1978;30:255-268.
26. Coccia ME, Bracco GL, Cattaneo A, Scarselli G. Massive vulvar edema in ovarian hyperstimulation syndrome. A case report. *J Reprod Med* 1995; 40:659-660.
27. Cline DL. Massive vulvar edema in ovarian hyperstimulation syndrome (letter). *J Reprod Med* 1996;41:780.
28. Golan D, Ron -El R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z, Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an up-

- date review. *Obstet Gynecol Surv* 1989;44:430-440.
29. Balasch J, Jové Y, Deulofeu P, Vanrell JA. Hiperestimulación ovárica y embarazo múltiple: aspectos actuales. *Clin Invest Ginecol Obstet* 1989;16:385-398.
 30. Kemmann E, Tavakoli F, Shelden RM, Jones JR. Induction of ovulation with menotropins in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:58-64.
 31. Tulandi T, Mc Innes RA, Arronet GH. Ovarian hyperstimulation syndrome following ovulation induction with hMG. *Int J Fertil* 1984;29:113-117.
 32. Navot D, Relou A, Birkenfeld A, Rabinowitz R, Brzezinski A, Margalioth EJ. Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:210-215.
 33. Navot D, Bergh P, LauLer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992;58: 249-261.
 34. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Sattar MA, Amin YM, Elattar Y. Management of severe hyperstimulation syndrome by ascitic fluid aspiration and intensive intravenous fluid therapy. *Obstet Gynecol* 1993;81:108-111.
 35. Eshel A, Abdulwahid NA, Armar NA, Adams JM, Jacobs HS. Pulsatile luteinizing hormone releasing hormone therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1988;49:956-960.
 36. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid M, Tucker M, et al. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 1985;2:1375-1379.
 37. Khalil Abu-Louz S, Ashour Ahmed A, Swan R. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:476-477.
 38. Rosen GF, Lew MW. Severe ovarian hyperstimulation in a spontaneous singleton pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1312-1313.
 39. Zalel Y, Katz Z, Caspi B, Ben-Hut H, Dgani R, Insler V. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome concomitant with spontaneous pregnancy in a woman with polycystic ovarian disease. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:122-124.
 40. Ayhan A, Tuncer ZS, Aksu AT. Ovarian hyperstimulation syndrome associated with spontaneous pregnancy. *Human Reprod* 1996;11:1600-1601.
 41. Olatunbosun OA, Gilliland B, Brydon LA, Chizen DR, Pierson RA. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome in four consecutive pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1996;23: 127-132.
 42. Lipitz S, Grisar D, Achiron R, Ben-Baruch G, Schiff E, Mashiach S. Spontaneous ovarian hyperstimulation mimicking an ovarian tumour. *Human Reprod* 1996;11:720-721 .
 43. Katz Z, Lancet M, Borenstein R, Chemke J. Absence of teratogenicity of indomethacin in ovarian hyperstimulation syndrome: *Int J Fertil* 1984;29:186-188.
 44. Itskovitz J, Sealey JE. Ovarian prorenin renin-angiotensin system. *Obstet Gynecol Surv* 1987;42:545-551.
 45. Friedlander MA, Loret de Mola JR, Goldfarb JM. Elevated levels of interleukin-6 in ascites and serum from women with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1993;60:826-833.
 46. Alex S, Navot D, Lauter N. Síndrome de hiperestimulación ovárica. En: Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Reproducción Humana*. 1ª edición. Barcelona: McGraw-Hill-Interamericana; 1997.p.435-452.
 47. Mc Clure N, Healy DI, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning Jr RV, et al. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* 1994;244:235-236.
 48. Haning Jr RV, Strawn KY, Nolten WE. Pathophysiology of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Obstet Gynecol* 1985;66:220-224.
 49. Filicori M, Flamigni C, Campaniello E, Meriggiola MC, Michelacci L, Valdiserri A, et al. Polycystic ovary syndrome: abnormalities and management with pulsatile gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone analogs. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:1737-1742.
 50. Filicori M, Flamigni C, Campaniello E, Valdiserri A, Ferrari P, Meriggiola MC, et al. The abnormal response of polycystic ovarian disease patients to exogenous pulsatile gonadotropin-releasing hormone: characterization and management. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:825-831.
 51. Gonen Y, Balakier H, Powell W, Casper RF. Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:918-922.
 52. Schmidt CL, de Ziegler D, Gagliardi CL, Mellon RW, Taney FH, Kuhar MJ, et al. Transfer of cryopreserved embryos: the natural cycle vs controlled preparation of the endometrium with gonadotropin-releasing hormone agonist and exogenous estradiol and progesterone (GEEP). *Fertil Steril* 1989;52:609-616.
 53. Asch RH, Ivery G, Goldsman M, Frederick JL, Stone SC, Balmaceda JP. The use of intravenous albumin in patients at risk for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reprod* 1993;8:1015-1020.
 54. Navot D, Margalioth EJ, Lauler N, Birkenfeld A, Relou A, Rosler A, et al. Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1987;48:57-61.
 55. Fathalla MF. Incessant ovulation- a factor in ovarian neoplasia? (Letter). *Lancet* 1971;2:163.
 56. Gershenson DM, Tortolero-Luna G, Malpica A, Backer V, Wittaker L, Johnson E, et al. Neoplasia intraepitelial y cáncer ovárico. *Clin Ginecol Obstet N Am* 1996;23:435-497.
 57. Gardner WU. Tumorigenesis in transplanted irradiated and nonirradiated ovaries. *J Natl Cancer Inst* 1961;26:829.

58. Stadel BV. The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975;123:772-774.
59. Whittmore AS, Harris R, Itnyre J and The Collaborative Ovarian Cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white woman. *Am J Epidemiol* 1992;136:1184-1203.
60. Whittmore AS, Harris R, Itnyre J and The Collaborative Ovarian Cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1992;136:1212-1220.
61. Ron E, Lunenfeld B, Menczer J, Serr D, Katz L. Cancer incidence in a cohort of infertile women. *Am J Epidemiol* 1987;125:780-790.
62. Faddy MJ, Gosden RJ, Gougeon A, Richardson S, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mild life: implications for forecasting menopause. *Human Reprod* 1992;7:1342-1346.
63. Taymor ML. The regulation of follicle growth: some clinical implications in reproductive endocrinology. *Fertil Steril* 1996;65:235-247.
64. Terán Dávila J, Febres Balestrini F, Pardo-Palma R. Foliculogénesis y síntesis de esteroides ováricos. En: Terán Dávila J, Febres Balestrini F, editores. *Endocrinología Ginecológica y Reproducción Humana*. 1ª edición. Caracas: Editorial Ateproca; 1995.p.43-76.
65. Godgen R. Follicular status at the menopause. *Human Reprod* 1987;2:617-621.
66. Goldsman M, Asch R. Aspectos negativos de la tecnología de reproducción asistida. En: Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Reproducción Humana*. 1ª edición. España: Editorial McGraw-Hill-Interamericana; 1997.p.423-434.
67. Palopoli FP, Feil VJ, Allen RE, Holtkamp DE, Richardson A. Substituted aminoalkoxytriarylhaloethylenes. *J Med Chem* 1967;10:84-86.
68. Asch RH, Greenblatt RB. Update on the safety and efficacy of clomiphene citrate as a therapeutic agent. *J Reprod Med* 1976;17:175-180.
69. Lawton AW. Optic neuropathy associated with clomiphene citrate therapy. *Fertil Steril* 1994;61:390-391.
70. Van Hall EV, Mastboom JL. Luteal phase defect insufficiency in patients treated with clomiphene. *Am J Obstet Gynecol* 1969;103:165-171.
71. Adashi KY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
72. Pérez Peña E. *Infertilidad-Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción*. Un enfoque integral. 2ª edición. Mexico: Editorial Salvat; 1997.p.367-417.
73. Taymor ML. The use and abuse of clomiphene. *Fertil Steril* 1987; 47: 206-207.
74. Lobo RA, Paul W, March CM, Granger L, Klestky OA. Clomiphene and dexamethasone in women unresponsive to clomiphene alone. *Obstet Gynecol* 1982;60:487-501.
75. Strickler RC, Radwanska E, Williams DB. Controlled ovarian hyperstimulation regimens in assisted reproductive technologies. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:766-773.
76. Remohi J, Gutiérrez A, Cano F. Historia e indicaciones de la inseminación artificial. En: Pellicer A, editor. *Cuadernos de Medicina Reproductiva. Inseminación Artificial*. España: Editorial Médica Panamericana; 1995.p.1-14.
77. Corson SL, Batzer FR, Gocial B, Maislin G. Intrauterine insemination and ovulation stimulation as treatment of infertility. *J Reprod Med* 1989;34:397-400.
78. Kuzan FB, Hiller SL, Zarutskie PW. Comparison of three wash techniques for the removal of microorganisms from semen. *Obstet Gynecol* 1987;70:836-840.
79. Kaneki S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, Lizuka R. Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an inner column. *Biol Reprod* 1986;35:1059-1062.
80. Bolton VN, Warren RE, Braude PR. Removal of bacterial contaminants from semen for in vitro fertilization or artificial insemination by the use of buoyant density centrifugation. *Fertil Steril* 1986;46:1128-1131.
81. Sacks PE, Simon JA. Infectious complications of intrauterine insemination: a case report an literature review. *Int J Fertil* 1991;36:331 -339.
82. Bernstein IL, Englander BE, Gallagher P, Marcus ZM. Localized and systemic hypersensitivity reactions to human seminal fluid. *Ann Intern Med* 1981;94:459-461.
83. Kremer J. A new technique for intrauterine insemination. *Int J Fertil* 1979;24:53-56.
84. NG Soon-Chye, Bongso A, Ratnam SS. Microinjection of human oocytes: a technique for severe oligoasthenoteratozoospermia. *Fertil Steril* 1991;56:1117-1123.
85. Gordon JW, Talansky BE, Grunfeld L, Richards C, Garrisi GJ, LauLer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zone pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988;50:68-73.
86. Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, et al. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zone pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988;2:162.
87. Fishel S, Jackson P, Antinori S, Johnson J, Grossi S, Versaci C. Subzonal insemination for the alleviation of infertility. *Fertil Steril* 1990;54:828-835.
88. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-18.
89. Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997;350:186-187 .

90. Schenker J, Ezra Y. Complications of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 1994;61:411-422.
91. Bennett SJ, Waterstone JJ, Cheng WC, Parsons J. Complications of transvaginal ultrasound-directed follicle aspiration: a review. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:72-77.
92. Wilcox LS, Peterson HB, Haseltine FP, Martin MC. Defining and interpreting pregnancy success rates for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993;60:18-25.
93. Van Steirteghem AC, Nagy P, Liu J, Joris H, Smitz J, Camus M, et al. Intracytoplasmic sperm injection-ICSI. *Reprod Med Review* 1994;3:199-207.
94. In'T Veld P, Branderburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:773.
95. Liebaers Y, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, van Steirteghem A. Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346: 1095-1097.
96. Govaerts Y, Englert Y, Vamos E, Rodesch F. Sex chromosomal abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:1095-1097.
97. Dhont Marc, Dozortsev D, De Sutter P. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides. En: Remohi J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Reproducción Humana*. 1ª edición. España: Editorial McGraw-Hill-Interamericana; 1997.p.386-394.
98. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for the male factor infertility. *Fertil Steril* 1995;63:1231-1240.
99. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Lio J, Staessen C, Smitz J, et al. High fertilization, and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1993;8:1061-1066.
100. Silber SJ, Balcameda J, Borrero C, Ord T, Asch R. Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: a new treatment for congenital absence of the vas deferent. *Fertil Steril* 1988;50:525-528.
101. Tsirigotis M, Craft Y. Sperm retrieval methods and ICSI for obstructive azoospermia. *Human Reprod* 1995; 10:758-760.
102. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft Y. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Human Reprod* 1994;9:2058-2061.
103. Yul Cha K, Boong Oum K, Joo Kim H. Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 1997;67:985- 995.
104. Schlegel PN, Berkeley AS, Goldstein M, Cohen J, Alikani M, Adler A, et al. Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1994;61:895-901.
105. Craft Y, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:864.
106. Bourne H, Watkins W, Speirs A, Baker HWG. Pregnancies after intracytoplasmic injection of sperm collected by fine needlebiopsy of the testis. *Fertil Steril* 1995;64:433-436.
107. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, et al. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:1237.
108. Edwards RG, Tarin JJ, Dean N, Hirsch A, Tan SC. Are spermatid injection into human oocytes now mandatory? *Human Reprod* 1994;9:2217-2219.
109. Goshen R, Ben-Rafael Z, Gonik B, Lustig O, Tannos V, de-Groot N, et al. The role of genomic imprinting in implantation. *Fertil Steril* 1994;62:903-910 .
110. Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatides can develop into normal offspring. *Development* 1995;121:2397-2405.
111. Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil Steril* 1973;24:397-412.
112. The American Fertility Society Guidelines for therapeutic donor: sperm. En: AFS Guidelines for Gamete Donation 1993;59.p.18.
113. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat Baroux, Alvarez S, et al. Criopreservación de human embryos and oocytes. *Human Reprod* 1988;3:117-119.
114. Pickering SJ, Jhonson MH. The influence of cooling on the organization of the mitotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod* 1987;2:207-216.
115. Sathananthan AM, Trouson A, Freeman L. Morphology of frozen human oocytes. *Gam Res* 1987;16:343-354.
116. Carrol J, Depypere H, Matthews DC. Freeze-Thawed induced changes of the zone pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547-553.
117. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zone pellucida requires the presence of an oocyte an is associated with a reduction in the number of cortical granules presents. *J Reprod Fertil* 1990;89:253-259.
118. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707.
119. Pérez Peña E. Infertilidad-Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción. Un enfoque integral. 2ª edición. Mexico: Editorial Salvat; 1997.p.644-665.
120. Mohr LR, Trounson AO. Cryopreservation of Human Embryos. *Ann N Y Acad Sci* 1985;442:536-543.
121. Ruiz A, Romero JLL, De los Santos MJ, Rubio C, Mínguez Y, Duque B, et al. La fecundación *in vitro* (FIV) en el laboratorio de reproducción asistida: optimización de resultados. En: Remohí J, Simón C, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Reproducción Humana*. 1ª edición. España: Editorial McGraw-Hill-Interamericana; 1997.p.337-347.
122. Jones HW. Embryo transfer. *Ann N Y Acad Sci* 1985;442:375-380.

123. Aller J, Giudice M, Barany A, Vianello F, Faro I. Fertilización *in-vitro* y transferencia de embriones: primera experiencia nacional. Rev Obstet Gynecol Venez 1986;46:51-57.
 124. Lerner J, Martínez A, Trias Urbaneja A, Kovac's A, Moreno Isturiz J, Pérez Sánchez LE. Transferencia intratubaria de gametos: primeros 30 casos. Rev Obstet Gynecol Venez 1992;52:157-160.
 125. O'Brien C. La ética de la reproducción asistida. Orgyn 1997;8:10-13.
 126. Saulny de Jorge J. Recomendaciones sobre temas de ética en Obstetricia y Ginecología hechas por el Comité para el Estudio de los Aspectos éticos de la Reproducción Humana de la FIGO. Julio 97. Rev Obstet Ginecol Venez 1997;57:197-204.
 127. McGee G. Una ética saludable o la ética de la salud. Orgyn 1997;8:14-18.
 128. Wilmut I, Schnieke AK, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997;385:810-813.
 129. Perez Peña E. Infertilidad-Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción. Un enfoque integral. 2ª edición. Mexico: Editorial Salvat; 1997.p.625-642.
-