

Correlacion entre el número de ovocitos y la tasa de gestación en ciclos FIV-ICSI

Correlation between the number of oocytes and the pregnancy rate in IVF-ICSI cycles

Molina Hita M^a M, Lobo Martínez S, González Varea C, Montejo Gadea J M, Garijo López E, Cuadrado Mangas C

Servicio de reproducción del Hospital Maternal de La Paz. Madrid

Resumen

Objetivos: *Evaluar la tasa de gestación de los ciclos de FIV-ICSI en función al número de ovocitos recuperados y establecer una correlación entre esta variable y otras (edad, porcentaje de ovocitos maduros, media de embriones obtenidos, tasa de fecundación etc).*

Material y métodos: *Estudio retrospectivo de 299 ciclos puncionados de FIV-ICSI entre enero y diciembre de 2006. Protocolos de estimulación: largo con análogos y corto con antagonistas de GNRH y estimulación con FSHr sola o en combinación con HMG o LHR. Se dividió la muestra en tres grupos según el número de ovocitos recuperados : grupo 1 (0-6); grupo 2 (7-16) grupo 3 (> 16)*

Resultados: *Respecto al total de la muestra, la media de ovocitos por ciclo fue de $9,44 \pm 5,7$. La tasa de gestación total / TE fue del 33,7% . La tasa de gestación fue del 21%, 40% y 38,5% para cada uno de los grupos de estudio, diferencias que fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).*

Encontramos diferencias significativas en los tres grupos de estudio en: edad media de las pacientes y media de embriones. La mayor tasa de fecundación se obtuvo en el grupo 2 (76,35%). Comparando los tres grupos, las diferencias no fueron significativas. Encontramos que el rango óptimo de ovocitos, con mejores resultados fue el grupo 2 (6- 16 ovocitos) con una media de ovocitos de 10,5. El grupo 2 se asoció a menor número de embriones, y menor tasa de fecundación y gestación. El grupo 3 se asoció a mayor tasa de cancelación de transferencia embrionaria por riesgo de SHO, sin mayor tasa de gestación .

Conclusiones: *Aunque hay que hacer consideraciones individuales, consideramos que la tendencia debe ser el utilizar regímenes de tratamiento moderados que consigan un número razonable de ovocitos .En nuestro caso los mejores resultados se obtuvieron en el grupo 2 (7-16), con una media de 10,5 ovocitos.*

Palabras clave: Ovocitos.Fecundación in Vitro. Tasa de gestación. Antagonistas.Agonistas de GnRH.

Correspondencia: Dra. Maria del Mar Molina Hita.
Hospital universitario La Paz.
Pº de la Castellana 26128046. Madrid. España.
mariadelmarmolina@hotmail.com

Summary

Objetivos: *To evaluate the pregnancy rate of the cycles IVF-ICSI according to the number of retrieved oocytes and establish a correlation between this variable and others (age, mature oocytes, the average of embryos obtained, fecundation rate etc).*

Materials and methods: *Retrospective study of 299 retrieved cycles of IVF-ICSI between January and December 2006. Stimulation protocols: long with agonists and short with antagonists of GnRH and stimulation with FSHr alone or in combination with HMG or LHr. The sample was divided into three groups according to the number of retrieved oocytes: group 1 (0-6), group 2 (7-16) and group 3 (>16).*

Results: *With regard to the total of the sample, the average of oocytes, that each cycle had, was $9,44 \pm 5,7$. The total pregnancy rate / embryo transfer was of 33,7%. The pregnancy rate was 21%, 40% and 38,5% for each one of the study groups, differences that were statistically significant ($p < 0,05$). We find significant differences in the three groups of study: patients' average age and average of embryos. The biggest fecundation rate was obtained in group 2 (76, 35%). Comparing the three groups, the differences were not significant. We find that the optimum range of oocytes with the best results was group 2 (6 – 16 oocytes) with an average of 10, 5. Group 2 was related to a lower number of embryos, and to a lower fecundation and pregnancy rate. Group 3 was related to a higher cancellation rate of embryo transfer due to the risk of OHS (ovarian hyperstimulation syndrome), without a higher pregnancy rate.*

Conclusions: *Although personal considerations need to be done, we consider that the trend should be that of using protocols of moderate treatments that will get a reasonable number of oocytes. In our case the best results were obtained in group 2 (7-16), with an average of 10, 5 oocytes.*

Key words: Oocyte. In Vitro fertilization. Pregnancy rate . Antagonist. GnRH Agonist.

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de los tratamientos inductores de la ovulación aplicados a ciclos de FIV-ICSI el objetivo fue conseguir un gran número de ovocitos maduros capaces de fecundar y así disponer de un adecuado número de embriones de buena calidad disponibles para transferir y congelar. Los ciclos con baja respuesta ovárica conllevan bajo número de ovocitos recuperados y menores posibilidades de concebir (1). Sin embargo la superovulación tiene como contrapunto el potencial riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica como complicación. Además existen evidencias de que la excesiva respuesta a la estimulación puede ser perjudicial para la calidad embrionaria y la receptividad endometrial. (2).

El número de ovocitos recuperados por sí solo, con independencia de la edad y la reserva ovárica es un factor predictivo de la tasa de gestación (3).

Para obtener el mejor resultado posible en FIV-ICSI, se ha de conseguir un "razonable" número de ovocitos tras la estimulación ovárica. La cuestión es ¿cuál es ese número razonable?. Se ha propuesto que tal vez haya un rango óptimo de ovocitos para asegurar la transferencia embrionaria y gestación (4).

Con todas estas consideraciones previas, quisimos

estudiar si el número de ovocitos recuperados podía servir de predictor del éxito.

Nuestro objetivo principal fue: evaluar la tasa de gestación de los ciclos de FIV-ICSI en función al número de ovocitos recuperados en la punción folicular; ver también como influye la edad, y establecer una correlación entre el número de ovocitos recuperados y otras variables como porcentaje de ovocitos maduros, media de embriones obtenidos, tasa de fecundación, riesgo de cancelación de la transferencia embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 299 ciclos de FIV-ICSI que llegaron a punción folicular entre enero de 2006 y diciembre de 2006. Los protocolos utilizados para la estimulación ovárica fueron dos: protocolo largo con análogos de la GnRH o protocolo corto con antagonistas de la GnRH, ambos casos con estimulación ovárica con FSH-r sola o en protocolo combinado con HMG altamente purificada o LH-r. La utilización de uno u otro protocolo se hizo en función de la edad, FSH basal, número de folículos antrales y respuesta a ciclos previos (en el caso de haberlos). Se realizaron controles con ecografía vaginal y medición del estra-

diol sérico. Cuando al menos 3 folículos de 18 mm de diámetro mayor se conseguían, se inducía la ovulación con 5000-10000 unidades de HCG o 250mcg de HCG-r y 36 horas más tarde la punción folicular transvaginal ecoguiada.

La valoración del número de ovocitos, ovocitos maduros, tasa de fecundación, embriones disponibles y tasa de gestación, se hizo según los criterios clásicos. La transferencia embrionaria se realizó a las 48-72h de la punción, siendo el número de embriones transferidos de uno, dos o tres. En todos los ciclos se hizo apoyo de fase lútea con 400-600mg/d de progesterona natural micronizada desde el día de la punción hasta la semana 12 en los casos en los que hubo gestación. Se consideró como gestación positiva la visualización de saco gestacional con latido cardíaco positivo.

Para evaluar nuestros resultados en función al número de ovocitos recuperados, dividimos la muestra en tres grupos: GRUPO 1 (0 – 6 ovocitos). GRUPO 2 (7 – 16 ovocitos) GRUPO 3 (>16 ovocitos).

Los datos se han analizado mediante el programa estadístico SPSS 9. La descripción de los datos cualitativos se realiza en forma de frecuencias absolutas y porcentajes y los datos cuantitativos mediante media, mediana y desviación típica según sea la distribución de los datos.

El análisis estadístico de las variables cualitativas se realizó mediante Test de chi-cuadrado o Test de Fisher según el caso. Para las comparaciones múltiples se utilizó la corrección de Bonferroni. Y la comparación de las variables cuantitativas entre grupos se

analizó mediante análisis ANOVA o Kruskal-Wallis según el caso.

Todos las pruebas estadísticas se han considerado bilaterales y como valores significativos, aquellos $p < 0.05$.

RESULTADOS

De los 299 ciclos que llegaron a punción en 252 casos llegaron a transferencia embrionaria (84,3%) y 47 ciclos que no llegaron a transferirse (15,7%) por no obtenerse ovocitos y/o embriones o por riesgo de SHO en cuyo caso se procedió a congelar los embriones.

El análisis descriptivo del total de la muestra queda reflejado en la tabla 1.

La edad media de las pacientes fue de $35,25 \pm 3,2$ (R 22-43). La media de ovocitos por ciclo fue de $9,44 \pm 5,7$ (R 0-31), la media de ovocitos maduros fue de $7,67 \pm 5,1$ (R 0-29). El porcentaje de ovocitos maduros de la muestra (metafase II en el momento de la punción) fue de 79,69%. La media de ovocitos microinyectados fue de $6,76 \pm 4,7$ y de inseminados $7,95 \pm 6,9$; de fecundados $5,82 \pm 4,4$; Se obtuvo una tasa media de fecundación de 74,24%. La media de embriones conseguida en cada ciclo fue de $5,16 \pm 4$, y la de criopreservados de $2,25 \pm 3,4$ por ciclo puncionado.

La técnica de laboratorio empleada fue FIV 7%, FIV-ICSI 6,4%, FIV/ICSI de rescate 2%, ICSI 76,9%, ICSI/ICSI de rescate 3,3%, ICSI de rescate 1,3%.

Tabla 1

Análisis descriptivo de toda la muestra (299 ciclos) para cada una de las variables reflejadas. Se refleja la media, mediana, desviación estándar y valor máximo y mínimo para cada variable.

	N Validos	N perdidas	media	mediana	Desviación estándar	mínimo	máximo
Edad ajustada	299	0	35.25	35.37	3.204	22	43
Nº ovocitos	299	0	9.44	8.00	5.771	0	31
Nº ovocitos maduros	299	0	7.67	7.00	5.183	0	29
% de ovocitos maduros	294	5	79.69	86.96	22.547	0	100
Nº ovocitos microinyectados	289	10	6.76	6.00	4.787	0	25
Nº ovocitos inseminados	56	243	7.95	7.00	6.940	0	31
Nº ovocitos fecundados	299	0	5.82	5.00	4.456	0	23
Nº de embriones	299	0	5.16	5.00	4.040	0	20
Nº embriones criopreservados	299	0	2.25	0.00	3.407	0	17

El número de embriones transferido fue de uno 12,69%, dos en el 51,58% y tres en el 35,31% de los casos.

Hubo 85 gestaciones clínicas, lo que supone una tasa de gestación por ciclo puncionado del 28,4% y por transferencia embrionaria del 33,7%.

De los 299 ciclos, el grupo 1 (n = 103) supuso el 34,4% de los ciclos; grupo 2 (n= 160) el 53,5% y grupo 3 (n= 36) el 12%.

Sobre el total de los ciclos transferidos (n=252) la distribución por grupos fue de 32,1% (n=81), 57,5% (n = 145) y 10,3% (n= 26) para los grupos 1, 2 y 3. (Figura 1).

Los resultados por grupos de ovocitos : grupo 1 (0-6 ovocitos) , grupo 2 (7-16) y grupo 3 (>16) es el siguiente:

La tasa de gestación obtenida para cada uno de los grupos fue de 21%, 40% y 38,5% respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (Figura 2)

La media de ovocitos en cada grupo fue de 3,83 , 10,5, y 20,82 para cada uno de los grupos .

La edad media, porcentaje de ovocitos maduros y tasa media de fecundación de cada uno de los grupos queda reflejado en la tabla 2. La media de edad mas alta correspondió al grupo 1 con $35,83 \pm 3,02$ años de media, mientras que las pacientes mas jóvenes eran las del grupo 3 (edad media de $34,46 \pm 3,4$). Comparada la edad media de los tres grupos, sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,044$).

Con respecto al porcentaje de ovocitos maduros, por grupos: 1 (75,41 %) , 2 (81,4 %) , y 3 (83,73%). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,988$), aunque clínicamente sí destacamos que se obtenían más ovocitos maduros cuando la respuesta había sido mayor.

La tasa de fecundación por grupos fue 70,59%, 76,35% y 74,44 %. Tampoco en este caso las diferencias tuvieron significación estadística ($p = 0,699$), aunque sí había una ligera tendencia cuando la respuesta había sido intermedia. Figura 3

Comparados los grupos de dos en dos: Con respecto a la tasa de gestación las diferencias alcanzaron significación estadística entre los grupos 1 y 2 ($p = 0,005$), no entre los grupos 1 y 3 ($p = 0,06$) pero próximo a la significación estadística , y no entre los grupo 2 y 3, aunque la mayor tasa de gestación de nuevo se consiguió en el grupo 2 (7-16 ovocitos) con un 40%.

La media de embriones por grupos fue : $1,82 \pm 1,4$ (R 0-6); $5,92 \pm 2,8$ (R 0-13) y $11,39 \pm 4,5$ (R 2-20) para los grupos 1, 2 y 3 , esperable por otro lado al prove-

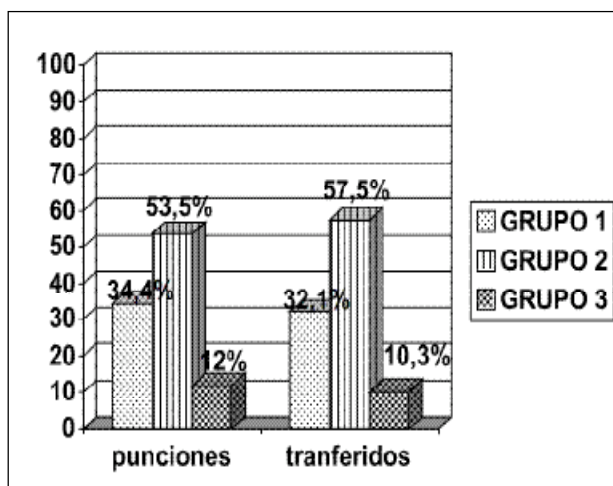


Figura 1

Representación en porcentajes, de cada uno de los grupos: 1(0-6); 2 (7-16); 2(>17), con respecto al total de ciclos puncionados y transferidos.

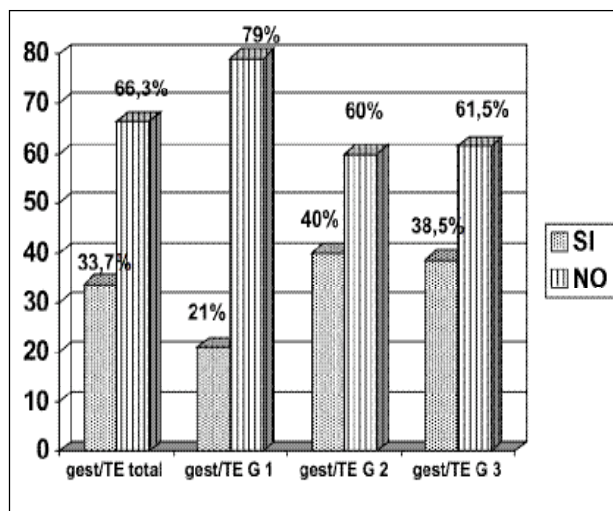


Figura 2

Tasa de gestación del total de los ciclos y por grupos según número de ovocitos. Las diferencias en los tres grupos (G 1; G 2; G 3) fueron estadísticamente significativas ($p = 0,013$)

nir de grupos diferentes de ovocitos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,0001$) tanto para los tres grupos como comparados estos de dos a dos.

Mención aparte merecen los casos en los que no hubo transferencia embrionaria (n=47). Aquí hay que hacer tres consideraciones: a): en 6 ciclos no hubo ovocitos maduros (2% del total de ciclos) y suponen el 12,76 % de los ciclos no transferidos. b): En 20 ca-

Tabla 2

Análisis descriptivo de las variables edad ajustada, porcentaje de ovocitos maduros y tasa de fecundación para cada uno de los grupos en que se dividió la muestra según número de ovocitos: grupo1 (0-6), grupo2 (7-16), grupo3 (>16)

	N	media	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza del 95% para la media (valor min y max)	Minimo	máximo
Edad ajustada							
Grupo 1	103	35,83	3.024	.298	35,24-36,42	28	42
Grupo 2	160	35,05	3.212	.254	34,55-35,55	24	43
Grupo 3	36	34,46	3.472	.579	33,29-35,64	22	41
Total	299	35,25	3,204	.185	34,89-35,61	22	43
% de maduros							
Grupo 1	98	75,41	29.476	2.978	69,50-81,32	0	100
Grupo 2	160	81,40	18.899	1.494	78,45-84,36	0	100
Grupo 3	36	83,73	11.983	1.997	79,67-87,78	59	100
Total	294	79,69	22.547	1.315	77,10-82,28	0	100
Tasa de fecundación							
Grupo 1	94	70,59	32.881	3.391	63,85-77,32	0	100
Grupo 2	159	76,35	22.694	1.800	72,79-79,90	0	100
Grupo 3	36	74,44	20.293	3.3.82	67,57-81,31	22	100
Total	289	74,24	26.240	1.544	71,20-77,27	0	100

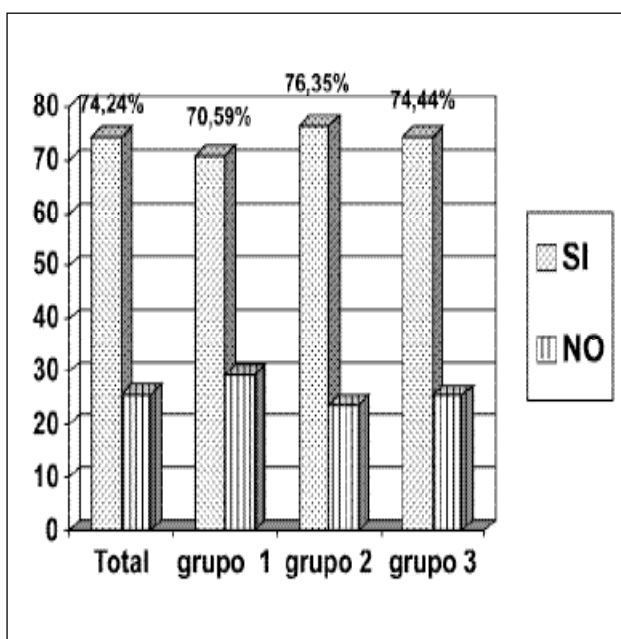


Figura 3

Tasa de fecundación del total de la muestra y por grupos de estudio. Diferencia NS

...s a pesar de haber ovocitos maduros, no hubo fecundación en 14 casos y en otros 6 el embrión no sobrevivió a las 48 h. Estos 20 casos representan el 6,6% del total de ciclos y el 42,5% de los ciclos no transferidos. En este grupo el número medio de ovocitos fue de 4,2 y el de ovocitos maduros de 2,65. En 13 de los 20 casos (65%) solo había 1 o 2 ovocitos maduros; estos 13 casos tenían una media de ovocitos recuperados de 3,26. Recordemos que la media de ovocitos recuperados en el grupo de baja respuesta fue de 3,83. Por tanto en los casos en los que la transferencia no se realizó por fallo de fecundación (no conseguir embrión teniendo ovocitos maduros), el número medio de ovocitos recuperados y de ovocitos en metafase II el día de la punción, dicho número fue inferior a la media general de la muestra, y tenían una media de ovocitos recuperados similar al grupo de baja respuesta. c): en 19 casos la transferencia embrionaria se canceló para evitar un posible síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Son el 6,3% de los ciclos y el 40,4% de las cancelaciones de la transferencia. Este grupo en el que congelamos los embriones la media de ovocitos recuperados fue de 18 y de 10,6 la media de embriones congelados. Por tan-

to también aquí encontramos que una super respuesta se relaciona con un mayor riesgo de cancelación de la transferencia embrionaria. d) en un solo caso hubo que congelar los embriones por imposibilidad técnica de

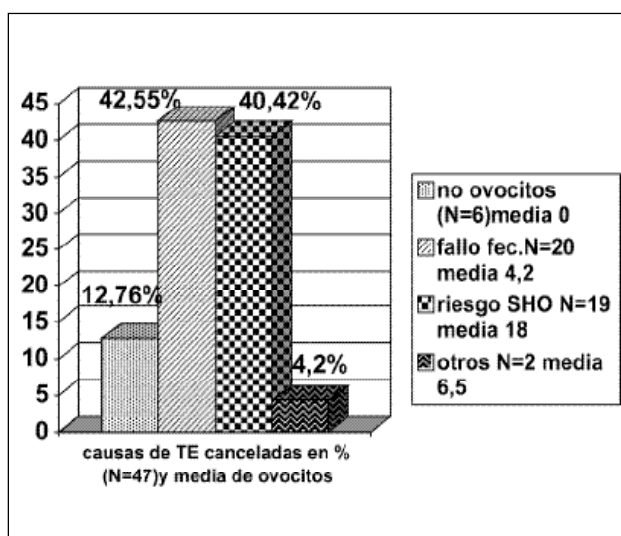


Figura 4

Transferencias embrionarias canceladas, sus causas y media de ovocitos en cada grupo de cancelación

canalizar el cérvix y en otro todos los embriones resultaron contaminados por causa masculina. (Figura 4)

CONCLUSIONES

La tasa de gestación clínica por transferencia embrionaria en total de la muestra fue de 33,7%.

Analizados por grupos la tasa de gestación fue de 21%, 40% y 38,5% para los grupos 1 (0-6 ovocitos), 2(7-16) y 3 (>16) respectivamente, diferencias que fueron estadísticamente significativas.

Encontramos significación estadística en la media de embriones de cada uno de los grupos.

Hubo diferencias significativas en la edad media de las pacientes de los tres grupos, no siendo esta diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos maduros ni la tasa de fecundación. (aunque la menor tasa de fecundación la tenía el grupo de baja respuesta).

En los casos en que no hubo transferencia por fallo de fecundación las pacientes tenían una media de ovocitos recuperados baja.

Los casos que se canceló la transferencia por riesgo de SHO la media de ovocitos recuperados fue de 18 (hiperrespuesta).

El grupo 1 (baja respuesta) fueron las pacientes de mayor edad media, con menor número de embriones para transferir y con menor tasa de fecundación y de gestación.

Nuestro rango óptimo en el que conseguimos los mejores resultados fue el grupo 2 (7-16 ovocitos) con una media de 10,5 ovocitos.

El conseguir un mayor numero medio de embriones a transferir, $11,39 \pm 4,5$ de media en la hiperrespuesta no conllevó una mejor tasa de gestación.

Dado que no encontramos un aumento en la tasa de gestación al aumentar el número de ovocitos, y sí por el contrario un mayor riesgo de cancelación con el fin de evitar el SHO, hace que consideremos que no está justificado el emplear tratamientos excesivamente agresivos en los ciclos de FIV-ICSI.

COMENTARIOS

Son numerosos los estudios que tratan de ver cual es el rango óptimo de ovocitos obtenidos para conseguir los mejores resultados en ciclos de FIV-ICSI. Así Godwin I y col. (5) estudiando 581 ciclos de FIV establece 5 grupos según el número de ovocitos (1-5) (6-10), (11-15), (16-20) y > 20 y encuentra que la tasa de fecundación es similar (nosotros tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas), pero encuentra mayor tasa de gestación y mayor calidad de embriones al aumentar el número de ovocitos. No obstante llama la atención sobre el riesgo de SHO.

En otros grupos de estudio (6) sobre 452 ciclos de ICSI y dividiendo a la muestra en 4 grupos (1-5), (6-10), (11-15), (> 15 ovocitos), observan mayor fallo de fecundación y menor tasa de gestación en el grupo de 1-5 ovocitos y dan como rango óptimo de 6-10. En nuestro estudio también se observó menor tasa de gestación en el grupo de baja respuesta y mayores cancelaciones de transferencia embrionaria por fallo de fecundación. Para Tímeva y col. (7) el rango óptimo estaría entre 5 y 15 ovocitos. Por encima de 15 no encuentra beneficios y sí riesgo de SHO. Un reciente estudio (4) sobre 7422 ciclos y tras efectuar un análisis multivariante fija en 13 el número óptimo de ovocitos. Nosotros encontramos los mejores resultados entre 7-16 ovocitos con una media de 10,5.

Por otro lado hay grupos (8) que encuentran una correlación negativa entre la tasa de fecundación por ovocito obtenido y la respuesta ovárica, y explican este efecto debido al mayor número de ovocitos inmaduros a mayor respuesta ovárica pero no encuentran que la calidad del ovocito esté disminuida en la alta res-

puesta. Tampoco Fabregues F y col. (9) encuentran que la calidad del ovocito esté comprometida en los casos con SHO con respecto a las pacientes que no desarrollaron SHO con independencia de que tuvieran o no un ovario poliquístico. Aunque el elevado nivel de estradiol de los ciclos con muy alta respuesta sí parece tener un efecto deletéreo sobre la calidad embrionaria y la receptividad endometrial (10), su efecto sobre la calidad del ovocito es aún controvertida.

A la vista de todo lo dicho hasta ahora y aunque consideramos que habrá que hacer valoraciones individuales de cada caso, pero la tendencia general debe ser el utilizar regímenes de tratamientos mas suaves que consigan un número "razonable" de ovocitos para conseguir embriones de mayor calidad, con mayor capacidad implantatoria, con menor riesgo de SHO con vistas a la tan deseada transferencia selectiva de un único embrión que nos permita obtener una buena tasa de gestación, reduciendo además el riesgo de embarazo múltiple.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Tarlatzis B C, Zeperidis L, Grimbizis G, Bontis J.:** Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Human reproduction Update* 2003, Jan-Feb; 9 (1): 61-76.
2. **Simon C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A.:** Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum estradiol concentrations in high and normal responder patients. *Human Reproduction* 1995, Sep; 10 (9): 2432-2437.
3. **Yih M C, Spandorfer S D, Rosenwaks Z.:** Egg production predicts a doubling of in vitro fertilization pregnancy rates even within defined age and ovarian reserve categories. *Fertility and Sterility*, 2005. Jan. 83 (1): 24-29.
4. **Van der Gaast M H, Eijkemans M J, Van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC, Macklon NS.:** Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reproductive Biomedicine On line*, 2006 oct; 13 (4) : 476-480.
5. **Godwin I, Meniru GI, Ian I, Craft IL.:** Utilization of retrieved oocytes as an index of the efficiency of superovulation strategies for in vitro fertilization treatment. *Human Reproduction* 1997 oct; 12 (10): 2129-2132.
6. **Nwora A, Melie B Sc, Olutope A, Adeniyi B Sc, Osaro M, Igbineweka H N D, and Richard A, Ajayi M D.:** Predictive value of the number of oocytes retrieved at ultrasound-directed follicular aspiration with regard to fertilization rates and pregnancy outcome in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles. *Fertility and sterility* 2003. Dec; 80 (6): 1376-1379.
7. **Timeva T, Milachich T, Antonova I, Arabaji T, Shterev A, Omar HA.:** Correlation between of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Scientific world journal*, 2006 jun 21; 6:686-690.
8. **Kod J D, Looman C W, Weima S M, Tevelde E R.:** A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome. *Fertil Steril*, 2006 Apr; 85 (4): 918-924.
9. **Fabregues F, Peñarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell J A, Balasch J.:** Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril*, 2004, Oct; 82 (4): 827-833.
10. **Valbuena M D, Martín J, de Pablo J L, Remohí J, Pellicer A, Simon C.:** Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil. Steril*, 2001 Nov; 76 (5): 962-968.