

Estudio comparativo entre la estimulación ovárica con la asociación citrato de clomifeno – gonadotrofina menopáusica humana y otros tres ciclos en fecundación in vitro

Dr. Julio César Quintana Paunette ¹

Resumen

Este artículo fue realizado con la finalidad de evaluar la utilidad de los ciclos que combinan citrato de clomifeno y gonadotrofina menopáusica humana comparativamente con otros tres protocolos de estimulación ovárica que incluyen: gonadotrofina menopáusica humana, buserelín y hormona folículo estimulante en pacientes sometidas a fecundación in vitro. Se estudiaron 188 pacientes considerando: edad, maduración de los ovocitos, presencia de fecundación, de embarazos clínicos, de gestaciones múltiples, de abortos y de embarazos viables. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en la edad de las mujeres incluidas en cada protocolo. En cambio, los tratamientos con citrato de clomifeno tuvieron ovocitos más inmaduros, menor porcentaje de fecundación y de embarazos clínicos, sin disminuir el riesgo de embarazos múltiples y de abortos. Por lo tanto, nuestras conclusiones desaconsejan el uso de este tipo de tratamientos, siendo preferible la utilización de protocolos con buserelín, en ciclos largos, asociados a gonadotropinas.

Palabras clave: Fertilización in vitro
Clomifeno
Buserelina
HFE
Menotropinas

Índice de abreviaturas

AGnRh: análogos de la hormona liberadora de gonadotrofina
AT: atresias
Bus: buserelín (buserelina)
CC: citrato de clomifeno
E2: estradiol
FIV: fertilización in vitro
FSH: hormona folículoestimulante
GN: gonadotropinas
HCG: gonadotrofina coriónica humana

HMG: gonadotrofina menopáusica humana
LH: hormona luteinizante
MI: metafase I
MII: metafase II
PI: profase I
PM: posmaduros
RIA: radioinmunoanálisis
TE: transferencia embrionaria

Introducción

La fecundación asistida incluye todos aquellos procedimientos que se realizan tanto in vivo como in vitro que están dirigidos a facilitar el encuentro entre el ovocito y el espermatozoide o que utilizan donación de los mismos ⁽¹⁾. La fertilización in vitro y transferencia embrionaria (FIV-TE) es uno de los procedimientos más usados actualmente para el tratamiento de diversas causas de esterilidad.

Desde los primeros intentos de obtener FIV se vio la

1. Médico Ginecocológico. Ex Asistente de Clínica Ginecocológica B. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Montevideo. Uruguay. Ex Director del Centro de Inseminación in Vitro y Transferencia Embrionaria. Sevilla. España.

Correspondencia: Dr. Julio César Quintana Paunette. Cooper 2310. C.P. 11500. Montevideo. Uruguay.

Recibido 27/8/96

Aceptado 27/9/96

gran importancia que tenía disponer de un buen número de ovocitos para realizar la inseminación. En 1978 Step-
toe y Edwards ⁽²⁾ lograron, en un ciclo espontáneo, la fe-
cundación de un ovocito con posterior embarazo a térmi-
no, hecho demostrado también, más recientemente, por
otros autores ^(3,4). A pesar de ello, las dificultades para
predecir el pico endógeno de LH (hormona luteinizante)
previo a la extracción de los ovocitos —y el escaso núme-
ro de que se dispone— hace que actualmente se realice es-
timulación ovárica antes de la punción folicular. En mu-
chos casos, dicha estimulación es precedida o acompaña-
da de la administración de análogos de la hormona libe-
radora de gonadotrofinas (aGnRh). Estos tratamientos
permiten conseguir un desarrollo folicular múltiple, con
la consiguiente extracción de la mayor cantidad de ovoci-
tos disponibles para la inseminación, así como predecir el
mejor momento para su recuperación.

En la década de 1980 se introdujo el citrato de clomi-
feno (CC) para la estimulación ovárica, lográndose obte-
ner un número mayor de ovocitos que en los ciclos espon-
táneos ⁽⁵⁾. Hacia 1982 comenzaron a publicarse trabajos
donde se utilizaba la gonadotrofina menopáusica humana
(HMG) como inductor del crecimiento folicular, con muy
buenos resultados ⁽⁶⁾. Finalmente, se dispuso de la hormo-
na folículo estimulante (FSH) extraída de orina de mujeres
posmenopáusicas para los ciclos de estimulación.

En la actualidad y en espera de la comercialización de
la FSH recombinante, frecuentemente se utilizan proto-
colos que combinan la administración de FSH y HMG
asociadas o no con aGnRh.

En los últimos años algunos autores han vuelto a intro-
ducir el CC en el arsenal terapéutico de la estimulación
ovárica, ya sea solo ⁽⁷⁾ o asociado con dosis mínimas (una
inyección) ⁽⁸⁾ o múltiples ⁽⁹⁾ de HMG. Esta conducta esta-
ría justificada en que estos tratamientos son menos costo-
sos y mejor tolerados por las pacientes, obteniendo un
porcentaje de embarazos aceptable. Por otro lado, traba-
jos previos ponían en duda el efecto deletéreo que el CC
podría causar sobre el desarrollo endometrial y la implan-
tación embrionaria ⁽¹⁰⁾. En un estudio previo de nuestro
centro donde se compararon ocho ciclos diferentes de es-
timulación ovárica para FIV, se llegó a la conclusión de
que los ciclos con aGnRh, y en especial los protocolos
largos, proporcionaban mayor número de gestaciones y
embarazos a término ⁽¹¹⁾. Es por tal motivo que en este
trabajo nos basamos en estos hechos para incluir dichos
tratamientos y la HMG como punto de referencia para la
comparación de los resultados alcanzados con los ciclos
de CC.

Objetivos

Esta comunicación se realizó con la finalidad de evaluar
la utilidad de los tratamientos de estimulación ovárica

que asocian CC y HMG frente a los ciclos con HMG sola
y los que combinan aGnRh en ciclo largo con HMG o
con HMG y FSH.

Material y método

Este trabajo, desarrollado en el Centro de Inseminación
in Vitro y Transferencia Embrionaria de Sevilla (Espa-
ña), se realizó en forma retrospectiva. Se tomó en consi-
deración la edad de las pacientes, la maduración de los
ovocitos obtenidos, la presencia de fecundación, el índice
de embarazos clínicos (presencia de embrión con latidos
positivos en la ecografía vaginal) por transferencia em-
brionaria realizada, los embarazos múltiples y el resulta-
do final de las gestaciones. Fueron aceptados para el es-
tudio aquellos casos en que el semen de la pareja o del
donante cumplía con los requisitos de normalidad de la
Organización Mundial de la Salud ⁽¹²⁾: volumen mayor
de 1,5 ml, recuento de espermatozoides de 20 millones /
ml o más, motilidad grado 3 o 4 mayor de 40%, morfo-
logía normal de, por lo menos, 40%.

El grupo estudiado estaba integrado por 188 ciclos, co-
rrespondientes a igual número de pacientes, que consul-
taron entre 1985 y 1995. Tenían las siguientes caracterís-
ticas: edad comprendida entre 23 y 45 años, ciclos mens-
truales espontáneos, valores séricos normales de gonado-
trofinas (GN), estradiol (E₂), hormonas tiroideas y pro-
lactina, medidos por radioinmunoanálisis (RIA) el tercer
día del ciclo. La cavidad endometrial era normal, docu-
mentada por la ecografía vaginal y la histerosalpingogra-
fía. Se excluyeron los casos con evidencias de poliquisto-
sis ovárica o endometriosis activa.

Para el procesamiento y análisis de los datos en orde-
nador se utilizó el programa Sigma, que comprende una
base de datos y un programa estadístico. Dicho análisis se
realizó con la prueba de Chi cuadrado (X²).

Protocolos de estimulación ovárica

**Ciclos sin análogos de la hormona liberadora de
gonadotrofinas**

*Citrato de clomifeno más gonadotrofina menopáusica
humana*

CC (Omifin®; laboratorio Merell-Dow España SA) 100
mg vía oral (v/o) por día desde el quinto día del ciclo y
durante 5 días. Al cuarto día del tratamiento con CC se
agregaba HMG (Pergonal®; laboratorio Serono SA, Ma-
drid, España.) 150 U.I. intramuscular (i/m) por día hasta
el día previo a la administración de la gonadotrofina co-
riónica humana (HCG).

Gonadotrofina menopáusica humana

225 U.I. i/m por día desde el tercer día del ciclo mens-
trual. A partir del aumento del E₂ por encima de 100

pg/ml, se disminuía la dosis a 150 U.I. por día hasta el día previo a la HCG.

Ciclos con análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas

El aGnRh administrado en este trabajo fue el busarelín (Bus). Los protocolos indicados fueron de ciclos largos. Se entiende por tales la administración de los análogos y las gonadotrofinas en forma secuencial, con el fin de lograr una completa desensibilización de los ovarios; (valores de $E_2 < 50$ pg/ml) antes de la estimulación^(13,14).

Busarelín más gonadotrofina menopáusica humana

Bus (Suprefact®; laboratorio Behring, Barcelona, España) 300 microgramos subcutáneos cada 12 horas a partir del día 21 del ciclo previo a la estimulación y hasta el día de la HCG. HMG 150 U.I. i/m por día el tercer o cuarto día del ciclo, luego se aumentaba a 225 U.I. i/m por día hasta que el E_2 superaba los 100 pg/ml. A partir de ese momento se disminuía a 150 U.I. por día hasta 48 horas antes de la administración de la HCG.

Busarelín más gonadotrofina menopáusica humana más hormona folículoestimulante

Bus igual al protocolo anterior. HMG 150 U.I. i/m por día desde el día 3 del ciclo y hasta 48 horas antes de la HCG.

FSH (Fertinorm®; laboratorio Serono SA, Madrid, España) 225 U.I. i/m por día desde el tercer día del ciclo y hasta el aumento del $E_2 (> 100$ pg/ml).

Tratamiento postransferencia

Progesterona micronizada (Utrogestán®; laboratorio Besin Isconesco, París, Francia) un óvulo cada 12 horas, durante 15 días. HCG (Profasi®; laboratorio Serono SA, Madrid, España) 5000 U.I. i/m los días 2, 5 y 8 después de la transferencia. Hidroxiprogesterona (Prolutón Depot®; laboratorio Schering SA, Madrid, España) 250 mg i/m por día los días 2, 5, 8 y 14 postransferencia.

Seguimiento

El control de las pacientes incluidas en este estudio se basaba en la dosificación diaria de E_2 sérico a partir del segundo día del ciclo estimulado y de la medición por ecografía vaginal del crecimiento folicular a partir del sexto día del ciclo. Cuando se lograban dos o más folículos de diámetro igual o mayor a 16 mm y valores de E_2 superiores a 600 pg/ml, se interrumpía la estimulación. Posteriormente se administraba HCG 10.000 U.I. i/m, 34 horas antes de la extracción de los ovocitos.

El diagnóstico inicial de gestación se realizaba con la determinación de la beta HCG a los 15 días de la transferencia embrionaria. La confirmación del embarazo clínico se efectuaba por ecografía vaginal 10 a 15 días más tarde

Recuperación de ovocitos

La recuperación estaba precedida de una anestesia general superficial con el fin de evitar los reflejos y permitir la deambulación precoz, una vez realizado el procedimiento. Se realizaba una antisepsia del introito vaginal y la vagina y se introducía la sonda vaginal. Bajo visión ecográfica directa se aspiraban todos los folículos mayores de 10 mm a través de una aguja de punción vaginal (Swemed Lab®; Wipak, Estados Unidos). Los ovocitos obtenidos eran enviados al laboratorio.

Preparación de ovocitos

De acuerdo a la maduración de los ovocitos en el momento de ser recuperados se clasifican en: PI (profase I), MI (metafase I), MII (metafase II), PM (posmaduro) y AT (atrésicos). Los mismos eran colocados en un medio de cultivo (Ham's F10) suplementado con 7,5% de suero de cordón fetal, e incubados a 37°C de temperatura y 5% de CO_2 , hasta ser inseminados.

Preparación del semen

Se utilizó el método de Swim-up que consiste básicamente en la mezcla del eyaculado con Ham's F10 suplementado con suero de cordón fetal. Luego se centrifuga el preparado con el fin de obtener un alto porcentaje de espermatozoides normales y eliminar otras células y restos celulares del contenido seminal.

Inseminación

Promedialmente se depositaban 100.000 espermatozoides por ovocito, variando el momento de la inseminación de acuerdo a la maduración del mismo: PI a las 24 horas posextracción, MI 4-6 horas, MII, PM y AT a las 3 horas. Los AT eran inseminados únicamente en aquellos casos en que no había un deterioro total de sus estructuras.

Tras la inseminación eran incubados en las condiciones antes señaladas, durante 16 a 20 horas. Luego se observaban al microscopio buscando la presencia de fecundación.

Transferencia embrionaria

La misma se realizaba a las 48 horas de la punción folicular. Se transferían, siempre que era posible, tres embriones en un estadio de desarrollo de cuatro células aproximadamente.

Se administraban 2 mg de flunitrazepam (Rohipnol®; laboratorio Roche, España), v/o una hora antes del procedimiento. Luego de un lavado y asepsia de la vagina y cuello uterino se introducía un catéter transcervical (Labotec®; Göttingen, Alemania) hasta 1 cm del fondo uterino y se efectuaba la transferencia.

Resultados

Del total de pacientes, 136 tenían menos de 35 años (grupo 1), 38 tenían entre 35-39 años (grupo 2) y 14 tenían 40 años o más (grupo 3). En el grupo 1, predominaban los tra-

Tabla 1. Tratamiento por edad

Tratamiento	< 35 años		35-39 años		> 39 años		Total pacientes
CC+HMG	35	25,7%	6	15,7%	6	42,8%	47
HMG	30	22,5%	15	39,4%	5	35,7%	50
BUS+HMG	21	15,44%	6	15,7%	2	14,2%	29
BUS+HMG+FSH	50	36,76%	11	28,9%	1	7,1%	62
Total	136		38		14		188

$\chi^2=10,59$ (6 gl) NS

CC: citrato de clomifeno; HMG: gonadotropina menopáusica humana; Bus: buserelín (buserelina); FSH: hormona folículoestimulante.

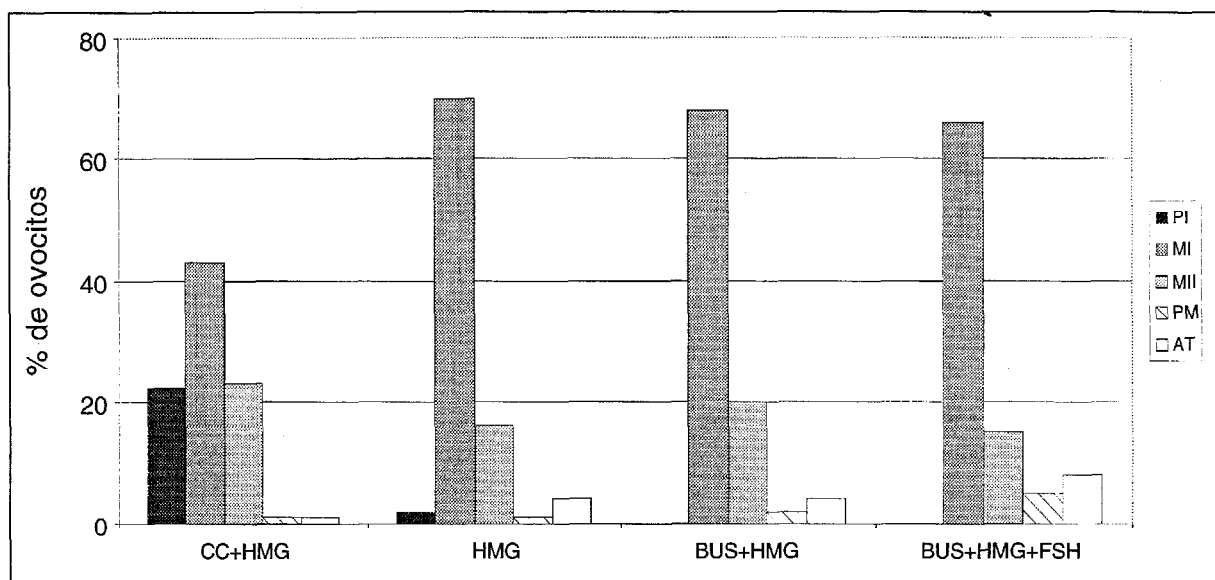


Figura 1. Maduración de ovocitos por tratamiento. $\chi^2=188,87$ (12 gl); $p<0,001$

CC: citrato de clomifeno; HMG: gonadotropina menopáusica humana; Bus: buserelín (buserelina); FSH: hormona folículoestimulante.

tamientos con Bus + HMG + FSH, seguidos por los que combinan CC + HMG. En el grupo 2, el tratamiento predominante era el de HMG sola, estando en segundo lugar los que combinan ambas gonadotropinas. El tercer grupo recibió predominantemente CC + HMG o HMG (tabla 1).

Cuando relacionamos la maduración de los ovocitos con los protocolos empleados, encontramos que la mayor proporción de inmadurez (PI) correspondió a CC + HMG (24,1%) frente a un mínimo porcentaje en los ciclos con análogo (0,2%–0,5%). Los ovocitos que podemos considerar en vías de maduración (MI) fueron los más frecuentemente encontrados en todos los protocolos, seguidos por los maduros (MII). Finalmente los PM y AT fueron recuperados en muy baja proporción en todos los protocolos, con una leve predominancia en los que incluyen Bus. Con el objetivo de valorar la predominancia de los ovocitos inmaduros o maduros que proporcionaban cada protocolo, se comparó el porcentaje de los diferentes es-

tadios de maduración en cada uno de ellos y con los demás tratamientos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con un claro incremento de las formas inmaduras (menos favorables para la fecundación) en los ciclos con CC (figura 1). La fecundación estuvo presente en un porcentaje muy alto en todos los ciclos. Sin embargo, al comparar la presencia de embriones entre los tratamientos con CC y los otros protocolos se encontró una diferencia significativa a favor de los ciclos con HMG y Bus, mostrando una menor tasa de fecundación en los ciclos con clomifeno (tabla 2).

La observación de latidos embrionarios en la ecografía vaginal, que nos certifica el embarazo clínico, estaban presentes en 10% de los protocolos con CC. Esta proporción fue mayor en los demás tratamientos, llegando a 37% en el que combina Bus con ambas gonadotropinas. También en este caso el estudio estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa al comparar los

Tabla 2. Fecundación por tratamiento

Tratamiento	Fecundación Sí		Fecundación No		Total pacientes
CC+HMG	36	77%	11	23%	47
HMG	46	92%	4	8%	50
BUS+HMG	28	99%	1	1%	29
BUS+HMG+FSH	58	94%	4	6%	62
Total	168		20		188

χ^2 : 11,14 (3 gl), $p<0,05$.
CC: citrato de clomifeno; HMG: gonadotrofina menopáusica humana; Bus: buserelín (buserelina); FSH: hormona foliculoestimulante.

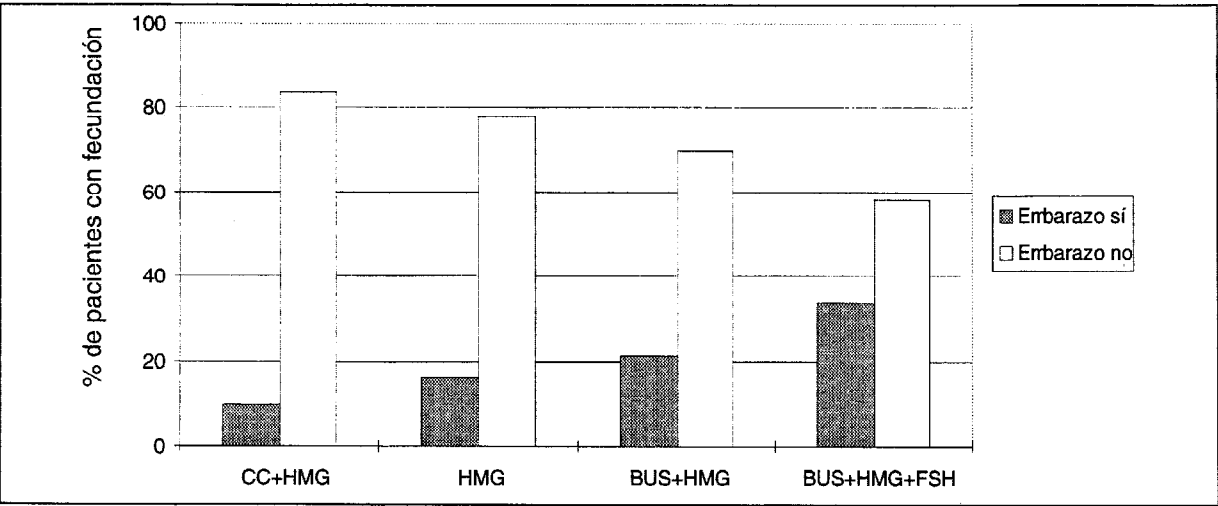


Figura 2. Embarazos por tratamiento. $\chi^2=10,43$ (3 gl); $p<0,05$
CC: citrato de clomifeno; HMG: gonadotrofina menopáusica humana; Bus: buserelín (buserelina); FSH: hormona foliculoestimulante.

embarazos obtenidos con CC y los logrados con HMG o la asociación de aGnRh con GN (figura 2).

Cuando se estudió la presencia de embarazos únicos o múltiples no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro protocolos empleados (figura 3).

De los embarazos logrados llegaron a ser viables entre 63% y 72% de los mismos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (figura 4).

Discusión

La proporción de ciclos recibidos era diferente para cada grupo etario. Esto se debió a una serie de circunstancias presentes en el momento de realizar la indicación del tratamiento, como la disponibilidad comercial de los medicamentos, la capacidad de respuesta prevista para cada paciente y la bibliografía previa que hacía recomendable el uso de uno u otro protocolo. Los ciclos que incluyen aGnRh fueron indicados con la finalidad de que el fármaco administrado antes que las GN produjera un hipogonadismo farmacológico⁽¹⁵⁾, y secundariamente, un reposo ovárico favoreciera de esta manera la acción y el

control de las GN administradas exógenamente. Muchas de las pacientes admitidas en primer lugar para FIV por el centro fueron tratadas con CC + HMG o HMG debido a que aún no se disponía de Bus ni de FSH. El hecho de no haber diferencias estadísticamente significativas entre los grupos etarios y la proporción de protocolos recibidos, hace que la edad no sea un factor determinante a la hora de valorar los resultados finales. El elevado porcentaje de ovocitos MI y MII recuperados y la inseminación efectuada con semen normal son responsables del alto índice de fecundación obtenido. Sin embargo, el mismo fue más desfavorable en los ciclos con CC (diferencia estadísticamente significativa, $p<0,05$).

Si bien nuestros resultados indican que los ciclos con CC tienen una mayor proporción de ovocitos maduros, más favorables para la fecundación (26,1% frente a 18,8% a 23,3% de los tratamientos restantes), esto no ha significado más embriones disponibles para la transferencia (77% frente a 92%-99%), ni mayor número de embarazos por transferencia embrionaria (10% comparado con 17%-37,9%). Como se indicó en el capítulo ante-

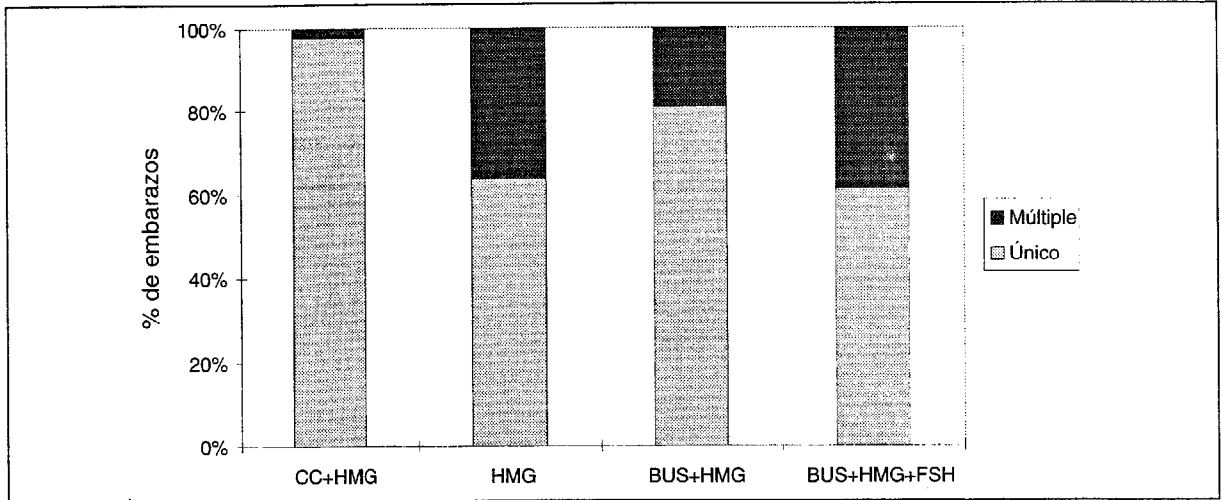


Figura 3. Embarazo único o múltiple por tratamiento. $\chi^2=1,12$ (3 gl); N/S.

CC: citrato de clomifeno; HMG: gonadotropina menopáusica humana; Bus: buserelín (buserelina); FSH: hormona foliculoestimulante.

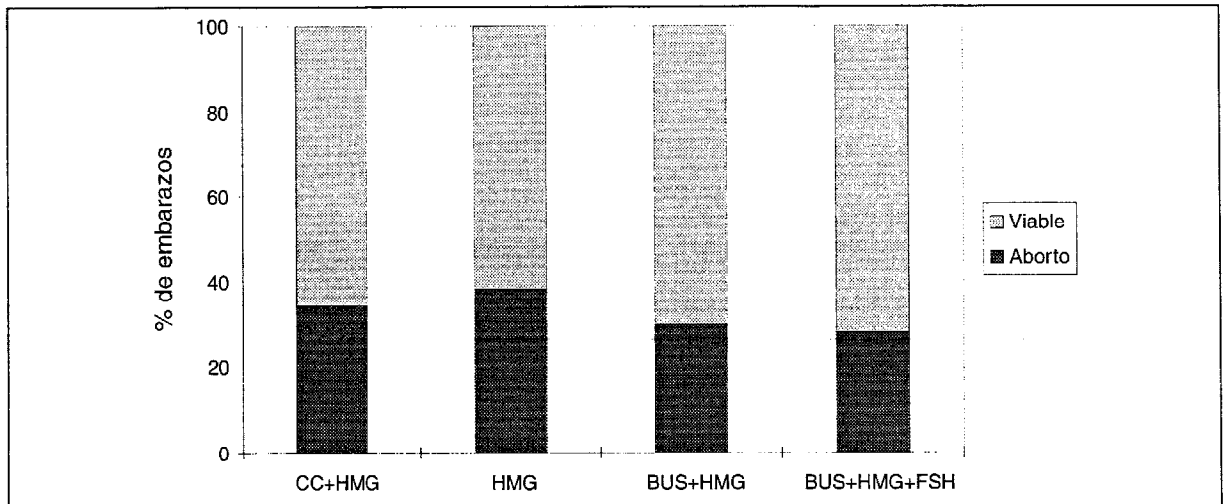


Figura 4. Evolución de embarazos. $\chi^2=0,34$ (3 gl); N/S.

CC: citrato de clomifeno; HMG: gonadotropina menopáusica humana; Bus: buserelín (buserelina); FSH: hormona foliculoestimulante.

rior fue significativamente menor que en los otros protocolos ($p<0,05$). Estos tratamientos tampoco contribuyeron a disminuir el índice de embarazos múltiples.

Finalmente, hay una leve tendencia, aunque no significativa, en el porcentaje de abortos con respecto a los ciclos con aGnRh.

Cuando comparamos los embarazos obtenidos entre los ciclos con HMG sola y los que incluyen aGnRh, encontramos un mejor resultado en estos últimos. Este hecho se podría explicar por los altos niveles de LH endógena que se suma a la de la propia HMG, teniendo una acción deletérea sobre el desarrollo folicular y endometrial ⁽¹⁶⁾.

Los protocolos que incluyen Bus y ambas GN arrojan un índice más alto de embarazos que los que asocian el análogo y HMG. Al comparar los tratamientos con

HMG, Bus + HMG y Bus + HMG + FSH entre sí, no encontramos diferencias significativas en la proporción de embarazos múltiples ni de abortos

Conclusiones

El análisis anterior nos lleva a la conclusión de que la asociación CC + HMG tiene peores resultados en términos de maduración de ovocitos (mayor proporción de PI, no compensado por un porcentaje levemente más alto de formas maduras), de fecundación y de embarazos que los restantes tratamientos estudiados. Por otra parte, tampoco contribuye a disminuir el índice de embarazos múltiples y de abortos. Este hecho hace que actualmente pensemos que el argumento planteado por algunos autores ⁽⁸⁾, de que estos tratamientos son menos costosos y mejor tolerados por las pacientes, no es suficiente para volver

a utilizarlos, ya que como hemos visto en este trabajo los pobres resultados finales no lo justifican. Al comparar entre sí los protocolos de HMG, Bus + HMG y Bus + HMG + FSH los índices de fecundación y embarazos alcanzados fueron más favorables en los ciclos con análogos, fundamentalmente cuando se asocian con ambas GN, como se muestra en la figura 2.

Summary

The present report was drafted with the aim of evaluating the usefulness of the cycles which combine clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin as compared with other three protocols of ovarian stimulation which includes : human menopausal gonadotropin, buserelin, and stimulating follicle hormone in patients submitted to fecundation in vitro. A study was carried out of 188 patients considering : age, maturation of oocytes, presence of fecundation, clinical pregnancies, multiple gestations, abortions and viable pregnancies.

Available results indicate that there were no significant differences in the age of the woman included in each protocol. Conversely, treatment with clomiphene citrate yielded more immature oocytes, less percentage of fecundation and clinical pregnancies, without a decrease in the risk of multiple pregnancies and abortions.

Résumé

Le but de cet article est celui d'évaluer l'utilité des cycles qui combinent le cytrate de clomiphène et la gonadotrophine ménopausée humaine, tout en comparant à trois autres protocoles de stimulation ovarique qui incluent: gonadotrophine ménopausée humaine, busérelina et hormone follicule stimulante, chez des patients qui subirent une fécondation in vitro. 188 patients furent étudiées, tenant compte de leur âge, maturité des ovocytes, présence de fécondation, grossesses cliniques, gestations multiples, avortements et grossesses viables.

Les résultats révèlent qu'il n'y eut pas de grandes différences selon l'âge des femmes incluses à chaque protocole. Cependant, les traitements avec cytrate de clomiphène eurent des ovocytes moins mûrs, un pourcentage plus bas de fécondation et de grossesses cliniques, sans diminution du risque de grossesses multiples et d'avortements. Nos conclusions donc, mènent à déconseiller l'emploi de ce type de traitements, étant préférable l'utilisation de protocoles avec busérelina, aux longs cycles, associés à des gonadotrophines.

Bibliografía

1. Vanrell JA, Balasch J, Cívico S, Balleca JL. Estado actual y perspectivas futuras de la reproducción asistida. *Rev Clin Investig Ginecol Obstet* 1993; 20: 48-56.
2. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.

3. Paulson RJR, Sauer MV, Francis MM, Macaso TM, Lobo RA. In vitro fertilization in unstimulated cycles: the University of Southern California experience. *Fertil Steril* 1992; 57: 290-3.
4. Foulot H, Ranoux C, Dubuisson JB, Rambaud D, Aubriot FX, Poirot C. In vitro fertilization without ovarian stimulation: a simplified protocol applied in 80 cycles. *Fertil Steril* 1989; 52: 617-21.
5. Hoult IJ, De Crespigny LC, O'Herlihy C, Speirs AL, Lopata A, Kellow G et al. Ultrasound control of clomiphene/human chorionic gonadotropin stimulated cycles for oocyte recovery and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1981; 36: 316-9.
6. Jones HW Jr, Acosta AA, Andrews MC, García JE, Jones GS, Mayer J et al. Three years of in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1984; 42:826-34.
7. Steinkampf MP, Kretzer PA, McElroy E, Conway-Myers BA. A simplified approach to in vitro fertilization. *J Reprod Med* 1992; 37: 199-204.
8. Corfman RR, Milad M, Bellavance T, Ory S, Erickson L, Ball G. A novel ovarian stimulation protocol for use with the assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1993; 60 (5): 864-70.
9. Seppala M. The world collaborative report on in vitro fertilization and embryo replacement: current state of the art in January 1984. *Ann NY Acad Sci* 1985; 442: 558-63.
10. Thatcher SS, Donachie KM, Glasier A, Hillier SG, Baird DT. The effects of clomiphene citrate on the histology of human endometrium in regularly cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 296-301.
11. Quintana C. Embarazos obtenidos con ocho ciclos diferentes de estimulación ovárica para FIV. Monografía de Asistente. Facultad de Medicina, Montevideo, 1995.
12. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus and interaction. 2a. ed. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1987: 3-12.
13. Pellicer A, Miró F, Tarín JJ, Ruiz A, Remohí J. Uso de análogos de la gonadotropin-releasing hormone en fertilización in vitro. In: Remohí J, Pellicer A, Bonilla-Musoles F. Avances en Reproducción Asistida. Valencia: Díaz Santos 1992: 1-29.
14. Dirnfeld H, Weitsman Z, Bornstein J, Kahana L, Lisak A, Sorokin Y, Abramovici H. Evaluation of long and short treatments with GnRH analogues in the induction of ovulation for the purpose of in vitro fertilization. *Human Reprod. Abstract del Cuarto Congreso de la Sociedad Europea Reproducción Humana y Embriología (ESHRE)*, 1988: 55.
15. Rabin D, Mc Neil LW. Pituitary and gonadal desensitization after continuous luteinizing hormone-releasing hormone infusion in normal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 873.
16. Tsang BK, Armstrong DT, Whitfield JF. Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1407-11.