



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA**

Hospital Ángeles Lomas

Comparación de la tasa de embarazo para embriones desvitrificados  
transferidos en ciclo natural vs ciclos de transferencia embrionaria con  
preparación endometrial

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

DR. José Alfonso Gutiérrez Frusch

Profesor titular del curso de especialización:

Dr. Samuel Karchmer Krivitzky

Asesores de tesis:

Dr. Alberto Kably Ambe

Dra. Armando Miguel Roque Sánchez

Asesor metodológico:

MVZ Esperanza Carballo Mondragón



México, DF a 30 de Julio del 2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



---

**Dr. Samuel Karchmer Krivitzky**

**Profesor Titular del Curso de Ginecología Y Obstetricia del  
Hospital Ángeles Lomas**



---

**Dr. Carlos Quesnel**

**Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia del  
Hospital Ángeles Lomas**



---

**Dr. Manuel García Velásco**

**Jefe de Enseñanza Médica del Hospital Ángeles Lomas**



---

**Dr. Alberto Kably Ambe**

**Asesor de Tesis  
Hospital Ángeles Lomas**

## **Dedicatoria:**

### **A MIS PAPAS**

Sin su ejemplo y apoyo este camino nunca hubiera sido posible. Gracias por su amor incondicional y por guiarme con su ejemplo. Nunca podre expresar todo el agradecimiento y amor que les tengo.

## **Agradecimientos**

Difícilmente podre agradecer a todas las personas que cruzaron mi camino durante mi formación en los últimos cuatro años. Gracias a todas las personas, médicos y equipo de salud que me han mostrado su pasión por su profesión en los últimos cuatro años.

Quiero agradecer a mis maestros y profesores por el apoyo, el aprendizaje y el tiempo que dedican a sus alumnos. Es un gran esfuerzo con la única recompensa de nuestro agradecimiento como sus alumnos.

Gracias al Dr. Samuel Karchmer por darme un lugar en su programa de residencia, por la paciencia a través de los años y por todos los consejos a través de la residencia.

A mis tutores de tesis, Dr. Alberto Kably, Dr. Armando Roque y MVZ Esperanza Carballo por enseñarme lo que es tener pasión a una profesión.

Al Dr. Rodrigo Zamora, Dr. Ernesto Castelazo y Dr. Carlos Qusnel por su tiempo dentro del aula, en el quirófano y en los pasillos del hospital. Gracias por su ejemplo y su dedicación que han formado nuestra forma de ver la medicina.

A mi hermano y a mi novia por soportar todos los horarios extraños, malos humores y fin de semanas cansados. Gracias por acompañarme cada paso estos cuatro años.

A mis cuatro compañeros recientes que sin ustedes este viaje no hubiera sido lo mismo. Flor, Ubiergo y Marsella gracias por ser los mejores amigos que una persona pueda pedir.

## Tabla de contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>9</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>11</b>
<b>Pregunta de investigación</b> .....	<b>11</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>11</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>11</b>
<b>Hipótesis Nula</b> .....	<b>12</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>12</b>
<b>Objetivo secundario</b> .....	<b>12</b>
<b>Métodos</b> .....	<b>12</b>
<b>Diseño del estudio</b> .....	<b>12</b>
<b>Criterios de inclusión:</b> .....	<b>12</b>
<b>Criterios de exclusión:</b> .....	<b>13</b>
<b>Metodología:</b> .....	<b>13</b>
<b>VARIABLES:</b> .....	<b>13</b>
Tabla 1 Variables del estudio .....	<b>14</b>
<b>Análisis Estadístico:</b> .....	<b>14</b>
<b>Consideraciones Éticas</b> .....	<b>14</b>
<b>Material y método</b> .....	<b>15</b>
<b>Vitrificación</b> .....	<b>15</b>
<b>Descongelación</b> .....	<b>16</b>
<b>Designación de grupos</b> .....	<b>17</b>
Figura 1 División de grupos .....	<b>19</b>
Tabla 2 Sistema de puntaje para blastocisto de acuerdo al consenso de Estambul .....	<b>20</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>20</b>
Tabla 3 Medias de las variables .....	<b>21</b>
<b>Análisis secundario</b> .....	<b>22</b>
Tabla 4 Media de variables en embriones de buena calidad .....	<b>22</b>
Figura 2 Porcentaje de embarazo en embriones de buena calidad .....	<b>23</b>
Tabla 5 Media de variables en embriones de calidad regular .....	<b>24</b>
Figura 3 Porcentaje de embarazo en embriones de calidad regular .....	<b>25</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>25</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>28</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>29</b>

## Resumen

**Introducción:** La falla en la implantación continua siendo de las principales causas de ciclos de FIV fallidos a pesar de los avances que han existido en terapias de reproducción asistida. A raíz de intentar mejorar las tasas de implantación y evitar los efectos de la hiperestimulación ovárica controlada en el endometrio y embrión se desarrollaron técnicas de vitrificación de embriones. La búsqueda de mejorar las tasas de embarazo con embriones desvitrificados ha llevado a buscar herramientas que ofrecen los mejores resultados. De estas evidencias surge el debate sobre la posibilidad de que la terapia hormonal para preparación endometrial mejore las tasas de embarazo cuando se compara con transferencias en ciclo natural.

**Objetivo:** Comparar la tasa de implantación embrionaria en ciclos de transferencia de embriones vitrificados entre ciclos naturales y aquellos con preparación endometrial.

**Objetivo secundario:** Comparar la tasa de implantación embrionaria en ciclos de transferencia de embriones vitrificados durante un ciclo natural y aquella con preparación endometrial en función de la calidad embrionaria al momento de congelación.

**Material y método:** Se trata de un estudio comparativo, observacional, y retrospectivo. Se hizo revisión de 951 expedientes clínicos de fertilización in-vitro en el archivo clínico del Centro de Fertilidad del Centro Especializado para la Atención de la Mujer durante el periodo de Enero 2010 a Enero del 2014. Se identificaron y analizaron 75 ciclos que contaban con los criterios de inclusión.

Se dividieron los casos en dos grupos: Grupo de ciclo natural donde se transfirieron los embriones en un ciclo sin administración de terapia hormonal. Grupo de preparación endometrial donde se transfirieron los embriones en un ciclo con preparación endometrial con agonista de GnRH y valerato de estradiol. En ambos grupos el número de embriones transferidos fue de dos, si se contaba con dos embriones o más, y de un embrión en los demás casos.

En cada grupo se analizaron las variables de edad, índice de masa corporal, FSH, LH y estradiol al inicio del ciclo, progesterona el día del inicio de soporte lúteo, LH, y estradiol el día de transferencia, sobrevivencia embrionaria al descongelar, el número de embriones transferidos, la calidad embrionaria y la tasa de embarazo.

Posterior al análisis principal se dividieron nuevamente los grupos de acuerdo a la calidad embrionaria formando un cohorte con embriones de buena calidad y una con embriones de calidad regular. Ambos grupos compararon los resultados de transferencia de embriones en ciclos naturales vs preparación endometrial.

**Resultados:** Los dos grupos no muestran diferencia en porcentaje de sobrevivencia embrionaria o número de embriones transferidos. Se observa una diferencia significativa en la calidad embrionaria, siendo mayor en los embriones de ciclo preparado. No se observa diferencia estadística significativa en la tasa de embarazo entre los grupos de ciclo natural y de preparación endometrial.

En pacientes con embriones de buena calidad no se observó diferencia significativa en la tasa de embarazo entre el grupo con transferencia en ciclo natural vs preparación endometrial.

En el grupo con embriones de calidad regular se observó una diferencia significativa en las tasas de embarazo en transferencia en ciclo natural (15%) versus ciclos con preparación endometrial (33.3%) con una p significativa de 0.02.

**Conclusiones:** Cuando la calidad embrionaria es regular, la tasa de embarazo es mayor cuando se realiza transferencia en un ciclo con preparación endometrial.

**Palabras clave:** Transferencia de embriones descongelados, Preparación Endometrial, Congelar Todo, Falla en la Implantación

## Abstract

**Introduction:** In spite of important advances in reproductive technologies over the past three decades implantation failure continues to be one of the main causes of unsuccessful In-vitro Fertilization (IVF) cycles. With the objective of improving implantation rates and avoiding the effects of controlled ovarian stimulation of the endometrium and embryo, cryopreservation technics where developed. In order to improve pregnancy rates it is important to study different protocols for thawed cycles that may improve pregnancy outcome. One of the main areas of controversy is whether endometrial preparation for thawed embryo transfer improves the pregnancy rate.

**Objective:** Compare implantation rate of thawed embryo transfer between natural cycle and endometrial preparation.

**Secondary Objective:** Compare implantation rate of thawed embryo transfer between natural cycle and endometrial preparation in accordance to the embryo quality at vitrification.

**Material and methods:** This is a comparative, retrospective, observational study. 951 medical files where reviewed in the archive of the Fertility Center of Centro Especializado para la Atención de la Mujer in México City from January 2010 to January 2014. 75 files met with the inclusion criteria.

The cycle where divided into two groups. The first group, thawed embryos where transferred during a natural cycle without any hormonal therapy. The second group, thawed embryos where transferred to a prepared endometrium with GnRH agonist and exogenous estrogen. Two embryos where transferred if the patient had two or more viable thawed embryos and one in all other cases.

Variables analyzed in both groups where, age, body mass index, FSH, LH, and estrogen at the beginning of the cycle, progesterone on the day of initiating luteal support, LH and estradiol the day of embryo transfer, post-thaw embryo

survival rate, number of embryos transferred, embryo quality and pregnancy rate.

Groups were then divided according to the embryo quality forming a good quality cohort and a regular quality cohort. In both groups transfers during a natural cycle were compared with embryo transfer to a prepared endometrium.

**Results:** There was no difference observed in embryo survival or number of embryos transferred between both groups. Embryo quality was statistically better in the group with prepared endometrium. There was no statistical significant difference in pregnancy rate between the two groups.

In cycles with good quality embryos there was no statistical difference in pregnancy rate when embryos were transferred during a natural cycle versus those transferred to a prepared endometrium.

In cycles with regular quality embryos there was a statistical significant difference in pregnancy rate. Pregnancy rate for thawed-embryo transfer during a natural cycle was 15% and 33.3% when the transfer was to a prepared endometrium ( $p=0.02$ ).

**Conclusion:** Endometrial preparation increases the pregnancy rate when regular quality thawed-embryos are transferred.

**Key words:** Thawed embryo transfer, Endometrial Preparation, Freeze All, Implantation Failure

## Marco Teórico

En los últimos 30 años ha existido un gran avance en las terapias de reproducción asistida, sin embargo, la falla en implantación embrionaria es la principal causa de ciclos de fertilización in vitro (FIV) sin éxito.<sup>1</sup> En el 2013, en Estados Unidos de América, 30% de todos los ciclos de FIV correspondieron a transferencia de embriones descongelados.<sup>1</sup> Esta herramienta de reproducción permite disponer de embriones que no se utilizaron en ciclos previos así como controlar el número de embriones a transferir disminuyendo la incidencia de embarazo múltiple así como el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Adicionalmente, se ha observado que el transferir embriones en un ciclo posterior en el que se presenten niveles hormonales fisiológicos podría mejorar la tasa de implantación.<sup>2</sup> De aquí el debate sobre si la posibilidad de embarazo mejora realizando una preparación endometrial cuando se compara con transferencia en ciclo natural.

En ciclos en fresco, la tasa de implantación es de 4-39%<sup>1</sup> y es probable que influyan de manera importante factores como los niveles suprafisiológicos de estrógenos durante la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) y su efecto sobre el endometrio, ovocitos y embrión.<sup>1,3,4,5,6</sup> La HOC tiene como objetivo la captura de un número suficiente de ovocitos para mejorar el porcentaje de éxito por ciclo. Se considera que por debajo de 10 ovocitos capturados en protocolos de estimulación convencional existe una menor tasa de embarazo, pero también se observa una disminución en la tasa de nacidos vivos cuando se capturan más de 20 ovocitos.<sup>7,8,9</sup>

Se propone que la disminución en la tasa de embarazo en ciclos estimulados se puede asociar a los niveles séricos elevados de estrógenos llevando a una alteración en la receptividad endometrial, ya que la calidad y maduración del endometrio está controlada por las acciones de la progesterona y estrógenos.<sup>3</sup> La elevación de los niveles de estrógeno también eleva los niveles de progesterona causando una asincronía temporal embrión-endometrio, cerrando la ventana de implantación, y por lo tanto disminuyendo la tasa de éxito.<sup>3,4</sup> En ciclos de ovo-donación no se observa una relación entre los niveles

hormonales de la donadora y las tasas de embarazo, lo cual sugiere que el efecto hormonal ocurre a nivel endometrial y no sobre el ovocito.<sup>10</sup> Por lo tanto, la transferencia de embriones en un ciclo posterior sin el efecto hormonal de la HOC podría conferir una mejoría en las tasas de embarazo. Esta modalidad se conoce como “Congelar todo”.<sup>12</sup>

Para la transferencia de embriones vitrificados se utilizan diferentes esquemas de tratamiento con gonadotropinas, análogos de GnRH, antagonistas de GnRH, estrógenos y progesterona .

Los métodos para criopreservación de embriones comprenden la congelación lenta y la vitrificación. La técnica se basa en evitar la formación de cristales intracelulares que son capaces de dañar la célula por medio del uso de soluciones crio protectoras.<sup>13</sup> La congelación lenta consiste en disminuir la temperatura celular y de su microambiente en una serie de pasos controlados mientras se impregna con soluciones crio protectoras a bajas concentraciones. La vitrificación utiliza soluciones crio protectoras a altas concentraciones con secuencias rápidas de enfriamiento para solidificar el líquido alrededor de la célula.<sup>14</sup>

Los avances y nuevas técnicas en criopreservación permiten mejores índices de sobrevivencia con mejores tasas de embarazo que con técnicas anteriores como la congelación lenta.<sup>13,14,15,16</sup> La vitrificación en etapa de blastocisto ha mostrado un aumento del 50% de embarazos clínicos y hasta un 40% de nacidos vivos en comparación con transferencia de embriones en día tres.<sup>17,18</sup> Debido a las mejores tasa de sobrevida, mejores tasas de embarazo, simplicidad de la técnica, menor tiempo de procedimiento y menor costo, la vitrificación es el estándar en técnicas de congelación.<sup>13,15,16</sup>

La búsqueda de mejores tasas de implantación han llevado a estudiar los efectos de preparación endometrial para la transferencia de embriones descongelados. Aunque aún no existe evidencia clara de mejoría en las tasas de embarazo entre un ciclo natural y aquellos con preparación endometrial, existen ventajas logísticas sobre la utilización de Terapia hormonal (TH).<sup>19</sup>

El éxito de transferencia de embriones vitrificados está asociado a una sincronización precisa entre el embrión y el endometrio a través de un proceso interactivo llamado “ventana implantacional”.<sup>20</sup> La terapia hormonal permite la planeación de la transferencia.<sup>20</sup> Además, esta estrategia se asocia a un menor número de ciclos cancelados especialmente en mujeres con ciclos menstruales irregulares.<sup>20</sup> Sin embargo, los ciclos naturales ofrecen la ventaja de evitar la exposición a hormonas exógenas aunque requiere de un seguimiento más estricto para detectar el momento de elevación de la LH y la ovulación.<sup>20</sup> Dicha elevación además de iniciar el proceso de maduración ovocitaria y ovulación inicia el proceso de cambios endometriales para sincronizar la implantación a través de la progesterona.<sup>20</sup> Sin embargo, algunos investigadores refieren una asociación negativa entre los niveles elevados de progesterona el día de transferencia embrionaria y la tasa de embarazo en ciclos de embriones descongelados por lo tanto, es posible que los niveles elevados de progesterona afecten la ventana de implantación y la sincronía entre el endometrio y el embrión transferido.<sup>21</sup>

## **Planteamiento del problema.**

### **Pregunta de investigación**

¿La preparación endometrial con terapia hormonal mejora las tasa de embarazo en embriones desvitrificados en mujeres mexicanas?

### **Justificación**

A medida que la transferencia de embriones desvitrificados comprende un mayor número de los procedimientos de TRA es importante conocer las técnicas que ofrecen mejores tasas de embarazo en mujeres mexicanas.

### **Hipótesis**

La tasa de implantación de embriones descongelados es la misma entre ciclos naturales y aquellos con preparación endometrial con terapia hormonal.

## **Hipótesis Nula**

La tasa de implantación de embriones descongelados mejora cuando se administra preparación endometrial mediante terapia hormonal.

## **Objetivos**

Comparar la tasa de implantación embrionaria en ciclos de transferencia de embriones vitrificados entre ciclos naturales y aquellos con preparación endometrial.

## **Objetivo secundario**

Comparar la tasa de implantación embrionaria en ciclos de transferencia de embriones vitrificados durante un ciclo natural y aquella con preparación endometrial en función de la calidad embrionaria al momento de congelación.

## **Métodos.**

### **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio comparativo, observacional, y retrospectivo.

### **Criterios de inclusión:**

- Embriones descongelados transferidos de Enero 2010 a Enero 2014.
- Embriones que fueran congelados con técnica de vitrificación.
- Embriones vitrificados quinto día post-captura.
- Expediente con evaluación de calidad embrionaria previo a la vitrificación.
- Contar con resultado de prueba de embarazo dos semanas post-transferencia.
- Contar con ultrasonido transvaginal cuatro semanas post-transferencia.
- Expedientes completos.

**Criterios de exclusión:**

- Expedientes incompletos.
- Pacientes que no contaran con resultado de embarazo.
- Casos donde no se utilizó vitrificación como método de criopreservación.
- Embriones que no fueron vitrificados en etapa de blastocisto.

**Metodología:**

Se hizo revisión de 951 expedientes clínicos de fertilización in-vitro en el archivo clínico del Centro de Fertilidad del Centro Especializado para la Atención de la Mujer durante el periodo de Enero 2010 a Enero del 2014.

Se identificaron 92 pacientes con transferencia de embriones desvitrificados en etapa de blastocisto. Sin embargo 17 pacientes no contaban con datos completos sobre niveles hormonales, seguimiento post transferencia, o resultados de prueba de embarazo. Por lo tanto el tamaño de muestra fue de 75 casos, de los cuales se registraron las siguientes variables.

**Variables:**

Independiente:

- Edad
- Índice de masa corporal
- Hormona Folículo Estimulante el día del inicio del ciclo
- Hormona Luteinizante el día del inicio del ciclo
- Estradiol el día del inicio del ciclo
- Porcentaje de sobrevivencia de embriones desvitrificados
- Número de embriones transferidos
- Preparación endometrial vs ciclo natural

Dependiente:

- Hormona Luteinizante el día de inicio del soporte luteo
- Estradiol el día de inicio del soporte luteo
- Progesterona el día de inicio del soporte lúteo
- Tasa de embarazo

**Tabla 1 Variables del estudio**

No	Variable	Tipo de Variable	Unidad de Medición
1	Edad	Continua	Años
2	Índice de Masa Corporal	Continua	Número
3	Hormona Foliculo Estimulante el día de inicio del ciclo	Continua	mIU/ml
4	Hormona Luteinizante el día de inicio del ciclo	Continua	mIU/ml
5	Estradiol el día de inicio del ciclo	Continua	pg/ml
6	Hormona Luteinizante el día de inicio del soporte lúteo	Continua	mIU/ml
7	Estradiol el día de inicio del soporte lúteo	Continua	pg/ml
8	Progesterona el día de inicio del soporte lúteo	Continua	ng/ml
9	Porcentaje de Supervivencia de embriones desvitrificados	Continua	Porcentaje
10	Número de embriones transferidos	Discontinua	Número
11	Tasa de embarazo	Continua	Porcentaje

**Análisis Estadístico:**

Las variables continuas se designaron como medias y desviaciones estándar, y se realizó regresión logística univariada para determinar la significación estadística. Las variables categóricas se evaluaron en frecuencias y porcentajes. Los cálculos se realizaron con el programa de cómputo JMP statistical software®.

**Consideraciones Éticas**

Este trabajo respeta a los aspectos éticos que garantizan la privacidad, dignidad y bienestar del sujeto a investigación debido a que no lleva riesgo alguno para la paciente de acuerdo al artículo 17 de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Se cataloga como una investigación sin riesgo (Categoría 1), por ser una investigación que solo maneja documentos con un enfoque retrospectivo y no realiza ninguna intervención.

Los procedimientos de la presente investigación cumplen con las normas éticas y morales en materia de investigación y salud mencionadas en la declaración de Helsinki de 1875 enmendadas en 1989 y con los códigos y normas internacionales vigentes de las buenas prácticas de la investigación.

## Material y método

Los embriones fueron criopreservados en etapa de blastocisto utilizando criopreservador de Cryotech® bajo la guías recomendadas por el fabricante.



Imagen 1 Kit de vitrificación



Imagen 2 Kit de descongelación

### Vitrificación

Contenido de Kit (Ver imagen 1)

- Step 1 Equilibration Solution (ES): 1 vial de 1.5 ml.
- Step 2 Vitrification Solution (VS): 2 viales de 1.5 ml.
- 4 Paletas
- 2 Placas con 6 wells c/u.

### Instrucciones de uso

#### Preparación

- Todo el proceso se realiza a temperatura de laboratorio (22-27°C)
- Llene un contenedor con Nitrógeno líquido.
- Compare el espesor de la zona pellucida con el ancho del espacio pevitelino y tome nota.
- Use una pipeta Pasteur con un diámetro adecuado embriones 180  $\mu\text{m}$

### **Equilibramiento de embriones**

1. Coloque 300 µl de ES en el 1° well y 300 µl de VS en el 2° y 3° well de la placa.
2. Transfiera el embrión de la placa de cultivo al fondo del 1° well con ES.
3. El embrión comenzará a contraerse y gradualmente volverá a su tamaño original (entre 12 y 15 minutos).

### **Vitrificación**

Los siguientes pasos del 4 al 8 deben ser completados en un tiempo NO menor a 60" (segundos) y hasta 90":

4. Con la pipeta Pasteur transfiera el embrión del 1° well a la superficie del 2° well con VS con el mínimo volumen de ES posible.
5. Limpie la pipeta y cámbielo de posición 3 veces dentro del 2° well con VS.
6. Transfíralo al 3° well con VS, cambiándolo de posición 2 veces.
7. Coloque el embrión cerca de la punta de la lámina de la paleta, quite el medio VS excedente para lograr una gota plana del menor volumen posible.
8. Sumerja inmediatamente la paleta en N2 líquido.
9. Coloque la tapa de la paleta y almacénela en un tanque de N2 líquido.

### **Descongelación**

Contenido del Kit (Ver imagen 2)

- Thawing Solution (TS): 1 vial de 4 ml.
- Diluent Solution (DS): 1 vial de 1.0 ml.
- Washing Solution (WS): 1 vial de 1.5 ml.
- Una placa con 6 wells.

### **Preparación:**

- Caliente en estufa (37°C) todo el medio TS en una placa de Petri de 35 mm.
- Coloque 300 µl de DS, WS1 y WS2 en la placa well 1, 2 y 3 respectivamente.

El procedimiento en estos medios se realizará a temperatura de laboratorio (22-27°C).

## **Instrucciones**

1. Rápidamente (1 segundo) sumerja la lámina de la paleta en TS a 37°C y espere 1 minuto.
2. Transfiera el oocito/embrión suavemente al fondo del 1º well con DS y espere 3 min.
3. Luego transfíralo al fondo del 2º well con WS1 y espere 5 min.
4. Transfíralo al 3º well con WS2. Cámbielo dentro del well a 2 posiciones para completar su lavado.
5. Llévelo al medio de cultivo apropiado para completar su recuperación.

**Nota:** 3 horas de recuperación para embriones.

## **Designación de grupos**

Para su análisis, los casos fueron divididos en dos grupos: Grupo Ciclo Natural incluyó a 33 pacientes. Se evaluaron los ciclos de embriones descongelados transferidos en un ciclo natural. El grupo 1 no recibió terapia hormonal para preparación endometrial. Se evaluó a la paciente entre el primer y tercer día del ciclo con revisión clínica, ultrasonido transvaginal, FSH, LH y estradiol sérico. Se descartaba presencia de quiste de ovario, hidrosalpinx, u otra alteración que podría intervenir con la tasa de embarazo.

Se evaluaron a las pacientes de forma seriada los días 5, 7, 9, 12 y 14 del ciclo menstrual por medio de ultrasonido transvaginal y medición sérica de estrógenos, progesterona, LH, grosor endometrial, y crecimiento folicular. Se corrobora la ovulación por medio de elevación de LH y ruptura folicular. En pacientes con un grosor endometrial de por lo menos 7mm y evidencia de ovulación se inicia el día de ovulación soporte de fase lútea con progesterona I.M. 100 mg cada 24 horas y 200 mg vía vaginal por la noche y se programó la transferencia embrionaria 5 días después.

El proceso de descongelación se realizó de acuerdo a las guías del fabricante a través del proceso mencionado previamente. La transferencia embrionaria se realizó el mismo día de la desvitrificación con catéter Cook Soft Pass Echo

tip© bajo guía ultrasonográfica abdominal. Se carga embrión en el catéter de transferencia con 300 µg de medio de cultivo y se deposita de 15 mm del fondo uterino evitando tocar el mismo. Se revisa punta de catéter bajo el microscopio para verificar que no haya retención del embrión.

El grupo de preparación endometrial incluyó 40 pacientes. Se evaluaron los ciclos de embriones descongelados transferidos en un ciclo con preparación endometrial. Las pacientes iniciaron con anticonceptivos orales (etinilestradiol/levonorgestrel 0.25 mg/0.15 mg) a partir del primer día del ciclo menstrual previo a la transferencia. A partir del día 21 del ciclo previo a la transferencia se iniciaron agonistas de GnRH (leuprolide 0.5 mg) cada 24 horas.

Se evaluó a la paciente entre el primer y tercer día del ciclo con revisión clínica, ultrasonido transvaginal, FSH, LH y estradiol sérico. Se descartaba presencia de quiste de ovario, hidrosalpinx, u otra alteración que podría intervenir con la tasa de embarazo. Se administra por vía oral valerato de estradiol 8 mg del día 3 al 7 del ciclo de transferencia, posteriormente incrementándose la dosis a 12 mg diariamente. Se evaluaron a las pacientes de forma seriada los días 5, 7, 9, 14 del ciclo por medio de ultrasonido transvaginal, medición sérica de estrógenos, progesterona, LH y grosor endometrial. Al encontrar un grosor endometrial de entre 7-15 mm se inició soporte de fase lútea con progesterona I.M. 100 mg cada 24 horas y 200 mg vía vaginal por la noche y se programó la transferencia embrionaria 5 días después.

El proceso de desvitrificación y transferencia embrionaria se realizó de la misma forma que para el grupo de ciclo natural.

En ambos grupos el número de embriones transferidos fue de dos, si se contaba con dos o más embriones, y de un embrión en los demás casos. En cada grupo se analizaron las variables de edad, índice de masa corporal, FSH, LH y estradiol al inicio del ciclo, progesterona, LH y estradiol el día del inicio de soporte lúteo, sobrevivencia embrionaria al descongelar, el número de embriones transferidos, la calidad embrionaria y la tasa de embarazo. El

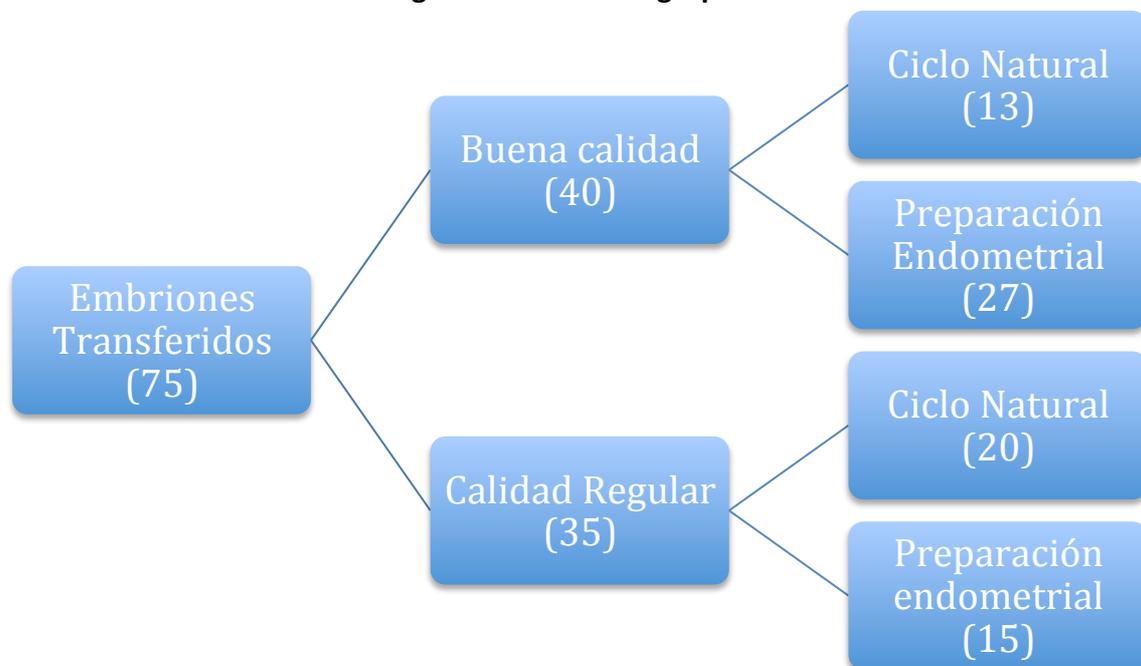
diagnóstico de embarazo químico se realizó por medio de la determinación sérica de hCG fracción beta, 14 días después de la transferencia embrionaria. El diagnóstico de embarazo clínico se realizó por medio de ultrasonido transvaginal dos semanas después.

Posteriormente se dividió nuevamente a los ciclos en dos cohortes de acuerdo a la calidad embrionaria: (Figura 1)

Primero se analizaron los ciclos con embriones de buena calidad, el primer grupo con 13 ciclos se transfirieron embriones desvitrificados en un ciclo natural, en el segundo grupo con 27 ciclos se transfirieron en un ciclo con preparación endometrial.

Se analizaron los ciclos con embriones de calidad regular, el primer grupo con 20 pacientes se transfirieron embriones desvitrificados en un ciclo natural, en el segundo grupo con 15 pacientes se transfirieron en un ciclo con preparación endometrial.

**Figura 1 División de grupos**



La calidad embrionaria se calculó utilizando los criterios del consenso de Estambul para calidad de blastocitos.<sup>22</sup> (Ver tabla 2) Es protocolo de esta clínica únicamente vitrificar embriones de calidad buena o regular y no se transfieren ni vitrifican embriones de mala calidad. Para fines estadísticos, se les asignó un puntaje ordinal a la calidad embrionaria siendo 1 de buena calidad y 2 de calidad regular.

**Tabla 2 Sistema de puntaje para blastocisto de acuerdo al consenso de Estambul**

	<b>Calificación</b>	<b>Calidad</b>	<b>Descripción</b>
<b>Estadio de desarrollo</b>	1		Temprano
	2		Blastocisto
	3		Expandido
	4		Hatched/ hatching
<b>Masa Celular Interna</b>	1	Buena	Prominente, compactado, fácilmente identificable, muchas células adheridas
	2	Regular	Fácilmente identificable, con muchas células con agrupación laxa
	3	Mala	Difícil de identificar con pocas células
<b>Trofoectodermo</b>	1	Buena	Muchas células con un epitelio cohesivo
	2	Regular	Pocas células con un epitelio laxo
	3	Mala	Muy pocas células

## Resultados

Se analizaron 33 ciclos con transferencia de embriones desvitrificados en un ciclo natural y 42 en un ciclo con preparación endometrial. No se observa diferencia significativa en edad, índice de masa corporal, LH al inicio del ciclo y estradiol al inicio del ciclo. (Ver tabla 3)

**Tabla 3 Medias de las variables**

	<b>Ciclo Natural</b>	<b>Preparación Endometrial</b>	<b>p</b>
<b>n</b>	33	42	
<b>Edad</b>	35.67+ 4.56	37.69 + 6.54	0.135
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.56 + 2.54	25.35 + 3.62	0.056
<b>FSH b (mIU/ml)</b>	6.28	11.12	0.045
<b>LH b (mIU/ml)</b>	5.80	7.51	0.375
<b>Estradiol b (pg/ml)</b>	45.22	51.64	0.488
<b>LH d (mIU/ml)</b>	13.06	4.19	0.003
<b>Progesterona d (ng/ml)</b>	6.00	0.94	0.000
<b>Estradiol d (pg/ml)</b>	271.56	758.07	0.000
<b>Sobrevivencia Embrionaria (%)</b>	94.7	96.03	0.66
<b>Número de embriones transferidos</b>	1.55	2.02	0.58
<b>Calidad embrionaria</b>	1.45	1.20	0.45
<b>Tasa de embarazo (%)</b>	27.27	42.86	0.08

\* **b = inicio del ciclo, d = día de inicio de soporte lúteo**

Se observa una FSH al inicio del ciclo de 6.28 mIU/ml en el grupo de ciclo natural versus 11.12 mIU/ml en el ciclo de preparación endometrial con una diferencia 4.84 mIU/ml con una p significativa de 0.045.

La LH el día de inicio de soporte lúteo es de 13.06 mIU/ml en ciclo natural y 4.19 mIU/ml en ciclo con preparación endometrial representando una diferencia de 8.87 mIU/ml con una p significativa de 0.003

La progesterona el día del inicio del soporte lúteo fue mayor en el ciclo natural que en el grupo de preparación endometrial con niveles de 6 ng/ml y 0.94 ng/ml respectivamente con una p de 0.000.

El estradiol el día de inicio del soporte lúteo fue mayor en el grupo de preparación endometrial que en el grupo de ciclo natural con niveles de 271.56 pg/ml y 758.07 pg/ml respectivamente con una p de 0.000

No se observa diferencia estadísticamente significativa en porcentaje de sobrevivencia embrionaria o número de embriones transferidos.

Se observa una diferencia significativa en la calidad embrionaria, siendo mayor en los embriones del grupo con endometrio preparado. En ciclo natural se observa una calidad embrionaria de 1.45 y en preparación endometrial de 1.20 con una p significativa de 0.01.

Las pacientes en el grupo de ciclo preparado obtuvieron una mejor tasa de embarazo 27.3% vs 42.9%. Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa (p0.08).

### Análisis secundario

Se analizaron los resultados de acuerdo a la calidad embrionaria antes de la vitrificación. Se obtuvieron todas las transferencias con embriones de buena calidad y se analizaron 13 ciclos con transferencia de embriones en un ciclo natural y 27 en un ciclo con preparación endometrial. No se observaron diferencia estadística en edad, índice de masa corporal, LH al inicio del ciclo, estradiol al inicio del ciclo, porcentaje de embriones que sobrevivieron, número de embriones transferidos ni en la calidad embrionaria. (Ver tabla 4)

**Tabla 4 Media de variables en embriones de buena calidad**

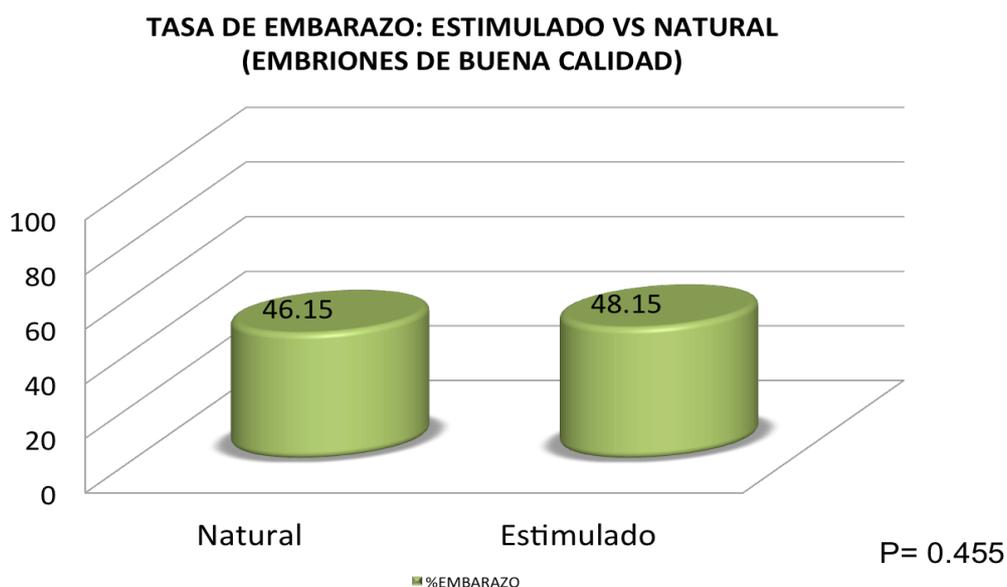
	<b>Ciclo Natural</b>	<b>Preparación Endometrial</b>	<b>p</b>
<b>n</b>	13	27	
<b>Edad</b>	34.62	37.52	0.052
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.07	25.02	0.193
<b>FSH b (mIU/ml)</b>	6	10.52	0.03
<b>LH b (mIU/ml)</b>	4.56	8.52	0.06
<b>Estradiol b (pg/ml)</b>	47.18	61.4	0.122
<b>LH d (mIU/ml)</b>	20.22	4.28	0.012
<b>Progesterona d (ng/ml)</b>	5.52	0.97	0.003
<b>Estradiol d (pg/ml)</b>	336.75	744.52	0.002
<b>Sobrevivencia Embrionaria (%)</b>	98.08	95.68	0.22
<b>Número de embriones transferidos</b>	1.69	1.96	0.14
<b>Calidad embrionaria</b>	1.00	1.01	0.08
<b>Tasa de embarazo (%)</b>	46.15	48.15	0.46

\* **b = inicio del ciclo, d = día de inicio de soporte lúteo**

Se observa una diferencia en la FSH el inicio del ciclo mayor en el grupo de preparación endometrial que en el grupo de ciclo natural siendo de 10.52 mIU/ml y 6 mIU/ml respectivamente con una p de 0.03.

La LH y progesterona el día de inicio de soporte lúteo es mayor en el grupo con transferencia en ciclo natural en comparación con transferencia en ciclos con preparación endometrial . Se observa una LH media de 20.22 mIU/ml en ciclos naturales y de 4.28 mIU/ml en ciclos con preparación endometrial con una p de 0.012. La progesterona media en ciclos naturales fue de 5.52 ng/ml y de 0.97 ng en ciclos con preparación endometrial con una p de 0.003.

La tasa de embarazo en transferencia de embriones de buena calidad durante un ciclo natural fue de 46.15% y de 48.15% en transferencia en ciclos con preparación endometrial con una p de 0.46. (Ver figura 2)



**Figura 2 Porcentaje de embarazo en embriones de buena calidad**

Se obtuvieron todas las transferencias con embriones de calidad regular y se analizaron 20 ciclos con transferencia de embriones en un ciclo natural y 15 en un ciclo con preparación endometrial. No se observaron diferencia estadística en edad, índice de masa corporal, FSH al inicio del ciclo, LH al inicio del ciclo, estradiol al inicio del ciclo, número de embriones transferidos ni en la calidad embrionaria. (Ver tabla 5)

**Tabla 5 Media de variables en embriones de calidad regular**

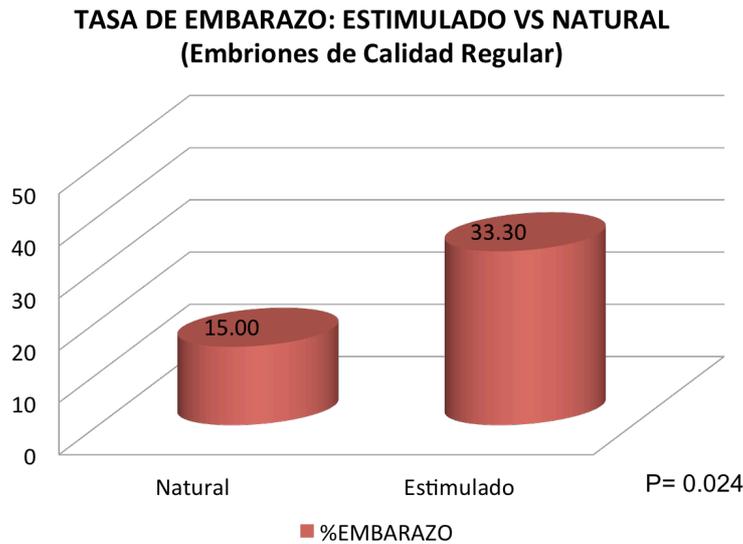
	<b>Ciclo Natural</b>	<b>Preparación Endometrial</b>	<b>p</b>
<b>n</b>	20	15	
<b>Edad</b>	36.35	38	0.396
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.18	25.97	0.190
<b>FSH b (mIU/ml)</b>	6.54	12.27	0.262
<b>LH b (mIU/ml)</b>	6.71	5.66	0.14
<b>Estradiol b (pg/ml)</b>	43.65	33.73	0.073
<b>LH d (mIU/ml)</b>	7.59	4.02	0.000
<b>Progesterona l (ng/ml)</b>	5.52	0.97	0.000
<b>Estradiol d (pg/ml)</b>	221.71	784.21	0.191
<b>Sobrevivencia Embrionaria (%)</b>	92.50	96.67	0.001
<b>Número de embriones transferidos</b>	1.45	2.13	0.35
<b>Calidad embrionaria</b>	1.74	1.54	0.08
<b>Tasa de embarazo (%)</b>	15.00	33.30	0.02

\* **b = inicio del ciclo, d = día de inicio de soporte lúteo**

Observamos una sobrevida de embriones de 92.5% en ciclos naturales la cual es significativamente menor que la sobrevida de 96.67 % en embriones del grupo con preparación endometrial con una p (0.001).

La LH y progesterona el día de inicio de soporte lúteo es mayor en el grupo con transferencia en ciclo natural en comparación con transferencia en ciclos con preparación endometrial . Se observa una LH media de 7.59 mIU/ml en ciclos naturales y de 4.02 mIU/ml en ciclos con preparación endometrial con una p de 0.000. La progesterona media en ciclos naturales fue de 5.52 ng/ml y de 0.97 ng/ml en ciclos con preparación endometrial con una p de 0.000.

La tasa de embarazo en transferencia de embriones de calidad regular durante un ciclo natural fue de 15% y de 33.3% en transferencia en ciclos con preparación endometrial con una p de 0.02. (Ver figura 3)



**Figura 3 Porcentaje de embarazo en embriones de calidad regular**

## Discusión

La falla en la implantación continúa siendo uno de los principales obstáculos en reproducción asistida. A pesar de múltiples esfuerzos para estudiar la receptividad endometrial, existen pocas herramientas para estudiar y evaluar el efecto de la misma.<sup>3,4</sup> Los niveles supra fisiológicos de estrógenos en la HOC pueden ser una de las principales causas de deterioro en la receptividad endometrial.<sup>4,5,6,9,23</sup> A raíz de estas teorías existen estudios donde se demuestra que la vitrificación de toda la cohorte de embriones para su transferencia en un ciclo no estimulado podría mejorar las tasas de implantación.<sup>12</sup>

Actualmente la transferencia de embriones vitrificados es una realidad y mientras cambian los paradigmas en fertilización es probable que en un futuro el número aumente. Por lo tanto, es importante analizar si la preparación endometrial muestra beneficio en la transferencia de embriones descongelados.<sup>19</sup>

A pesar de resultados prometedores por algunos grupos, un meta-análisis no observó diferencia significativa en tasas de embarazo en transferencia de embriones descongelados durante un ciclo natural y un ciclo con preparación

endometrial.<sup>24</sup> El presente estudio es congruente con este meta-análisis. Sin embargo el meta-análisis no analiza los resultados en función de la calidad embrionaria, lo cual podría ser un tema a discutir como se puede observar en los resultados postulados.

El estudio de inicio sugiere que no existe una diferencia significativa en la tasa de embarazo entre transferencia de embriones desvitrificados en ciclos con preparación endometrial versus transferencia en ciclo natural. Se observa una diferencia significativa en la FSH basal entre los dos grupos, lo cual podría ser por un sesgo en la selección de pacientes. Es decir, el médico se podría inclinar más hacia preparación endometrial en pacientes con niveles mayores de FSH. La FSH elevada nos podría hablar sobre una disminución en la reserva ovárica y el la calidad de los ovocitos sin embargo no se observo un efecto significativo sobre las tasa de embarazo.

Como era esperado se observa un promedio de LH y progesterona el día del inicio de soporte lúteo mayor en el grupo de transferencia en ciclo natural que en el de preparación endometrial. La elevación de LH y progesterona representa la ovulación en el ciclo natural la cual se encuentra suprimida en ciclos con preparación endometrial por el efecto del agonista de GnRH. Al mismo tiempo la administración exógena de valerato de estradiol eleva los niveles séricos de estradiol en los ciclos con preparación endometrial versus los niveles fisiológicos en ciclos naturales.

Aunque se observa una diferencia en la tasa de embarazo entre los dos grupos no alcanza una diferencia estadística. La tasa de embarazo más alta en ciclos con preparación endometrial podría ser explicada por la mejor calidad embrionaria en este grupo. También en ciclos con preparación endometrial se transfirieron un mayor número de embriones aunque tampoco alcanzo una diferencia significativa. Por lo tanto al igual que el meta-análisis este estudio muestra sin selección de calidad embrionaria no se observa una ventaja en la preparación endometrial al transferir embriones desvitrificados.

Dentro de los factores de éxito más determinantes en transferencia con embriones vitrificados se encuentra la calidad embrionaria.<sup>25,26,27</sup> Criterios para embriones de alta calidad incluyen: buena morfología al congelar, ausencia de daño al descongelar y reanudación de clivaje después de cultivo por una noche.<sup>22,25,26,27</sup> Se dividieron los grupos en función de la calidad embrionaria.

En el grupo de pacientes con embriones de buena calidad se observaron tasas de embarazo similares entre los ciclos naturales y aquellos con preparación endometrial. De hecho en este grupo las tasa de embarazo solo varían por un 2% siendo de 46.15% en ciclos naturales y de 48.15% en ciclos con preparación endometrial. Se observo una diferencia estadísticamente significativa en la el porcentaje de sobrevivencia de embriones desvitrificados. Sin embargo esta diferencia fue menor del 3% lo cual difícilmente representaría un impacto sobre las tasas de embarazo.

Sin embargo, en el grupo de calidad embrionaria regular se observa que la preparación endometrial confería una mejor tasa de embarazo. La tasa de embarazo fue de el doble en ciclos con preparación endometrial.

Los resultados sugieren que en pacientes con una calidad embrionaria no óptima, se pueden mejorar las tasas de implantación embrionaria con preparación endometrial. La selección de pacientes que se benefician de preparación endometrial puede dar más herramientas para la mejoría en las tasas de embarazo en pacientes de FIV.

Las mejorías de vitrificación ahora permiten que la transferencia de embriones vitrificados sea una alternativa factible a ciclos en fresco evitando el efecto de niveles supra fisiológicos de estrógenos que puede disminuir el potencial de implantación de un embrión teóricamente sano. Los protocolos de vitrificación deben de estar estandarizados para garantizar una buena sobrevivencia y poder organizar los recursos necesarios para optimizar la transferencia de embriones descongelados.

Aún existe un importante campo de investigación para poder seleccionar pacientes candidatos a diferentes técnicas que podrían mejorar las tasas de receptividad endometrial. Hay una necesidad de estudios prospectivos con un mayor número de casos para corroborar el efecto de la preparación endometrial en transferencia de embriones vitrificados en función de la calidad embrionaria.

## **Conclusiones.**

Para embriones de buena calidad la tasa de embarazo es similar cuando se compara su transferencia en ciclo natural con ciclos de preparación endometrial. Sin embargo, para embriones con calidad regular la tasa de embarazo es mayor en ciclos con preparación endometrial.

## Referencias

1. Society for Assisted Reproductive Technology, IVF success rate reports: 2013. <http://www.SART.org>.
2. Melo, M.A., Meseguer, M., Garrido, N., Bosch, E., Pellicer, A., Remohí, J., 2006. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum. Reprod.* 21, 1503–1507.
3. Fatemi, H.M., Popovic-Todorovic, B., 2013. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reprod. Biomed. Online* 27, 530–538.
4. Shapiro, B.S., Daneshmand, S.T., Garner, F.C., Aguirre, M., Hudson, C., Thomas, S., 2011. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil. Steril.* 96, 344–348.
5. Peña JE, Chang PL, Chan LK, Zeitoun K, Thornton MH 2nd, Sauer MV. Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles. *Hum Reprod* 2002;17:83–87.
6. Imudia, A.N., Goldman, R.H., Awonuga, A.O., Wright, D.L., Styer, A.K., Toth, T.L. The impact of supraphysiologic serum estradiol levels on peri-implantation embryo development and early pregnancy outcome following in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:65–71.
7. Fauser BCJM, Nargund G, Anderson AN, Norman R, Tarlatzis B, Boivin J, Ledger W. Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later. *Hum Reprod* 2010;25:2678-2684.
8. Kably Ambe A, Estevez Gonzalez S, Carballo Mondragon E, Durán Monterrosas L. Análisis comparativo de la tasa de embarazo-ovocitos capturados en un programa de fertilización in vitro. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76:256–260.
9. Sunkara S.K., Rittenberg V., Raine-Fenning N., Bhattacharya S., Zamora J., Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod.* 2011;26:1768–1774.

10. Shapiro, B.S., Daneshmand, S.T., Garner, F.C., Aguirre, M., Hudson, C. Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;29(3): 286 – 290
11. Horcajadas, J.A., Diaz-Gimeno, P., Pellicer, A., Simon, C. Uterine receptivity and the ramifications of ovarian stimulation on endometrial function. *Semin. Reprod. Med.* 2007;25:454– 460.
12. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 2015;103: 1190 – 1193
13. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008;90:186–193.
14. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;67:1671–80.
15. Z. Li, Y.A. Wang, W. Ledger, D.H. Edgar, and E.A. Sullivan Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study *Hum. Reprod.* 2014;29:2794-2801
16. Glujovsky D, Riestra B, Sueldo C, Fiszbjan G, et al. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *The Cochrane library* 2014.
17. Schoolcraft W, Sinton E, Schlenker T et al. Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate. *Fertil Steril* 1991;55:563–6.
18. Veleva Z, Orava M, Nuojua-Huttunen S, Tapanainen JS, Martikainen, H. Factors affecting the outcome of frozen–thawed embryo transfer. *Hum Reprod*, 2013;28:9; 2425-2431.
19. Gelbaya TA, Nardo LG, Hunter HR, Fitzgerald, CT, et al. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled

- cycles: a retrospective study. *Fertil seril* 2006;85: 603-609.
20. Glujovsky D, Blake DA, Farquhar CM, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *The Cochrane Library* 2015
  21. Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and sterility*, 2001;75:1126-1130.
  22. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270-83.
  23. Kosmas IP, Kolibianakis EM, Devroey P: Association of estradiol levels on the day of hCG administration and pregnancy achievement in IVF: a systematic review. *Hum Reprod* 2004, 19:2446–2453.
  24. Glujovsky D, Pesce R, Fiszbajn G, Sueldo C, Hart RJ, Ciapponi A. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes. *The Cochrane Library* 2010.
  25. Gabrielsen A, Fedder J, Agerholm I. Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study. *Reprod Biomed Online* 2006;12:70–76.
  26. Salumets A, Suikkari AM, Makinen S, Karro H, Roos A, Tuuri T. Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2006;21:2368 – 2374.
  27. Sole M, Santalo J, Rodriguez I, Boada M, Coroleu B, Barri PN, Veiga A. Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo score in a cryopreservation programme. *J Assist Reprod Genet* 2010;28:129–136.