



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Tasa de embarazo en transferencia de
embriones desvitrificados versus embriones en
fresco, en el Centro Médico Nacional 20 de
Noviembre (ISSSTE)**

NO. REGISTRO INSTITUCIONAL 203.2017

TESIS

**Que para obtener el título de:
Médico Especialista en Biología de la Reproducción
Humana**

P R E S E N T A

Dr. Ángel Avalos Guerrero

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Zoé Gloria Sondón García

Ciudad de México, México, Agosto 2017

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AUTORIZACIONES

Dra. Aura Argentina Erazo Valle Solís
Subdirectora de enseñanza e investigación

Dr. José Modesto Alfredo Góngora Rodríguez
Profesor titular del curso universitario de posgrado de
Biología de la Reproducción Humana

Dra. Zoé Gloria Sondón García
Director de tesis

Dr. Ángel Avalos Guerrero
Médico Residente

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ángel y Cruz, gracias por ser mi guía y por todo el sacrificio que realizaron para que me mantuviera estudiando todo este tiempo.

A mis hermanos, por creer en mí y siempre estar ahí en los momentos que necesitaba platicar y recibir algún consejo.

A mi esposa, Mercy Karina, quien siempre ha confiado en mí y ha estado cuando la he necesitado. La que me ha aconsejado y apoyado en cada decisión que he tomado. La mayor bendición que he recibido y sin la cual mi vida no tendría sentido.

A mis hijas, Sofía y Melisa, los grandes amores de mi vida, las cuales son el motivo para seguir superándome y ofrecerles un mejor futuro.

A todos mis maestros, mi gratitud y cariño por su infinita paciencia y profesionalidad. Por haber aportado un granito de arena en mi formación académica.

A todos y cada uno de mis compañeros de la Subespecialidad, de los que siempre recibí un consejo y apoyo incondicional, de los que aprendí que el esfuerzo es la base de todo éxito en la vida.

Ángel

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
ABREVIATURAS.....	10
MARCO TEÓRICO.....	11
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES.....	12
BENEFICIOS DE LA CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA	13
INCONVENIENTES DE LA CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

TÍTULO

Tasa de embarazo en transferencia de embriones desvitrificados versus embriones en fresco, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (ISSSTE).

RESUMEN

La vitrificación es la técnica que ha probado tener una alta tasa de supervivencia embrionaria con amplio potencial de implantación y cuyo uso se ha generalizado en la última década en los centros de reproducción asistida. Al analizar la tasa de embarazo en transferencia de embriones desvitrificados versus embriones en fresco, hay mayor probabilidad de obtener resultados óptimos en los embriones desvitrificados debido a la similitud de sus condiciones fisiológicas en contraposición con un ciclo estimulado. Sin embargo, hay autores que opinan que la vitrificación, es una tecnología relativamente nueva cuyas consecuencias no están del todo demostradas y que no se pueden afirmar que utilizar embriones desvitrificados sea la práctica de elección para todas las pacientes.

OBJETIVO

Determinar la tasa de embarazo en FIV/ICSI con transferencia de embriones desvitrificados versus embriones en fresco, de acuerdo a los datos proporcionados por el servicio de Reproducción Humana del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (CMN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, transversal, retrospectivo y descriptivo en donde se incluyeron 232 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, y a las que se les realizó FIV/ICSI, de las cuales 215 pacientes tuvieron una transferencia de embriones en fresco mientras que solamente 17 pacientes fue con embriones desvitrificados, en el CMN 20 de Noviembre, entre enero 2012 a diciembre 2016. Se analizó tasas de implantación, aborto, embarazo bioquímico,

embarazo clínico y recién nacido vivo, también se analizó la calidad embrionaria, número de embriones transferidos, así como día de transferencia.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico JMP versión 13.0. Se realizó un análisis descriptivo de los datos. Las variables continuas se expresaron como promedio \pm desviación estándar, las categóricas como número de casos (N) y porcentaje de ocurrencia (%). Prueba de t de Student se utilizarán para las variables continuas. Chi cuadrada y Prueba de Fisher se utilizarán para las variables categóricas. Odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95% (IC). La significación estadística se establecerá en $p < 0.05$.

RESULTADOS

En el caso de las transferencias en fresco, la mayoría de los embriones tenían una calidad de 2+ mientras que en la transferencia de embriones desvitrificados, la mayoría tenía calidad de 1+ ($p < 0.0001$). Para las pacientes del grupo de transferencia de embriones desvitrificados, el 23.53 % de las transferencias se hicieron en etapa de blastocisto, mientras que solamente fue 4.3% en el grupo de transferencia de embriones en fresco ($p < 0.0032$).

La tasa de embarazo clínico en el grupo de transferencia de embriones en fresco fue de 27.91%, y para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados de 35.29%, con valor $p = 0.9657$, sin diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, con tendencia a mejores tasas en el segundo grupo. La tasa de RN vivo, fue de 24.19% para el grupo de embriones transferidos en fresco y 29.41% para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados, con valor $p = 0.6363$, nuevamente sin significancia estadística pero con tendencias de obtener mejores resultados en el grupo de embriones transferidos en desvitrificados.

CONCLUSIONES:

La tasa de embarazo clínico y tasa de recién nacido vivo no se encontró significancia estadística, sin embargo con tendencia a obtener mejores resultados con el grupo de embriones transferidos en desvitrificados. Donde sí se observó diferencia estadísticamente significativa fue la etapa de transferencia de los embriones y la calidad embrionaria para ambos grupos. Se requiere incrementar el tamaño de la muestra de embriones desvitrificados para observar éstas diferencias.

Palabras Clave: Transferencia de embriones, tasa de embarazo, tasa de recién nacido vivo, embriones desvitrificados, embriones en fresco.

ABSTRACT

Vitrification is the technique that has proven to have a high rate of embryonic survival with ample potential for implantation and whose use has been generalized in the last decade in assisted reproduction centers. When analyzing the pregnancy rate in transfer of devitrified embryos versus fresh embryos, there is a greater probability of obtaining optimum results in the devitrified embryos due to the similarity of their physiological conditions as opposed to a stimulated cycle. However, there are authors who believe that vitrification is a relatively new technology whose consequences are not fully demonstrated and that it can not be said that using devitrified embryos is the practice of choice for all patients.

OBJECTIVE

To determine the pregnancy rate in IVF / ICSI with devitrified embryo transfer versus fresh embryos, according to data provided by the Human Reproduction Service of the National Medical Center 20 November (CMN).

MATERIALS AND METHODS

An observational, cross-sectional, retrospective and descriptive study was carried out in which 232 patients who met the inclusion criteria were included, and those who underwent IVF / ICSI, of which 215 patients had a fresh embryo transfer while Only 17 patients were submitted to devitrified embryos at CMN November 20, between January 2012 and December 2016. We analyzed rates of implantation, abortion, biochemical pregnancy, clinical pregnancy and live birth, we also analyzed the embryonic quality, number of embryos Transferred, as well as transfer day

STATISTIC ANALYSIS

For the statistical analysis, the statistical program JMP version 13.0 was used. A descriptive analysis of the data was performed. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation, categorical as number of cases (N) and percentage of occurrence (%). Student's t test will be used for continuous variables. Chi square and Fisher's test will be used for categorical variables. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI). Statistical significance will be set at $p < 0.05$.

RESULTS

In the case of fresh transfers, the majority of the embryos had a quality of 2+ whereas in the transfer of devitrified embryos, the majority had a quality of 1+ ($p < 0.0001$). For the patients in the devitrified embryo transfer group, 23.53% of the transfers were made in the blastocyst stage, whereas only 4.3% were in the embryo transfer group in fresh ($p < 0.0032$).

The clinical pregnancy rate in the fresh embryo transfer group was 27.91%, and for the devitrified embryo transfer group of 35.29%, with p value 0.9657, with no statistically significant difference, however, with a trend towards better rates In the second group. The live birth rate was 24.19% for the fresh embryo transfer group and 29.41% for the devitrified embryo transfer group, with p value 0.6363,

again without statistical significance but with tendencies to obtain better results in the group of embryos. Embryos transferred in devitrified.

CONCLUSIONS:

The clinical pregnancy rate and the live birth rate were not statistically significant, however, with a tendency to obtain better results with the group of embryos transferred in devitrified. Where a statistically significant difference was observed, the stage of embryo transfer and embryo quality for both groups was observed. It is necessary to increase the size of the sample of devitrified embryos to observe these differences.

Keywords: Embryo transfer, pregnancy rate, live newborn rate, devitrified embryos, fresh embryos.

ABREVIATURAS

E2	Estradiol
ET	Transferencia embrionaria
eSET	Transferencia de embrión único
FIV	Fertilización in vitro
FIV-TE	Fertilización in vitro con transferencia de embriones
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRHa	Agonista de Hormona Liberadora de Gonadotropinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
IMC	Índice de masa corporal
LH	Hormona luteinizante
OMS	Organización Mundial de la Salud
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
P4	Progesterona
PGR	Perdida gestacional recurrente
RE	Receptividad endometrial
TRA	Técnicas de reproducción asistida
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La vitrificación es la técnica que ha probado tener una alta tasa de supervivencia embrionaria con amplio potencial de implantación y cuyo uso se ha generalizado en la última década en los centros de reproducción asistida, en parte, debido a que busca minimizar la formación de cristales de hielo intra y extracelulares para reducir el daño celular, la toxicidad de las soluciones crioprotectoras y evitar el choque osmótico a las células ⁽¹⁾. Ésta técnica consiste en la solidificación de la solución crioprotectora en altas concentraciones, que se enfría a -196°C, en el que los embriones pueden conservar un estado de viabilidad que permitirá la transferencia de un número limitado de embriones y el almacenamiento de aquellos restantes para su uso futuro, maximizando así la eficacia acumulativa de un ciclo de FIV ^(3, 4, 5).

Hablando del proceso de implantación, éste requiere una interacción recíproca entre el embrión y el endometrio durante una pequeña ventana de tiempo. La culminación apropiada de una implantación depende de la presencia de tres elementos fundamentales: la calidad del embrión, la receptividad endometrial (RE) durante la “ventana de implantación” y la correcta interacción embrión-endometrio ^(6,7).

Derivado de lo descrito en las líneas previas, al analizar la tasa de embarazo en transferencia de embriones desvitrificados comparado con embriones en fresco, se ha reportado una mayor probabilidad de obtener resultados óptimos en los embriones desvitrificados debido a la similitud de sus condiciones fisiológicas en contraposición con un ciclo estimulado ^(8, 9, 10), ya que la exposición de los embriones a concentraciones de estrógenos suprafisiológicos y picos prematuros de progesterona podrían desencadenar condiciones nocivas para la receptividad del endometrio, tales como cambios morfológicos y bioquímicos que alteran el endometrio y podrían ser responsables del fallo de implantación ^(11, 12).

Es importante para comprender este procedimiento a plenitud, el analizar los beneficios y los inconvenientes que influyen en la criotransfencia embrionaria. Dentro de los beneficios están presentes la mejora en la técnica de criopreservación, prevención del Síndrome de hiperestimulación ovárica, mejora en los resultados obstétricos y perinatales y la mejora en la tasa de gestación con embriones desvitrificados; dentro de los inconvenientes resaltan las implicaciones económicas y los posibles efectos de la congelación en el genoma embrionario.

A pesar de lo anterior, existe controversia entre los resultados de ambas técnicas; hay autores que opinan que la vitrificación, aún a pesar de obtener excelentes tasas de supervivencia postdescongelación y muy buenos resultados clínicos, es una tecnología relativamente nueva cuyas consecuencias no están del todo demostradas ⁽¹³⁾. A pesar de que en los estudios publicados no se pueden asegurar que el uso de embriones desvitrificados sea la práctica de elección para todas las pacientes, este enfoque pareciera ser un modo muy eficiente de disminuir la morbilidad de los pacientes con alto riesgo de efectos adversos, particularmente aquellos con altos niveles de estradiol, y progesterona y alto riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica.

ANTECEDENTES

Se ha reportado que la infertilidad afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad fértil, cuya tendencia va en aumento y gracias a las técnicas de reproducción asistida (TRA), este tipo de parejas pueden ser capaces de resolver sus problemas ⁽¹⁾. Un procedimiento que ha tomado relevancia en la última década es la criopreservación de embriones, la cual ha permitido la preservación de éstos por tiempos prolongados manteniendo, generalmente, sus propiedades biológicas una vez descongelados. Así, con el nacimiento de Zoe Leyland el 28 de marzo de 1984, en Melbourne (Australia), concepción derivada de la transferencia de embriones criopreservados, constituyó, tras el nacimiento de Louise Brown en 1978, un segundo hito histórico en la medicina de la reproducción, gracias al trabajo de los doctores Alan Trounson y Carl Wood ⁽¹⁵⁾.

La implantación es uno de los pasos más importantes para asegurar el éxito de un ciclo de FIV; su efectividad depende de la calidad del embrión, la interacción entre el embrión y el endometrio y la receptividad endometrial. De esta manera, la ventana de implantación es un período limitado en el cual el endometrio adquiere el estado morfológico y funcional adecuado para la unión del embrión. Debido a lo anterior, la receptividad endometrial es esencial para la concepción, tanto en ciclos naturales como en los tratamientos de infertilidad. ⁽¹⁶⁾

Puesto que la estimulación ovárica puede tener efectos adversos en el endometrio, y la vitrificación de embriones ha aumentado la tasa embarazo clínico y recién nacido vivo en los últimos años, la política de “congelar todos los embriones”, ha emergido como una estrategia a la transferencia de embriones en fresco.

BENEFICIOS DE LA CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Mejora en la técnica de la criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones se ha incrementado espectacularmente en la última década, debido a una mayor supervivencia embrionaria, tanto de embriones en células como en blastocistos. El primer éxito obtenido con embriones previamente criopreservados se alcanzó utilizando la congelación lenta como método de congelación. Sin embargo, con el advenimiento de la vitrificación y el aumento de las tasas de supervivencia embrionaria con ésta técnica, esto ha conducido a la utilización de este método en la mayoría de los centros de reproducción asistida.

En un trabajo realizado por Veleva y Col. (2013) ⁽³⁾, se estudiaron los factores que afectan el resultado de transferencia con embriones descongelados, los autores concluyeron que el congelar embriones de calidad óptima, el protocolo de preparación endometrial, el número de embriones transferidos y el índice de masa corporal (IMC) son los factores que afectan de forma independiente al éxito

en la criotransferencia. Estos autores encontraron que en el 78 % de los ciclos en los cuales se han congelado solo embriones de buena calidad, las características morfológicas de los mismos se conservan después de la descongelación. Cuanto mayor sea la calidad inicial de los embriones, más persistirá en el momento de la descongelación, y mayor será la probabilidad de embarazo.

Hay trabajos que demuestran que la vitrificación puede, *per se*, alterar la metilación en los embriones de ratón ^(17, 18) o en otros casos ser responsable de patologías en los recién nacidos como es la macrosomía, incremento que no puede explicarse únicamente por factores maternos. ^(19, 20)

Prevención de la hiperestimulación ovárica

El principal argumento que se ha utilizado para la congelación de todos los embriones de un ciclo y transferirlos posteriormente, es la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) en las pacientes con una alta respuesta en el ciclo de estimulación ovárica controlada. El SHO se origina por un incremento en la permeabilidad vascular, mediado principalmente por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La hCG empleada para desencadenar la ovulación y la maduración final del ovocito parece jugar un papel muy importante en la etiología del síndrome ⁽²¹⁾ siendo una estrategia importante para reducir el riesgo de SHO la cancelación de la transferencia embrionaria y congelación de los embriones.

Mejora de los resultados obstétricos y perinatales

Maheshwari y Col. analizando 112,432 ciclos (95,911 transferencia en fresco y 16,521 transferencia en descongelado) encontraron un menor riesgo de bajo peso al nacer después de la transferencia de embriones congelados; sin embargo, el RR de tener un bebé alto peso al nacer fue mayor 1.64, con IC95% (1.53-1.76). Sin diferencias en el riesgo relativo de parto prematuro y anomalías congénitas ⁽²⁰⁾.

Todos estos estudios indican que la tasa de nacimientos después de transferencias con embriones descongelados es mejor que cuando se compara con la transferencia en fresco. Sin embargo, debería enfatizarse que estos estudios son todos observacionales, y que los embriones que se han congelado, descongelado y transferido, son los embriones “sobrantes” del ciclo o de segunda elección, ya que en fresco se transfirieron los mejores. Así, se podría pensar que si se hubieran congelado y transferido embriones de primera elección, los resultados obstétricos y perinatales aún podrían mejorarse. ⁽²²⁾

En este sentido, un estudio clínico retrospectivo comparó los resultados de nacimientos únicos obtenidos en 2.531 transferencias en fresco y 4.092 criotransferencias después de elegir el embrión a transferir y vitrificarlo. Este estudio utilizó una estimulación mínima con citrato de clomifeno en combinación con dosis bajas de gonadotropinas y transferencia de embrión único (eSET). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la prematuridad, defectos totales en el nacimiento o mortalidad perinatal pero se encontró mayor peso en el nacimiento y menores incidencias debidas al bajo peso en el grupo de criotransferencia. ⁽²³⁾

Mejora de la tasa de gestación con embriones congelados

Uno de los argumentos más fuertes a favor de la transferencia de embriones descongelados es la tasa de gestación que actualmente se consigue con ella ⁽²²⁾. Un meta-análisis de tres estudios controlados y randomizados que incluyeron 633 mujeres en las cuales se compara la tasa de gestación y aborto después de transferencia con embriones frescos y descongelados ⁽²⁴⁾ demuestra que la tasa de gestación clínica con embriones descongelados es mayor, así como también, que no hay diferencias en la tasa de aborto. Estos resultados se observaron también transfiriendo embriones de día +5 ⁽²⁵⁾ y +2 ⁽²⁶⁾.

Analizando el estudio realizado por Schollcraft y Col., con mujeres mayores de 35 años, parece corroborar los resultados anteriores, sin embargo este incluye datos de nacido vivo ni resultados perinatales, por lo que complica la comparación con estudios previos ⁽²⁷⁾.

Es obvio que además de la calidad embrionaria el éxito de la criotransferencia dependerá de la preparación endometrial efectiva y del soporte de la fase lútea, sin embargo, estas técnicas están ya muy evolucionadas. En un meta análisis realizado por Groenewoud y Col. se encontró que la tasa de gestación no era significativamente diferente cuando se comparaban criotransferencia en ciclo natural frente a criotransferencia con ciclo natural modificado, ciclo natural frente a sustituido, ciclo sustituido con y sin agonistas de la GnRH y ciclo natural frente a sustituido con agonista de la GnRH ⁽²⁸⁾.

INCONVENIENTES DE LA CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Implicaciones económicas

La criopreservación embrionaria y consecuente criotransferencia, podría aumentar el costo del procedimiento frente a la transferencia en fresco. Otro costo extra incluiría el asociado con el tiempo que necesitan las pacientes para el criotransferencia, sin embargo, debido a que puede reducir los riesgos de SHO, también reduciría los riesgos perinatales que podrían derivan de éste síndrome en el caso de transferencias en fresco ⁽²⁹⁾.

Efectos de la congelación en el genoma embrionario

Existe mucha información sobre estudios que han estudiado el efecto de la criopreservación en el ADN de los embriones humanos. En un estudio de Li y Col. se reportó que, de acuerdo a los resultados obtenidos para ese estudio, la congelación lenta aumenta la fragmentación de ADN de los embriones, mientras que la vitrificación no causa daños. En dicho estudio no fue posible establecer si los cambios en la integridad del ADN eran causados directamente por la congelación o eran secundarios a apoptosis ⁽³⁰⁾. A pesar de lo anterior, existen estudios realizados en animales que han reportado que tanto la congelación lenta como la vitrificación de blastocistos afecta la integridad del ADN ⁽³¹⁾; por lo tanto es importante continuar estudiando estos procedimientos.

Con respecto a alteraciones cromosómicas, en un trabajo realizado con embriones humanos se comprobó que el nivel de poliploidía aumenta con la criopreservación, debido a un fenómeno de fusión de blastómeras, desencadenado por la congelación en el estadio de 2 a 10 células ⁽³²⁾. Existen estudios que demuestran que incluso bajo condiciones óptimas de cultivo, el estado de metilación del ADN embrionario es lábil y así, la criopreservación embrionaria, que implica un gran rango de factores extremos, es posible que pueda tener consecuencias para la metilación y la subsecuente expresión génica ⁽³³⁾.

Hasta el momento, los niños nacidos de embriones criopreservados parecen no estar afectados por el procedimiento. Incluso algunos autores sugieren que la criotransferencia puede dar lugar a niños más sanos que las transferencias en fresco ⁽²⁴⁾ o mejores resultados obstétricos y perinatales ^(23, 34).

CRIOPRESERVACIÓN EN CICLOS DE FIV/ICSI

Sin lugar a dudas, aún falta mucho por comprender sobre el tema de la vitrificación, falta realizar más estudios controlados aleatorizados que apoyen su práctica. Y aunque en los resultados publicados no se puede concluir que la utilización de embriones desvitrificados sea la práctica de elección para todas las pacientes, en la práctica se deben de poner todas las evidencias en la mesa, evaluar el caso particular de cada paciente y decidir el mejor método para cada pacientes, de tal forma que al final, el objetivo sea no sólo el hecho de lograr un embarazo, sino un embarazo con un recién nacido sano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La literatura reporta diversas evidencias que demuestran que la estimulación ovárica, la cual produce niveles suprafisiológicos de hormonas, puede disminuir la tasa de gestación frente a los ciclos de transferencia de embriones desvitrificados, además, el desarrollo endometrial puede controlarse de forma más precisa en los ciclos con embriones desvitrificados.

Puesto que la vitrificación es un procedimiento que se puede realizar en el laboratorio de Reproducción Asistida en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, esta técnica puede ser una alternativa para mejorar los resultados en FIV. Teniendo la política de vitrificar los embriones obtenidos en un ciclo de FIV, bajo situaciones adversas para poder llevar a cabo la transferencia embrionaria o simplemente por un número superior de embriones a transferir, realizar una transferencia en un ciclo posterior, ya sea natural o sustituido, podría beneficiar a las pacientes derechohabientes de nuestra institución. La ventaja de este método es que proporciona un ambiente más fisiológico a los embriones, y pueden obtenerse mejores tasas de gestación y menor morbilidad materna y perinatal. A pesar de todos los beneficios descritos para esta técnica, existen controversias en la literatura sobre el uso generalizado de esta estrategia.

Es por lo anterior que para esta investigación se planteó el objetivo de examinar la tasa de embarazo en embriones desvitrificados versus embriones en fresco y de ésta forma tener estadísticas propias del servicio de Reproducción Humana del CMN 20 de Noviembre y con ello ayudar a normar conductas en torno a nuestros derechohabientes con el objetivo de poder proporcionar los mejores resultados.

Por lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Es mayor la tasa de embarazo en transferencia de embriones desvitrificados versus embriones en fresco?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la tasa de embarazo en FIV/ICSI con transferencia de embriones desvitrificados versus embriones en fresco, de acuerdo a los datos proporcionados por el servicio de Reproducción Humana del CMN 20 de Noviembre.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar las variables sociodemográficas de los grupos de estudio.
- Conocer la calidad de transferencia de los embriones.
- Conocer el día de transferencia de los embriones (clivaje-blastocisto).
- Conocer el número de embriones transferidos.
- Conocer la tasa de embarazo múltiple obtenida por FIV/ICSI en embriones desvitrificados versus en fresco.
- Conocer la tasa de embarazo clínico obtenida por FIV/ICSI en transferencia de embriones desvitrificados versus en fresco.
- Conocer la tasa de aborto obtenida por FIV/ICSI en transferencia de embriones desvitrificados versus en fresco.
- Conocer la tasa de implantación obtenida por FIV/ICSI en transferencia de embriones desvitrificados versus en fresco.
- Conocer la tasa de recién nacido vivo por FIV/ICSI en transferencia de embriones desvitrificados versus en fresco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, transversal, retrospectivo y descriptivo, donde se analizó la tasa de embarazo en transferencia de embriones desvitrificados versus embriones en fresco, en el CMN 20 de Noviembre, en el periodo del 1° de Enero del 2012 al 31 Diciembre del 2016.

Los criterios de inclusión fueron:

- Mujeres infértiles a quienes se les realizó FIV/ICSI en el laboratorio de Reproducción Asistida del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE, en el periodo de 1ro de Enero del 2012 al 31 de Diciembre del 2016, con embriones desvitrificados y en fresco.
- Sólo transferencia embrionaria con calidad 1+ ó 2+, en alguno de los embriones (Según la clasificación de Lucinda Veeck).

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con patología uterina como causa de infertilidad.
- Pacientes con fracaso de la implantación (≥ 2 ET anteriores con al menos 1 embrión de buena calidad en cada transferencia, sin lograr embarazo).
- Pacientes con el antecedente de perdida gestacional recurrente (PGR)
- Transferencias embrionarias con calidad $\geq 3+$, sin haber transferido por lo menos un embrión calidad 1+ ó 2+.

La información fue tomada de los expedientes clínicos de cada paciente a las cuales se les realizó FIV/ICSI con transferencia embrionaria en fresco o desvitrificados del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, todos estos resultados fueron agrupados en la hoja de recolección de datos.

Se seleccionó el método más adecuado para la fertilización de ovocitos, en los cuales cuando se encontró reducciones importantes de la densidad espermática por debajo de 1 millón o reducciones en la motilidad progresiva inferiores al 26%

se optó por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Para las demás alteraciones fue fertilización *In vitro* convencional el método de elección.

Los ovocitos con grado I de maduración (Metafase I) fueron inseminados entre 1 a 5 horas posteriores a la extrusión del primer corpúsculo polar, mientras que ovocitos metafase II fueron inseminados de 3 a 5 horas posteriores a la captura. En el caso de pacientes candidatos a ICSI, la inseminación se la realizó entre 2 a 3 horas posteriores a la denudación. La fertilización fue determinada 18 a 20 hrs luego de la inseminación siendo considerada como normal el encontrar la presencia de 2 cuerpos polares (2CP) y 2 pronúcleos (2PN). La evaluación del desarrollo embrionario fue determinada entre 24 a 42 horas posteriores a la fertilización y evaluada según la escala de Lucinda Veeck.

La transferencia embrionaria fue realizada de acuerdo al desarrollo embrionario y dos semanas posteriores a la transferencia embrionaria se realizó la determinación de hCG fracción B siendo considerados positivos valores superiores a 10 UI/L. Se determinó como embarazo bioquímico la presencia de fracción B en ausencia de saco gestacional, embarazo clínico como la presencia de actividad cardíaca fetal determinada por doppler o presencia de saco gestacional, aborto espontáneo a todo embarazo que se perdió antes de las 22 semanas de gestación, nacido vivo todo feto nacido por parto o cesárea con movimientos fetales y respiratorios luego de las 22 semanas de embarazo.

Según la evolución del embarazo se calcularon las tasas de embarazo bioquímico, clínico, aborto espontáneo y nacido vivo

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se procesaran con con el programa JMP 13.0. Las variables continuas se expresaran como promedio \pm desviación estándar, las categóricas como número de casos (n) y porcentaje de ocurrencia (%). Prueba de t de Student se utilizarán para las variables continuas. Chi cuadrada y Prueba de Fisher se utilizarán para las variables categóricas. Odds ratio (OR) con intervalos

de confianza del 95% (IC). La significación estadística se establecerá en $p < 0.05$.

RESULTADOS

La población de estudio consistió de un total de 232 pacientes que cumplían los criterios de inclusión planteados y a las que se les realizó FIV/ICSI, entre el periodo del 1° de Enero del 2012 al 31 Diciembre del 2016, de las cuales 215 pacientes tuvieron una transferencia de embriones en fresco mientras que solamente 17 fue con embriones desvitrificados.

Se analizó la distribución de los datos demográficos en los grupos de transferencia de embriones en fresco y transferencia de embriones desvitrificados (Tabla 1); se puede observar que no existe diferencia entre la edad de las pacientes entre los grupos; en ambos casos se observó una distribución normal con medias muy cercanas una a la otra, y no se presentó diferencia por el análisis de comparación de medias de t de Student ($P < 0.05$). También se analizó el IMC de las pacientes tratadas en los procedimientos de reproducción asistida, no se encontró diferencia entre los grupos tratados por transferencia en fresco y los desvitrificados. La edad de las parejas en los grupos tampoco presentó diferencia, por lo que estos resultados nos indican que ambos grupos son homogéneos, por lo tanto, son grupos comparables entre sí, donde los resultados que se obtienen van a depender del procedimiento “per se” en estudio.

Por otra parte se analizaron también los valores basales de FSH, estradiol, TSH y prolactina en sangre; ninguna de las variables fueron estadísticamente diferentes, por lo que, nuevamente se puede estar seguro de que los datos perinatales y las tasas que se obtuvieron en esta investigación dependen en un mayor grado del tipo de transferencia realizada, ya sea con embriones desvitrificados o en fresco.

Tabla 1. Características de los pacientes por tipo de transferencia embrionaria.

Características de las pacientes.	Grupo de transferencia de embriones en fresco (n= 215)	Grupo de transferencia de embriones desvitrificados (n=17)	Valor p
<i>Edad de la mujer (años) *</i>	35.10 ± 3.82 ^a	34.94 ± 4.64 ^a	0.05
<i>IMC (Kg/m2) *</i>	25.64 ± 3.62 ^a	24.82 ± 2.78 ^a	
<i>Edad del varón (años)*</i>	38.70 ± 6.41 ^a	38.00 ± 4.83 ^a	
<i>Duración de la infertilidad (años)*</i>	6.50 ± 2.78 ^a	6.71 ± 2.71 ^a	
<i>FSH basal (mUI/mL)*</i>	6.56 ± 2.93 ^a	6.31 ± 1.62 ^a	
<i>Estradiol basal (pg/mL) *</i>	48.06 ± 23.80 ^a	43.89 ± 13.27 ^a	
<i>TSH (mUI/mL)*</i>	1.89 ± 1.47 ^a	2.28 ± 1.87 ^a	
<i>Prolactina (ng/mL)*</i>	15.36 ± 7.81 ^a	14.80 ± 6.83 ^a	
Factor de infertilidad (%) **			
<i>Femenino (%)</i>	49.77	47.06	0.9758
<i>Masculino (%)</i>	19.53	23.53	
<i>Mixto (%)</i>	20.93	17.65	
<i>Inexplicable (%)</i>	9.3	11.76	
Tipo de infertilidad **			
<i>Primaria (%)</i>	66.05	58.82	0.5513
<i>Secundaria (%)</i>	34.48	41.18	
Técnica de reproducción Asistida (TRA) **			
<i>FIV (%)</i>	84.19	82.35	0.8444
<i>ICSI (%)</i>	15.81	17.65	

* En variables continuas se realizó un análisis de comparación de medias de t de student (P<0.05). Los resultados se presentan como promedios ± desviación estándar.

** En variables nominales, se realizó una análisis de contingencia y se comparó diferencia entre frecuencias por un análisis de χ^2 .

Con respecto al factor de infertilidad, tipo de infertilidad y la técnica de reproducción asistida utilizada (FIV o ICSI) también fueron valores similares y no

presentaron diferencias cuando éstas fueron analizadas en un análisis de contingencia, comparando por medio de un estudio de χ^2 . Cabe destacar que el factor de infertilidad que se observó con mayor frecuencia fue el factor femenino, con un 49.77% y 47.06%, para el caso de los embriones transferidos en fresco y desvitrificados respectivamente, con un menor porcentaje en relación al factor masculino en relación a lo reportado por la literatura.

En nuestro grupo de pacientes, también se observó, que el tipo de infertilidad primaria fue el que se reportó con mayor frecuencia. Y en la TRA, el FIV superó por mucho al ICSI, siendo un 84.19% para las transferencias en fresco y 82.35% para desvitrificados.

En la Tabla 2 se muestra el número de embriones transferidos a las pacientes bajo tratamiento de reproducción asistida, la calidad de los mismos y el porcentaje de pacientes a las que se les transfirió ya sea embriones en etapa de clivaje o en etapa de blastocisto.

Tabla 2. Características del ciclo por tipo de transferencia embrionaria.

Características de las pacientes.	Grupo de transferencia de embriones en fresco (n=215)	Grupo de transferencia de embriones desvitrificados (n=17)	Valor p
Número de embriones transferidos			
1 (%)	17.21	5.88	0.1150
2 (%)	53.49	82.35	
3 (%)	28.84	11.76	
Calidad embrionaria			
1+ (%)	30.35	42.86	<0.0001
2+ (%)	53.49	22.86	
3+ (%)	12.66	8.57	
4+ (%)	0.66	1.86	
5+ (%)	0.22	0.00	

Día de transferencia			
Clivaje 2/3 (%)	97.21	76.47	0.0032
Blastocito 5/6 (%)	4.31	23.53	

Se analizó la frecuencia de la cantidad de embriones transferidos en cada uno de los tratamientos por un estudio de χ^2 ; se encontró que no había diferencia entre los grupos. Donde sí se determinó diferencia, utilizando el mismo análisis estadístico, fue en la calidad embrionaria; en el caso de las transferencias en fresco, la mayoría de los embriones tenían una calidad de 2+ mientras que en la transferencia de embriones desvitrificados, la mayoría tenía calidad de 1+ ($p < 0.0001$). De igual manera se observó una diferencia estadístico en el tipo de transferencia que se les hizo a las pacientes de acuerdo al tratamiento, para las pacientes del grupo de transferencia de embriones desvitrificados, el 23.53 % de las transferencias se hicieron en etapa de blastocisto, mientras que solamente se hizo transferencia de 4.31 % de los mismos en el grupo de transferencia de embriones en fresco ($p < 0.0032$).

Se analizan las tasas de implantación, embarazo bioquímico, embarazo clínico, recién nacido vivo y tasa de aborto. No se observaron diferencias significativas en relación a las tasas mencionadas. (Tabla 3) En relación a la tasa de implantación, a pesar de que la tendencia indica que existe una mayor tasa de implantación para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados, el análisis no mostró diferencia significativa.

Tabla 3. Tasa de embarazo bioquímico, embarazo clínico y RN vivo.

Test de diagnóstico	Grupo de transferencia de embriones en fresco (n=215)	Grupo de transferencia de embriones desvitrificados (n=17)	Odds ratio (iC95%)	Valor p
<i>Tasa de implantación (%)</i>	18.14 ± 31.75 ^a	23.53 ± 32.87 ^a	-	0.05
<i>Tasa de embarazo bioquímico (%)</i>	12 (5.58%)	0 (0.00%)	-	0.1706

<i>Tasa de embarazo clínico (%)</i>	60 (27.91%)	6 (35.29%)	0.7097 IC95% (0.2512-2.0046)	0.9657
<i>Tasa de RN Vivo (%)</i>	52 (24.19%)	5 (29.41%)	0.7656 IC95% (0.2577-2.2749)	0.6363
<i>Tasa de aborto (%)</i>	9 (16.67%)	1 (15.38%)	0.9000 IC95% (0.09379-8.6359)	0.9279

En el caso de la tasa de embarazo bioquímico, solo hubo pacientes en el grupo de transferencia de embriones en fresco que presentaron este tipo de embarazo. En cuanto al embarazo clínico, no hubo diferencia entre los grupos (p 0.9657), sin embargo, nuevamente se ve una mayor tendencia en el grupo de transferencia de embriones desvitrificados. En la tasa de recién nacido vivo, los valores entre ambos grupos estuvo muy cercano, por lo que no se presentó diferencia significativamente estadística, siendo 24,19% para el grupo de pacientes con embriones transferidos en fresco y 29.41% para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados ($p=$ 0.6363). Por último, se calculó la tasa de aborto, nuevamente los valores entre los grupos se encontraban muy cercanos, por lo que no se presentó diferencia significativamente estadística entre las ambos grupos (p 0.9279).

En la Figura 1 se expresan graficados los porcentajes de las tasas de implantación, embarazo bioquímico, embarazo clínico, recién nacido vico y tasa de aborto para cada uno de los dos grupos. En ninguna de ellas se observa diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, en todas ellas con tendencia a obtener mejores resultados con la transferencia de embriones desvitrificados.

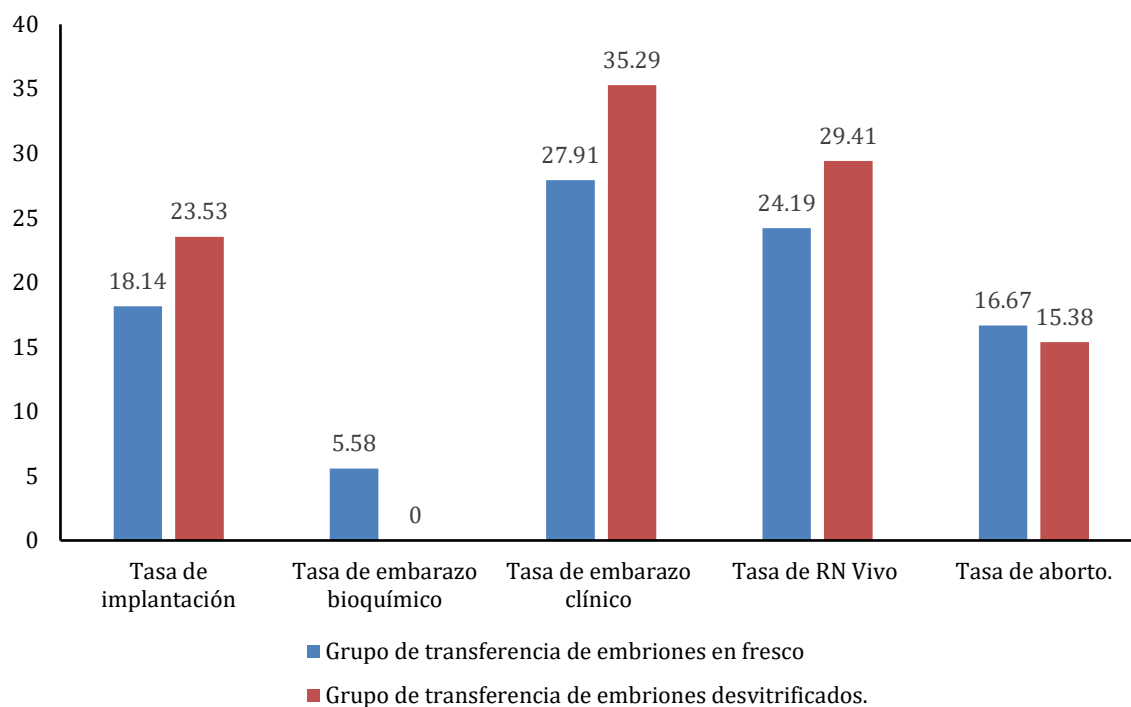


Figura 1. Comparación entre las tasas obtenidas por las técnicas de transferencia de embriones en fresco y de embriones desvitrificados

Por último se analizó la frecuencia de embarazos múltiples en los grupos de estudio; se encontró que en el caso de transferencia de embriones desvitrificados no se presentaron embarazos múltiples mientras que el grupo de transferencia de embriones en fresco se presentaron 28.85% de gemelares y 3.85% de embarazos triples (Tabla 4), siendo graficados en la figura 2.

Tabla 4: RN vivo, único, gemelar o triple por tipo de transferencia

Características de las pacientes.	Grupo de transferencia de embriones en fresco	Grupo de transferencia de embriones desvitrificados.	Valor p
<i>RN único (%)</i>	67.31	100.00	0.1539
<i>RN gemelar (%)</i>	28.85	0.00	
<i>RN triple (%)</i>	3.85	0.00	

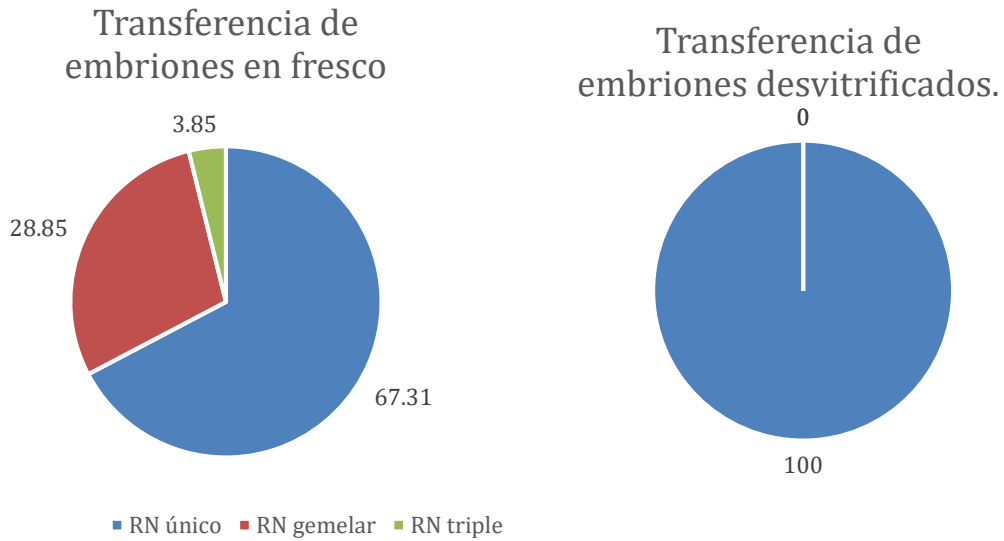


Figura 2. Tasas de embarazos únicos y múltiples producto Nacido vivo

A pesar de que en este estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados, se observa una tendencia a tener mejores resultados para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados. Para lograr obtener estas diferencias, se recomienda incrementar el tamaño de muestra de embriones desvitrificados, sin embargo, como se mencionaba en el marco teórico de ésta investigación, esta metodología representa costos más elevados para los pacientes y obviamente el tener que esperar a un ciclo posterior para poder realizar la transferencia embrionaria, situación que para algunas pacientes pudiera implicar ciertos problemas e imposibilidad para poder llevarlos a cabo.

DISCUSIÓN

Al analizar la tasa de embarazo en transferencia de embriones desvitrificados comparado con embriones en fresco, se ha reportado una mayor probabilidad de obtener resultados óptimos en los embriones desvitrificados debido a la similitud de sus condiciones fisiológicas en contraposición con un ciclo estimulado ^(8, 9, 10), ya que la exposición de los embriones a concentraciones de estrógenos suprafisiológicas y picos prematuros de progesterona podrían desencadenar condiciones nocivas para la receptividad del endometrio, tales como cambios morfológicos y bioquímicos que alteran el endometrio y podrían ser responsables del fallo de implantación ^(11, 12).

En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en las tasas de implantación, embarazo clínico y recién nacido vivo, a pesar de que la tendencia indica que existen mejores resultados en el grupo de transferencia de embriones desvitrificados. Así, la tasa de embarazo clínico, el cual fue uno de los principales objetivos se presentó en 27.91% para el grupo de transferencias de embriones en fresco y 35.29% para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados ($p=0.9657$) y con respecto a la tasa de recién nacido vivo, fue de 24,19% para el grupo de pacientes con embriones transferidos en fresco y 29.41% para el grupo de transferencia de embriones desvitrificados ($p= 0.6363$).

Un meta-análisis (Roque et al. 2013) de tres estudios controlados y randomizados que incluyeron 633 mujeres en las cuales se compara la tasa de gestación y aborto después de transferencia con embriones frescos y descongelados ⁽²⁴⁾ demuestra que la tasa de gestación clínica con embriones descongelados es mayor, así como también, que no hay diferencias en la tasa de aborto. Éstos mismos resultados se obtuvieron en nuestro estudio, aunque no se encontraron diferencias significativas en la tasa de embarazo y recién nacido vivo, sí se observó tendencia a mejores resultados con los embriones desvitrificados. Con respecto a la tasa de aborto, en nuestro estudio se correlaciona con lo reportado por Roque et al., con una tasa de aborto en el grupo de transferencia de embriones en fresco del 16.67% y en el grupo de transferencia de embriones desvitrificados de 15.38%.

Dentro de los beneficios que existen al realizar una transferencia en diferido existen: Síndrome de hiperestimulación ovárica. Si bien en nuestro estudio no se valoraron los niveles de estrógenos el día de la maduración final ovocitaria, es obvio que éstos tendrían una concentración mayor en el caso de los embriones desvitrificados que en los embriones transferidos en fresco, esto porque justamente el síndrome de hiperestimulación ovárica es una de las causas de realizar una transferencia en diferido. Este enfoque pareciera ser un modo muy eficiente de disminuir la morbilidad de los pacientes con alto riesgo de efectos adversos, particularmente aquellos con altos niveles de estradiol, y progesterona y alto riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica.

También hay que tomar en cuenta que dentro de los inconvenientes resaltan las implicaciones económicas y aunque es difícil realizar esta última valoración en muchos centros, sin duda alguna, por el lado que se vea, en cada uno de los centros que se comparen podrá verse la misma tendencia, mayores costos en embriones desvitrificados.

Hay autores que opinan que la vitrificación, aún a pesar de obtener excelentes tasas de supervivencia de embriones desvitrificados y muy buenos resultados clínicos, es una tecnología relativamente nueva cuyas consecuencias no están del todo demostradas ⁽¹³⁾. Por lo menos en nuestra revisión tendencias a mejores resultados en tasa de embarazo clínico y recién nacido vivo y aunque se requiere aumentar el tamaño de la muestra, éstos resultados preliminares nos pueden dar una idea de lo podemos esperar y que podría ser una buena opción para mejorar estas tasas de embarazo.

Además, en nuestra revisión se observó que en el caso de recién nacido vivo, el 100% de los embarazos fueron únicos en el caso de embriones desvitrificados y sólo 67.31% para el caso de transferencia de embriones en fresco, con un 28.85% para embarazo gemelar e incluso 3.85% para embarazo triple lo cual va implícito en mayor número de complicaciones tanto para la madre como para los fetos.

CONCLUSIONES

En nuestra investigación no se encontró significancia estadística en la tasa de embarazo clínico y tasa de recién nacido vivo, sin embargo con tendencia a obtener mejores resultados con el grupo de transferencia de embriones desvitrificados, requiriéndose incrementar el tamaño de la muestra para observar diferencias estadísticamente significativas. Donde sí se observó diferencia fue en la etapa de transferencia de los embriones y la calidad embrionaria, en el caso de las transferencias en fresco, la mayoría de los embriones tenían una calidad de 2+ mientras que en la transferencia de embriones desvitrificados, la mayoría tenía calidad de 1+; en relación a la etapa de transferencia, para las pacientes del grupo de transferencia de embriones desvitrificados, el 23.53 % de las transferencias se hicieron en etapa de blastocisto, mientras que solamente se realizó en 4.31 % del grupo de transferencia de embriones en fresco.

De esta forma, realizar una transferencia en un ciclo posterior parece asociarse a mejores tasas de embarazo y RN vivo. Por otro lado, parece evidente que diferir la transferencia conlleva un aumento en el costo de los procedimientos relacionados en comparación con la transferencia en fresco, esto dependerá de la forma en la que cada centro valora económicamente sus servicios. Es por esto que en el momento de plantear la segmentación de los ciclos de FIV y la realización de transferencia en diferido se deben tener en cuenta factores que afectan los resultados de esta decisión, como son: la probabilidad de éxito para cada pareja (edad, causa de infertilidad, historial médico, etc.), la calidad embrionaria, las condiciones para realizar la criopreservación embrionaria en nuestro laboratorio de FIV y la posibilidad de conseguir una preparación endometrial y soporte de fase lútea efectivos. Todo esto lleva a la necesidad de individualizar las estrategias terapéuticas, buscando maximizar las probabilidades de éxito para cada caso en particular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Elnaha A, Alcolak E, Marar EA, Elnahas T, et al. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fertility Society Journal* 2010;15:2-9.
2. Gelbaya TA, Nardo LG, Hunter HR, Fitzgerald CT, et al. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or downregulated hormonally controlled cycles: a retrospective study. *Fertil Steril* 2006;85:603-609.
3. Veleva F, Orava M, Nuojua-Huttunen S, Tapanainen JS, Martikainen H. Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Human Reprod* 2013;28:2425-2431.
4. Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil Steril* 2010;93:2729-33.
5. Zhao XM, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, et al. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Devel* 2012;79:445-50.
6. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12 (6): 731-746.
7. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P and Griesinger G on behalf of the Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 2007; 13 (4): 365-377.
8. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in high responders. *Fertil. Steril.* 2011; 96(2): 516-8.
9. Griesinger G, Von Otte S, Schroer A, Ludwig AK, Diedrich K, AlHasani S, Schultze-Mosgau A. Elective cryopreservation of all pronuclear oocytes after GnRH agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of developing OHSS: a prospective, observational proof-of-concept study. *Hum. Reprod.* 2007; 22 (5): 1348-52.
10. Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in

- assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist. Reprod. Genet.* 2010; 27: 357-63.
11. Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, Fauser BC. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrin. Metab.* 2004; 15 (2): 84-90. 60.
 12. Papanikolaou EG, Bourgain C, Kolibianakis E, Tournaye H, Devroey P. Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes. *Hum. Reprod.* 2005; 20 (6): 1541-7.
 13. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson Loutradi KE, Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. 2014 *Fertil Steril*; 102:3–9.
 14. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril.* marzo de 2015;103(3):e18–25.
 15. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305 (5936): 707-709.
 16. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Steirteghem AV, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin release hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025–9
 17. Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil Steril* 2010;93:2729–33
 18. Zhao XM, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, et al. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Devel* 2012;79:445–50.
 19. Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod* 2014;29:618–27.
 20. Abha Maheshwari, Edwin Amalraj Raja, Siladitya Bhattacharya. Obstetric and perinatal outcomes after either fresh or thawed frozen embryo

transfer: an analysis of 112,432 singleton pregnancies recorded in the Human Fertilisation and Embryology Authority anonymized dataset Original Research Article. *Fertil Steril*. Available online 24 September 2016

21. Aboulghar M. Symposium: update on prediction and management of OHSS. *Prevention of OHSS. Reprod Biomed Online* 2009;19:33–42.
22. Evans J, Hanna NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, Osianlis T, Salamonsen LA and Rombauts LJF. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Human Reprod Update* 2014; 20:6. 808-821
23. Kato O, Kawasaki N, Bodri D, Kuroda T, Kawachiya S, Kato K, et al. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;161:46–50.
24. Roque M, Lattes K, Serra S, Sol7)a I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;99:156–62.
25. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. 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* 2011a;96: 344–348.
26. Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:357–363.
27. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril* 2013;100:615–619
28. Groenewoud ER, Cantineau AE, Kollen BJ, Macklon NS, Cohlen BJ. What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen-thawed embryo transfer cycles? A systematic review and metaanalysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:458–70.

29. Matheus Roque, Karinna Lattes, Sandra Serra, Ivan Solà, Selmo Geber, Ramón Carreras, Miguel Angel Checa. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013; 99: 156-162.
30. Li L, Zhang X, Zhao L, Xia X, Wang W. Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. *Mol Reprod Dev* 2012;79:229–236.
31. Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* 2009;91(5 Suppl.):2087–2094.
32. Balakier H, Cabaca O, Bouman D, Shewchuk AB, Laskin C, Squire JA. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. *Hum Reprod* 2000;15:2404–2410.
33. Kopeika J, Thornhill A, and Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. 2014; *Human Reproduction Update*, Vol.0, No.0 pp. 1–19.
34. Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril* 2012;98:368–377.