

Transferencia embrionaria en modelo ratón

Myr. M.C. Jesús Olvera Carrillo,* Myr. M.C. Claudia Morelos Mellado,* Myr. M.C. Juan Alberto González,*
Myr. M.C. Marta Patricia Fernández Guzmán,** Cor. M.C. Sergio Olivares Morales***

Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

RESUMEN. La transferencia embrionaria (TE) se utiliza para optimizar la fertilización *in vitro* (FIV). Se trata de establecer un modelo experimental de TE que permitiera la implantación y desarrollo de embriones. Se emplearon 53 ratones hembras adultas, 23 donadoras y 22 receptoras. Diez donadoras recibieron estimulación ovárica con gonadotropina coriónica intraperitoneal (i.p., 1 UI/ratón). Catorce receptoras recibieron estimulación endometrial con gonadotropina menopáusica humana (i.p., 2 UI/ratón). Se comprobó la gestación con Papanicolaou en el frotis vaginal. La obtención de embriones fue mayor ($p < 0.05$) en animales con estimulación ovárica comparados con los que no recibieron este tratamiento, tanto en obtención de embriones de 48 h (8.8 ± 1.6 y 6.4 ± 0.6 , respectivamente) como en embriones de 72 h (6.1 ± 0.8 y 4.0 ± 0.7 , respectivamente). El porcentaje de éxito de fertilización fue semejante en animales receptores con o sin estimulación endometrial independientemente de la edad del embrión (50% con y 37% sin estimulación). La duración de la gestación fue mayor ($p < 0.05$) en animales con estimulación endometrial (9.4 ± 0.7 días) comparada con los que no recibieron tratamiento (6.3 ± 0.3 días). Aun cuando el porcentaje de éxito de la FIV fue bajo, se logró establecer un modelo experimental. Se concluye que el número de embriones recuperados fue mayor con estimulación ovárica, siendo su sobrevivencia intrauterina algo más prolongada en animales receptores con estimulación endometrial.

Palabras clave: ratón embrión, transferencia, útero.

La viviparidad confiere grandes ventajas a los embriones de los mamíferos, pero dificulta su estudio *in utero*, y que por muchos años fue misterio y especulación en relación con el desarrollo embrionario temprano. Los avances

SUMMARY. The first birth through *in vitro* fertilization (IVF) in humans was reported in 1978. The multiple ovulation technic using hormone stimulation and embryotransference (ET) improves IVF. The goal of this study was to establish an experimental model of ET in *Mus musculus* mice reaching implantation and embryo growth; 53 female mice were divided into 23 donors and 22 receptors. Ovaric stimulation was done in ten donors with human chorionic gonadotrophin (1 IU/mouse) while 14 receptors received human menopausal gonadotrophin as endometrial stimulation (2 IU/mouse). Pregnancy was confirmed through vaginal Papanicolaou stain. More embryos were obtained from the ovaric stimulated donors compared to donors without treatment, the difference was significant for the 48 h embryos (8.8 ± 1.6 and 6.4 ± 0.6 , respectively, $p < 0.05$), as well as for the 72 h embryos (6.1 ± 0.8 and 4.0 ± 0.7 , respectively, $p < 0.05$). There was no difference in the proportion of successful fertilization with or without endometrial stimulation (50% and 37%, respectively) but embryos survived longer in mice with endometrial stimulation (9.4 ± 0.3 days compare to 6.3 ± 0.3 days without treatment, $p < 0.05$). Even when the percentage of IVF was low in this study, the model was established, obtaining more embryos after ovaric stimulation and longer survival span following endometrial stimulation.

Key words: mouse, embryo, transfer, uterus.

en microscopía e histología incrementaron la información de la estructura, pero no de los mecanismos de desarrollo.

No fue sino hasta hace 100 años que se llevó a cabo la transferencia exitosa de cigotos vivos de conejo de un donador a otro. El desarrollo de métodos de cultivo de huevos y blastocitos se incrementó rápidamente.^{3,4,6,10}

Los primeros métodos de cultivo de embriones post-implantación que tuvieron éxito, fueron realizados en 1930 por Nicholas y Rudnick en América y por Jolly y Lieure en Francia (citados por Copp)¹³ en embriones de rata y cuyos. Pocos años después, el estudio de la capacitación gamética en el tracto genital femenino llevó a la primera fertilización *in vitro* (FIV) en conejos en 1969. Edwards y cols, reporta-

* Originalmente Capitanes Primeros Pasantes de Medicina.

** Profesor Titular de la materia de Embriología de la Escuela Médico Militar.

*** Subdirector de la Escuela Médico Militar y originalmente. Jefe del Servicio de Labor y Expulsión del Hospital Central.

Correspondencia:

Tte. Cor. Martha Patricia Fernández Guzmán. Lab. de Embriología. Escuela Médico Militar. Lomas de Sotelo México DF. 11200

ron la primera FIV de ovocitos humanos, que más tarde llevó al nacimiento del primer bebé nacido por este procedimiento en 1978. Soupart y Strong proporcionaron evidencia ultraestructural de la penetración del espermatozoide al ovocito.^{3,9,10,13,28}

En la actualidad, el desarrollo de estadios post-implantación *in vitro* ha proporcionado modelos adecuados de desarrollo *in vivo*. En embriones de rata y ratón es posible el desarrollo *in vitro* hasta la etapa de línea primitiva, debido probablemente a la capacidad del saco vitelino para crecer en estas condiciones y así proporcionar una superficie nutricional y de intercambio respiratorio entre embrión y sustrato. El crecimiento tardío de estos especímenes no se ha obtenido por lo que se tiene que recurrir a la transferencia de los mismos al útero. Aunque esto provoca menos control de las condiciones experimentales, es posible continuar el desarrollo del embrión hasta el nacimiento e incluso hasta la etapa adulta, además de que puede hacerse alguna manipulación *in utero* con considerable precisión.¹⁰

El término de reproducción asistida surgió para definir el empleo de tecnología altamente especializada que sustituye o complementa al contacto sexual para que la fertilización ocurra en algunos casos de esterilidad.²¹

Las primeras técnicas de inseminación que se utilizan, consisten en introducción de semen fresco del donante en el útero de una hembra receptora sin efectuar un contacto sexual. La técnica más utilizada hasta la fecha es la inseminación intrauterina (IIU), además de la intracervical, vaginal, intraperitoneal (IIP) e intrafolicular (IIF). Con estas técnicas las tasas de fecundidad varían entre 40 y 75%. Un procedimiento modificado es la perfusión espermática a oviductos que combina IIU y transferencia de gametos intratubaria (TGIT), ya que implica la inseminación de espermatozoides capacitados vía transcervical.^{3,9,17,21}

El concepto de transferencia embrionaria (TE) se aplicó por primera vez a finales del siglo pasado durante experimentos en conejos. En 1949 esta metodología se aplicó para mejorar el potencial genético del ganado vacuno, bovino y porcino. Este método consiste en la estimulación hormonal de los ovarios de un grupo de hembras genéticamente mejor dotadas, inducción de la ovulación e inseminación artificial. Los embriones resultantes se aspiran con un catéter de Foley y son transferidos a una hembra receptora. Las técnicas de ovulación múltiple-TE son usadas de manera rutinaria para mejorar rápidamente la base genética animal.^{9,21,29}

La FIV ha llegado a ser un método muy útil para tratar la infertilidad en parejas que no pueden tener hijos. El rango de embarazos es del 20-30%, aunque muchos de estos (30 a 50%) no llegan a término. Varias ramas de FIV se aplican actualmente para asistir la concepción humana, éstas incluyen, TGIT, transferencia de cigotos intratubaria (TZIT) y transferencia espermática por microinseminación y FIV-TE.^{3,9,12,14,21,25,27,28,31}

Material y métodos

Fase 1. Se estudiaron ratonas adultas de la cepa *Mus musculus*, de 20 a 30 gramos de peso, alimentadas con nutrientes y agua *ad libitum*, temperatura y humedad controladas, ciclos de luz-obscuridad de 12/12 horas. Diariamente se efectuó exploración genital y citología vaginal, tiñéndose las improntas por técnica de Papanicolaou para evidenciar características celulares y etapa del ciclo estral apropiadas para la fertilización y transferencia de embriones. Una vez obtenido el Papanicolaou se separaron las hembras en fase de estro y se colocaron con los machos para apareamiento corto (dos horas) verificando la monta. A las 12 y 24 horas de apareamiento se revisaron las hembras buscando la presencia del tapón de copulación en la vagina y/o espermatozoides en frotis vaginal positivo para fertilización).

Para la realización del estudio, las hembras se dividieron en donadoras y receptoras.

a) Ratonas donantes. Para la mayor obtención de embriones se establecieron dos grupos de ratonas donantes: grupo A, ratonas sin estimulación y grupo B, ratonas con estimulación: 2.0 UI de gonadotropina coriónica humana (Sector Salud), vía intraperitoneal.

b) Ratonas receptoras. Las ratonas receptoras se dividieron como sigue: A) sin administración exógena de gonadotropina postmenopáusica humana, sólo separadas del macho por una rejilla y B) con gonadotropina postmenopáusica humana (1 UI por vía intraperitoneal, 24 horas antes de la transferencia).

Fase 2. Con el fin de obtener embriones en etapa de diferentes edades y a fin de establecer dos grupos de estudio, se sacrificó a las hembras por dislocación cervical a las 48 y 72 horas. Se eliminaron del estudio aquellas en que el frotis vaginal para detectar espermatozoides fue dudoso. Previa asepsia y antisepsia de la pared abdominal, se disecaron las trompas y cuellos uterinos, mismos que se colocaron en cajas de embriones estériles con medio de cultivo HTF estéril enriquecido con: NaHCO_3 con pH de 7.3 a 7.5 al 0.11%, suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 200 mM al 3%, piruvato de Na 100 mM al 1.2%, beta mercaptanol al 0.1% y gentamicina 0.1 mg/ml.

Se perfundieron bajo microscopía estereoscópica, con jeringas de insulina, aguja 27 X 13 llenas con el mismo medio. Se aislaron los embriones en dos grupos: grupo I: 48 horas (mórulas) y grupo II: 72 horas (blastocisto temprano).

Los embriones se recuperaron con un catéter 246 (polímero radio-opaco) y se transfirieron inmediatamente, en número de 2 a 5, por vía transvaginal a una hembra receptora en fase de estro tardío, no anestesiada.

Fase 3. Se dejó continuar la gestación y diariamente se revisaron las hembras gestantes anotándose si existían datos de infección, sangrado u otros incidentes del procedimiento. El desarrollo de la gestación se verificó por exploración física diaria y citología vaginal cada 48 horas.

Los datos obtenidos se recopilaron en tablas y se analizaron mediante la prueba de Student-Newman Keuls y Mann-Whitney, tomando como significativos los valores de

$p < 0.05$ en relación con número de embriones obtenidos y continuidad de la gestación.

Resultados

Fase 1. Se estudiaron 53 ratonas hembras de la cepa *Mus musculus*, en las cuales se corroboró diariamente el ciclo sexual mediante patrones citológicos y características anatómicas de los genitales externos. Las hembras fueron divididas de la manera siguiente: 8 (15.09%) para estandarización de la técnica, 23 (43.39%) donadoras (10 sin estimulación ovárica) y 22 (41.50%) receptoras (8 sin estimulación endometrial) (Cuadro 1).

Se efectuaron 861 citologías vaginales con tinción de Papanicolaou, 82 (9.52%) fueron positivas a etapa de estro; 31 de los animales positivos a estro se sometieron a apareamiento corto, 8 de las cuales fueron empleadas para estandarización de las diversas fases de la técnica.

A. Ratonas donantes

a) En el grupo sin estimulación ovárica (10 animales), se obtuvieron $6.4 (\pm 0.6)$ embriones de 48 horas y $4 (\pm 0.7)$ embriones de 72 horas.

b) En el grupo con estimulación ovárica (12 animales) se obtuvieron $8.8 (\pm 1.6)$ embriones de 48 horas y $6.1 (\pm 0.8)$ embriones de 72 horas, con diferencias estadísticamente significativas entre recuperación de embriones a las 48 y 72 horas en animales no estimulados ($p < 0.05$) y en la obtención de embriones de 48 y 72 horas entre con y sin estimulación ovárica (Cuadro 2).

Cuadro 1. Distribución y características de los animales.

Características	Número	Porcentaje
Estandarización	8	15.09
Donador sin HGC	10	18.86
Donador con HGC	13	24.52
Receptor sin HGC	8	15.09
Receptor con HGC	14	26.41
Total	53	100

Cuadro 2. Embriones obtenidos con y sin estimulación ovárica, ratón donante.

Características	48 horas	72 horas
Sin estimulación*	$6.4 \pm 0.6^{***}$	4.0 ± 0.7
Con estimulación**	8.8 ± 1.6	6.1 ± 0.8

* N 10

** N 12

*** $p < 0.05$

Entre las complicaciones observadas en esta fase del estudio, en 27 hembras (13 donantes y 14 receptoras) que recibieron tratamiento con HGC, se encontró: 1 (3.7%) adenocarcinoma poco diferenciado en un teratoma de ovario a los tres meses de administración del medicamento; 1 (3.7%) hiperestimulación ovárica.

Fase 2. B. Ratonas receptoras

a) Grupo sin preparación endometrial. Se transfirieron 15 embriones de 48 horas a 4 hembras, observándose Papanicolaou positivo a gestación durante 7 días en 1 (25%), 6 días en 1 (25%) y expulsión inmediata o en las primeras 24 horas en 2 (50%).

Se transfirieron 15 embriones de 72 horas a 4 hembras, observándose Papanicolaou positivo a gestación durante 6 días en 1 (25%) y expulsión inmediata o en las primeras 24 horas en 3 (75%).

b) Grupo con preparación endometrial. Se transfirieron 21 embriones de 48 horas a 5 hembras, observándose Papanicolaou positivo a gestación durante 12 días en 1 (20%), 10 días en 1 (20%), expulsión inmediata en 2 (40%).

Se transfirieron embriones de 72 horas a 5 hembras, observándose Papanicolaou positivo a gestación durante 9 días en 1 (20%), 8 días en 1 (20%) y expulsión inmediata en 3 (60%).

La duración de la gestación en hembras no estimuladas con embriones de 48 horas fue de 3.25 días (± 1.88) y con embriones de 72 horas de 1.50 días (± 1.50).

La duración de la gestación en hembras receptoras estimuladas de embriones de 48 horas fue de 6.00 días (± 2.52) y con embriones de 72 horas de 3.40 días (± 2.08). La duración de la gestación fue mayor ($p < 0.05$) entre animales con estimulación endometrial (9.4 ± 0.7 días) comparada con los que no recibieron tratamiento (6.3 ± 0.3 días).

En las no estimuladas se observó eliminación inmediata en 5 (62.5%) y en las estimuladas en 5 (50%). En ninguno de los casos se llegó a término de la gestación. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

Entre las complicaciones observadas en 22 hembras estudiadas en las fases 2 y 3 del estudio, se encontraron: muerte materna por anestesia en el transoperatorio 4 (18.18%), expulsión inmediata en 10 (45.45%) y muerte temprana del producto en 8 (36.36%).

Discusión

La reproducción asistida se ha convertido en un método aceptado para el tratamiento de la infertilidad, aunque debe considerarse que la práctica de este tipo de tratamientos se asocia a un alto rango de complicaciones durante la anestesia, obtención de embriones, TE y técnicas quirúrgicas. Cabe destacar que aun las TE exitosas pueden ocasionar aborto y que del 30-35% de los casos no lleguen a término, lo que explicaría en parte nuestros resultados.^{12,14,16,20,25,27,30}

Un inconveniente de FIV es el bajo porcentaje de embarazos (20-30%) después de TE uterina vía transcervical por la expulsión del líquido 5-15 minutos posteriores a la TE,

probablemente debido a contracciones uterinas inducidas por la manipulación. Otros estudios han demostrado que aun en ausencia de trauma endometrial, los embriones pueden ser expelidos de la vagina en forma temprana o en forma tardía. Este hecho se corroboró en nuestro estudio durante las primeras 24 horas postransferencia. Una solución a este problema ha sido el tratamiento con naproxeno 2 horas antes y 30 minutos después de la transferencia, observándose expulsión menos enérgica.^{7,11,26}

La técnica de TE ha sido criticada por el riesgo de complicaciones tales como: introducción de microorganismos, liberación de prostaglandinas después de estimulación cervical y en algunos casos reflujo de embriones en el moco cervical después de un procedimiento en aparencia perfecto. En nuestro estudio no hubo datos de infección en los animales sometidos a TE, aunque sí de expulsión de embriones.¹⁵

Como una alternativa a este método se ha sugerido la transferencia transmiometrial en caballos, borregos y vacas, con mejores resultados que el método transcervical, en relación con el número de embarazos. Es conveniente que esta técnica sea estudiada en un futuro en la Escuela Médico Militar.¹⁵

La TE es mejor cuando se realiza a través de las tubas que a través del cérvix, lo cual se debe probablemente a influencia positiva de las trompas. Estudios experimentales en animales de laboratorio han demostrado que los embriones que se desarrollan en las tubas tienen un mejor pronóstico que las cultivadas *in vitro*.⁷

Estudios experimentales han llevado al tratamiento con gonadotropina coriónica para producir ovulación múltiple en 15 especies de mamíferos. El papel de la inducción ovulatoria usando gonadotropina con o sin inseminación o FIV es controvertido debido a la ausencia de estudios prospectivos. Sin embargo, en nuestro caso, fue de utilidad por permitir aumentar el número de embriones recuperados, con el consiguiente incremento de la transferencia.^{2,13,18,19,22,24,31} (Cuadro 2).

La superovulación es fácil de producir en ratones en 75-80% de los casos, obteniéndose hasta 30 embriones por ratón en etapa de 2 células. La hembra requiere de un periodo previo de adaptación de un mínimo de 2 semanas. En hembras no aclimatadas los embriones con frecuencia se encuentran fragmentados al momento de la extracción. También es importante el medio de cultivo para el mantenimiento del embrión y su enriquecimiento con suplemento sérico. Este procedimiento sirvió de base para la estimulación ovárica en nuestro estudio. Los embriones dañados se excluyeron del estudio. En nuestro estudio se extrajeron de 8.8 ($\pm$ 4) mórulas y 6.1 ($\pm$ 2.1) blastocistos. El porcentaje de embriones fue mayor en animales estimulados, aunque el bajo porcentaje de extracciones con respecto a otros autores puede deberse a dificultades inherentes a la técnica de extracción o al tipo de fármaco. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la obtención de embriones de 48 y 72 horas, siendo más fáciles de obtener y con mejor supervivencia los de 48 horas^{1,11} (Cuadro 2).

Yaron, en un estudio en mujeres tratadas con HMG obtuvo un promedio de 7.4 ± 1.7 ovocitos y 4.6 ± 1.3 embriones por ciclo. El porcentaje de implantación fue del 26-35%, con un promedio de 4.2 embriones transferidos por ciclo.³⁴

Por acción gonadotrópica, las células de la granulosa se separan de la membrana basal adyacente a las células teca-les. Los ovocitos reanudan la meiosis, detenida en la profase 1. Las células de la corona radiada cambian dramáticamente en forma y orientación y se expanden. La ruptura de las células de la granulosa y la expansión de la corona radiada separan al ovocito, el cual flota libremente en la cavidad folicular. En mujeres estimuladas hormonalmente, este proceso depende del momento y dosis de administración de HCG. Este hecho es demostrable en animales y se corroboró en nuestro estudio durante la fase de adiestramiento.²

Entre las complicaciones observadas en este procedimiento se ha detectado falla de respuesta a la administración de gonadotropinas exógenas. Por otra parte se han encontrado tasas de embarazo de hasta el 85% en mujeres estimuladas con hormona del crecimiento; la razón de estos hallazgos es desconocida, pero se cree que se debe a que la hormona del crecimiento influye positivamente sobre la maduración de los ovocitos y fertilización. En nuestro estudio no se observó falla de respuesta a la administración hormonal exógena de gonadotropinas, aunque las dosis deben ser revaloradas.^{8,26,33}

Como consecuencia de la administración de gonadotropinas exógenas, se ha provocado hiperestimulación ovárica, síndrome que se manifiesta como: crecimiento ovárico masivo, irritación peritoneal, torsión ovárica, ascitis, derrame pleural, hemoconcentración, oliguria, desequilibrio hidroelectrolítico e hipercoagulabilidad sanguínea, debidas al incremento de la permeabilidad capilar mediadas por prostaglandinas y sistema renina-angiotensina, lo que conduce a incremento de líquido dentro del espacio intravascular, peritoneo y cavidad pleural, decremento de la perfusión y excreción renales, fallas de funcionamiento hepático, disnea, tromboembolia y hemoconcentración. En nuestro estudio se observaron datos compatibles con síndrome de hiperestimulación ovárica en una hembra donadora, motivo por el cual se excluyó del estudio y se mantuvo en observación.^{18,19,25,31}

Existen diferencias en la capacidad de producir estimulación ovárica entre diferentes sustancias, tales como HCG y HMG debido a los procedimientos implicados en la extracción, purificación y sustrato urinario, lo que hace diferencias en la manufactura y calidad entre diferentes marcas y lotes, alterando los resultados y consistencia de la estimulación. En este estudio se emplearon gonadotropinas del sector salud del gobierno y se recomienda el empleo de una misma marca y lote en estudios posteriores, así como la comparación entre diferentes sustancias estimulantes de la ovulación.^{23,28}

Otra complicación es el riesgo de cancer genital. La gonadotropina por sí misma posee efectos carcinogénicos,

aunque no existen estudios serios al respecto. La hormona liberadora de gonadotropinas y su ARN mensajero posiblemente juegan un papel en la regulación endocrina del carcinoma de ovario, pero la investigación debe continuar en esta área tan controvertida.^{18,25}

La asociación de cáncer con inducción ovárica ha sido sugerida, fundamentalmente en mama y ovario. Esto se debe a que la estimulación persistente de los ovarios asociada con crecimiento folicular múltiple y altos niveles de estrógenos durante la inducción de la ovulación son un factor de riesgo de cáncer de ovario en una hembra donadora hiperestimulada, aunque debe descartarse la asociación incidental de este proceso en estudios posteriores²⁵ (*Cuadro 3*).

Cuadro 3. Complicaciones por estimulación ovárica.

Características	Número	Porcentaje
Cáncer ovárico	1	3.7
Hiperestimulación ovárica	1	3.7
Falla estimulación	0	0

Fujimoto y cols. (citado por Shoham³⁷) realizaron un estudio en blastocistos de conejos obtenidos después de estimulación ovárica con HGC, encontrando 9.7% blastocistos anormales. Otros estudios no han mostrado diferencias significativas con la población en general. Por otro lado, el tratamiento con HGC disminuye el rango de embarazo por alteración de la receptividad endometrial después de la TE. Sin embargo en FIV-TE existen otros factores involucrados en la implantación del embrión independientes de la receptividad endometrial, tales como: daño por introducción del catéter, ruptura tubaria, sangrado intraperitoneal, infección e incluso muerte. En nuestra investigación, algunos de estos factores pudieron influir en los resultados obtenidos.^{7,19,22,27,31,34}

La FIV-TE se asocia con embarazos ectópico y heterotópico probablemente por transferencia de un gran volumen de medio de cultivo y colocación de embriones sin guía ultrasonográfica. Algunos autores redujeron este problema ligando los cuernos uterinos. Esta complicación no se observó en nuestro estudio, debido al escaso volumen de líquido transferido.^{26,31}

Durante la concepción normal, los embriones alcanzan la cavidad uterina hacia el cuarto o quinto día después de la fertilización. La FIV proporciona embriones de 2 días que requieren de 90 a 99 horas de clivaje en la cavidad uterina antes de alcanzar la etapa de blastocisto. Estas condiciones del medio ambiente pueden conducir a fallas tempranas, ya que varios embriones degeneran después de la etapa de 4 a 6 células. Además FIV carece de las señales gestacionales que proporciona el embrión en las trompas uterinas y esto lleva a fracaso en la implantación. Este acontecimiento puede ser la causa de la muerte temprana de nuestros embriones.⁹

En conclusión, la estimulación hormonal incrementa el número de embriones recuperados por ciclo. La prepara-

ción endometrial incrementa la posibilidad de implantación y la duración de la gestación, aunque puede afectar la receptividad endometrial, hecho que se manifiesta en un alto índice de muerte temprana, por lo que debe adecuarse la dosis de estos medicamentos.

La citología vaginal seriada es de utilidad para determinar la falta de progresión de la gestación. La transferencia embrionaria es el procedimiento en el cual influyen factores embrionarios y endometriales, que dificultan el éxito de la técnica; sin embargo, es reproducible en animales de laboratorio y debe constituir la base del conocimiento y fundamento para conocer el ciclo menstrual, el desarrollo embrionario y que ayude a la reproducción asistida. Falta más investigación y además aumentar el número de animales para estandarizar y sacar conclusiones aplicables a la técnica reproductiva.

Referencias

1. Ackerman S. Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. *Gamete Research* 1984; 9: 145-152.
2. Abdalla H, Ah-Moye M, Brinsden P, Lim D, Okonofua F, Crafty I. The effect of the dose of human chorionic gonadotrophin and the type of gonadotrophin stimulation on oocyte recovery rates in an in vitro fertilization program. *Fert Steril* 1987; 48: 958-963.
3. Altamirano A, López A, Maldonado G. Medio de cultivo embrionario (HTF) para fertilización in vitro en sistema ratón. Tesis 1995. Escuela Médico Militar.
4. Austin R, Short R. Control artificial de la reproducción. México. La Prensa Médica Mexicana, 1982.
5. Austin R, Short R. Desarrollo embrionario y fetal. México. La Prensa Médica Mexicana 1982.
6. Balinsky B. Introducción a la embriología 3ra. ed. Barcelona. Ed Omega, 1975.
7. Balmaceda J, Alam V, Roszttein D. Embryo implantation rates in oocyte donation: A prospective comparison of tubal versus uterine transfers. *Fert Steril* 1992; 57: 362-365.
8. Berhg C, Hillensgo T, Wikland M, Nilson L, Borg G, Hamberger L. Adjuvant growth hormone treatment during in vitro fertilization: A randomized placebo controlled study. *Fert Steril* 1994; 62: 113-120.
9. Bongso A, Soon-Chye C, Chui-Yee F, Ratms S. Cocultures: A new lead embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fert Steril* 1991; 56: 179-191.
10. Coop A, Cockroft. Postimplantation mammalian embryos. A practical approach. Ed Rickwood and Hames, 1990.
11. Davidson A, Vermesh M, Lobo R, Paulson R. Mouse embryo culture as a quality control for human in vitro fertilization. *Fert Steril* 1988; 49: 516-521.
12. Edwards R, Steptoe P. Current status of in vitro fertilization and implantation of human embryos. *Lancet* 1983; 3: 1265-1269.
13. Fivnat. French national IVF registry: Analysis of 1986 to 1990 data. *Fert Steril* 1993; 59: 587-595.
14. Hayes M, Sacco A, Savor-Moore R, Magyer D, Endler G, Moghissi K. Effect of general anesthesia on fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. *Fert Steril* 1987; 48: 975-981.
15. Ktao O, Takatsuka R, Asch R. Transvaginal-transmyometrial embryo transfer. *Fert Steril* 1993; 59: 51-53.
16. Medical Research International Society for Assisted Reproductive Technology: in vitro fertilization embryo transfer in the United States. 1987 results from the national IVF-ET registry. *Fert Steril* 1987; 51: 13-19.
17. Nilsson L. Nacer, la gran aventura. México. Ed. Salvat, 1990.

18. Ohno T, Imai A, Furui T, Tkashashi K, Tamaya T. Presence of gonadotrophinreleasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian ephitelial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 605-610.
19. Paulson R, Sauer M. Embryo implantation after human in vitro fertilization: Importance of endometrial receptivity. *Fert Steril* 1990; 53: 870-874.
20. Pampiglione J, Sharma V, Riddle A, Mason B, Cambell S. The effect of cycle length on the outcome of in vitro fertilization. *Fert Steril* 1988; 50: 603-606.
21. Pérez E. Infertilidad, esterilidad y endocrinología de la reproducción. 2a ed. México. Ed. Salvat, 1995.
22. Peterson M, Hatasaka H, Parker K. Ovulation induction with gonadotrophins and intrauterine insemination and no therapy. *Fert Steril* 1994; 62: 535-544.
23. Rector N, Markusen T, Stone B, Marrs R. Numbers and quality of oocytes after induction of multiple folliculogenesis in women and mice with different lots of human menopausal gonadotrophins. *Fert Steril* 1993; 60: 1082-1087.
24. Sauer M, Anderson R, Paulson R. Atrial of superovulation in ovum donors undergoing uterine lavage. *Fert Steril* 1989; 51: 131-134.
25. Schenker J, Ezra Y. Complications of assisted reproductive techniques. *Fert Steril* 1994; 61: 411-422.
26. Schulman J. Delayed expulsion of a transfer fluid after IVF-ET. *Lancet* 1986; 1: 44.
27. Stadmauer L, Ditzkoff E, Session D, Kelly A. High dosages of gonadotrophins are associated with poor pregnancy outcome after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fert Steril* 1994; 61: 1058-1063.
28. Sterzik K, Dallenbach C, Schneider V, Sasse V. In vitro fertilization: The degree of endometrial insufficiency varies with the type of ovarian stimulation. *Fert Steril* 1988; 50: 457-461.
29. Trounson A, Conti A. Research in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Br Med J* 1982; 285: 244-288.
30. Wagner M, Clair P. Are in vitro fertilization and embryo transfer of benefit of all. *Lancet* 1989; 28: 1027-1029.
31. Wallach E. Gonadotrophins treatment for the ovulatory patient, the pros and cons of empiric therapy for infertility. *Fert Steril* 1991; 55: 478-480.
32. Wittmaack F, Kreger D. Effect of follicular size. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization cycles. *Fert Steril* 1994; 62: 1205-1209.
33. Yaron Y, Botchan A, Amit A, Peyuser M. Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies. *Fert Steril* 1994; 62: 225-231.
34. Yovich J, Rohini W. The relative chance of pregnancy following tubal or uterine transfer procedures. *Fert Steril* 1988; 49: 858-864.