

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**Máster Universitario en Biología y  
Tecnología de la Reproducción**

**“Sincronización materno - embrionaria  
en criotransferencias”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Autor:** Juan Antonio López Ayala

**Tutor:** Abel Gayo Lana

Junio 2014

## ***AGRADECIMIENTOS***

Comencé dicho Máster como mero trámite para poder acceder a una futura Tesis Doctoral en el campo de la Investigación Biomédica, aunque finalmente el mundo de la Reproducción me ha apasionado más de lo que pensaba y actualmente me encantaría poder encaminar mi formación en la Medicina Reproductiva.

Quería dar las gracias al Dr. Abel Gayo Lana Director del laboratorio del Instituto de Reproducción Humana - FIV4 por el apoyo y la confianza depositada en mí que hizo posible despertarme el entusiasmo en el campo de la Reproducción Humana.

Al Dr. Ignacio Arnott por darme la oportunidad de aprender en este campo desde una visión más ginecológica.

Por supuesto agradecer el apoyo incondicional del gran equipo que forma FIV4 tanto a María Fernández como a María Tresguerres por ayudarme enormemente en la clínica tanto en las prácticas como en el TFM, así como, por su gran cercanía y simpatía que me han demostrado haciéndome sentir “como en casa” desde el primer día. Por supuesto a Susana por su extrema humildad y alegría que trasmite tanto al equipo como a los clientes de la clínica.

Al Dr. Manuel Sánchez del departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo por dedicar su tiempo en enseñarme a realizar los análisis estadísticos del trabajo.

A las grandes personas que he conocido este año en clase como son: Paula, Natalia, María Jesús, Beatriz y Mariela entre otros por hacerme pasar buenos momentos, esperando que esto solo sea un comienzo.

Y por último y no menos importante, dar las gracias a mi hermana Virtudes, a mi padre Antonio, a mi cuñado Alex, a mi abuela Antonia, a mi abuelo Sebastián, a mi tía María, a mi tío Joaquín, a mis amigos Pablo, Óscar, Virginia, Natalia, Daniel, Andrea y sobre todo a mi madre Juana y a Agustín quienes hacen lo posible por completar mi formación, dándome el apoyo y la fuerza para luchar por mis sueños.



## ***ABREVIATURAS***

**AAS** = Ácido acetilsalicílico.

**AMH** = *Anti-Müller-Hormon* (Hormona Anti-Mülleriana).

**ARNm** = Ácido ribonucleico mensajero.

**ASEBIR** = Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción.

**CP** = Corpúsculo polar.

**CSF-1** = *Colony Stimulating Factor 1* (Factor Estimulando de Colonias 1).

**D+1-D+6** = Día 1 tras ICSI – Día 6 tras ICSI.

**DET** = *Double Embryo Transfer* (Transferencia Doble Embrionaria).

**DGP** = Diagnóstica Genético Preimplantacional.

**DMSO** = Dimetil sulfoxido.

**E<sub>2</sub>** = Estradiol.

**EGF** = *Epidermal Growth Factor* (Factor de Crecimiento Epidérmico).

**EOC** = Estimulación Ovárica Controlada.

**EOD** = Esterilidad de Origen Desconocido.

**ERA** = *Endometrial Receptivity Assay* (Test de Receptividad Endometrial).

**ESHRE** = *European Society of Human Reproduction and Embryology* (Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología).

**FISH** = *Fluorescence In Situ Hybridization* (Hibridación In Situ Fluorescente)

**FIV** = Fecundación *In Vitro*.

**FSH** = *Follicle-Stimulating Hormone* (Hormona Estimuladora del Folículo).

**G-CSF** = *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos).

**GnRH** = *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Hormona liberadora de Gonadotropinas).

**HB-EGF** = *Heparin-Binding EGF-like growth factor* (Factor de Crecimiento Semejante a EGF unido a Heparina).

**hCG** = *human Chorionic Gonadotropin* (Gonadotropina Coriónica humana).

**ICSI** = *Intracytoplasmic Sperm Injection* (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides).

**IGF** = *Insulin-like Growth Factor* (Factor de Crecimiento Insulínico).

**IL** = Interleucina.

**LH** = *Luteinizing Hormone* (Hormona Luteinizante).

**LH+7** = día 7 tras el pico de LH.

**LIF** = *Leukemia Inhibitory Factor* (Factor Inhibidor de la Leucemia).

**MCI** = Masa Celular Interna.

**MUC-1** = Mucina 1 asociada a membrana.

**OMS** = Organización Mundial de la Salud.

**P<sub>4</sub>** = Progesterona.

**P+5** = día 5 de administración de progesterona.

**PCR** = *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

**pET** = *personalized Embryo Transfer* (Transferencia Embrionaria personalizada).

**PN** = Pronúcleo.

**POR** = Pobre Respondedora.

**RFA** = Recuento de Folículos Antrales.

**SET** = *Single Embryo Transfer* (Transferencia de Embrión Único).

**SGP** = *Screening* Genético Preimplantacional.

**SHEO** = Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.

**SOP** = Síndrome del Ovario Poliquístico.

**TE** = Trofoectodermo.

**TRA** = Técnicas de Reproducción Asistida.

**UI** = Unidades Internacionales.

**VEGF** = *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular).

**VEGFR-2** = *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (Receptor 2 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular).

**ZP** = Zona Pelúcida.

## ***ÍNDICE***

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA</b> .....	2
<b>1.2. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES</b> .....	3
<b>1.2.1 Causas de la crioconservación de embriones</b> .....	6
1.2.1.1. Cancelación del ciclo por mala preparación endometrial.....	6
1.2.1.2. Riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHEO).....	7
1.2.1.3. Acumulación de embriones en mujeres pobres respondedoras (POR).....	9
1.2.1.4. Transferencia de embrión único o <i>Single Embryo Transfer</i> (SET).....	10
1.2.1.5. Para diagnóstico o cribado genético preimplantacional.....	11
<b>1.3. PREPARACIÓN ENDOMETRIAL PARA EMBRIONES CRIOCONSERVADOS</b> .....	11
<b>1.3.1. Ciclo natural</b> .....	12
<b>1.3.2. Ciclo natural modificado</b> .....	13
<b>1.3.3. Ciclo artificial u hormonalmente manipulado</b> .....	14
<b>1.3.4. Ciclo artificial con agonista de GnRH</b> .....	16
<b>1.4. SINCRONIZACIÓN MATERNO-EMBRIONARIA EN CRIOTRANSFERENCIAS</b> .....	17
<b>1.4.1. El papel del endometrio: La “ventana de implantación”</b> .....	18
1.4.1.2. Importancia de la progesterona en el proceso de implantación .....	19
1.4.1.3. Endometrial Receptivity Array (ERA) .....	20
<b>1.4.2. El papel del embrión</b> .....	21
1.4.2.1. La calidad embrionaria .....	22
1.4.2.2. Tiempo de cultivo embrionario tras descongelación.....	25
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	30
<b>3.1. TIPO DE ESTUDIO</b> .....	31
<b>3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO</b> .....	31
<b>3.3. PROTOCOLOS DE EOC</b> .....	31
<b>3.4. PUNCIÓN FOLICULAR: RECUPERACIÓN DE OVOCITOS</b> .....	32
<b>3.5. PROTOCOLO DE LABORATORIO</b> .....	32
<b>3.6. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES</b> .....	33
<b>3.7. PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN ENDOMETRIAL</b> .....	34

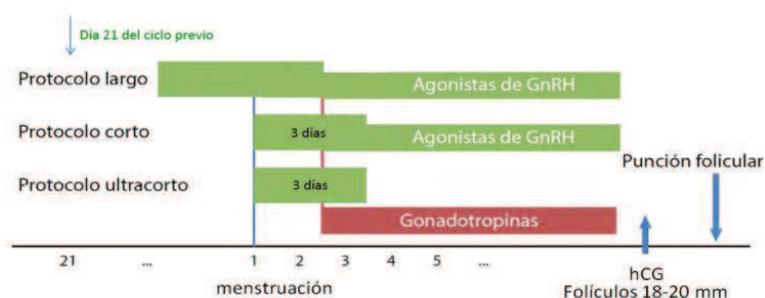
3.8.	DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES CRIOCONSERVADOS .....	35
3.9.	CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIONES DESCONGELADOS .....	36
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	37
4.	RESULTADOS.....	38
4.1.	Características de la muestra .....	39
4.2.	Efecto entre el tipo de preparación endometrial y la tasa de embarazo.....	41
4.3.	Efecto entre el tiempo de administración de progesterona y la tasa de embarazo	41
4.4.	Efecto entre el tiempo de cultivo postdescongelación y la tasa de embarazo .....	42
4.5.	Efecto entre la actividad mitótica en cultivo postdescongelación y la tasa de embarazo .....	43
4.6.	Efecto entre el estadio embrionario y la tasa de embarazo .....	44
4.7.	Relación entre la calidad embrionaria.....	46
5.	DISCUSIÓN .....	47
6.	CONCLUSIONES .....	55
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	57

## ***1. INTRODUCCIÓN***

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el término infertilidad como la incapacidad de conseguir un embarazo o que éste no llegue a término, en aquellas parejas que lleven más de un año manteniendo relaciones coitales sin medidas anticonceptivas. Actualmente la infertilidad es reconocida como una enfermedad del sistema reproductor afectando entre un 10-15 % de las parejas en edad fértil, cuya tendencia va en aumento (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Gracias a las técnicas de reproducción asistida (TRA) ayuda a disminuir esas “barreras” en parejas con problemas de infertilidad.

### 1.1. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA.

El método estándar de fertilización in vitro / inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV/ICSI) es llevado a cabo mediante estimulación ovárica controlada (EOC) para producir el crecimiento y desarrollo de múltiples folículos utilizando gonadotropinas a menudo combinado con agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para frenar la hipófisis, de forma que permite iniciar el estímulo con el ovario en reposo evitando el pico endógeno de LH. En los EOC puede realizarse siguiendo protocolos con empleo de agonistas (protocolo largo) o antagonistas (protocolo corto), siendo estos últimos los más empleados.

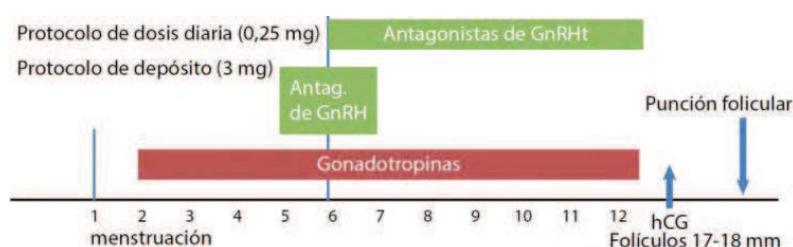


**Figura 1.1.** Empleo de antagonistas de GnRH según protocolo de dosis diaria de 0.25 mg o protocolo de depósito de 3 mg (Tomado de Escudero Velando LE. Rev peru ginecol. obstet. 2012; 58 (3): 191-200).

En el protocolo de antagonistas de la GnRH la estimulación comienza con el uso de gonadotropinas, entre 150-300 UI/ día por vía subcutánea, en el segundo o tercer día de la menstruación (Fig. 1.1). La administración de los antagonistas de la GnRH con el fin de evitar el pico endógeno prematuro de LH, se suele aplicar una dosis diaria de 0.25 mg de antagonista a partir del sexto día de estimulación hasta el momento de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Esta hormona se aplica una vez visualizados

fóliculos de un diámetro comprendido entre 17 y 18 mm y 36 horas más tarde, ya se puede realizar la punción de los folículos maduros.

El empleo de agonistas puede realizarse en protocolos de estimulación largo, corto o ultracorto (Fig. 1.2). El más empleado es el protocolo largo, en el que la administración de los agonistas de GnRH se hace en la fase lútea tardía (días 21-22) del ciclo previo. La estimulación con gonadotropinas tiene lugar en el segundo o tercer día de la menstruación hasta la visualización de folículos con un diámetro aproximado de 18 mm, momento en el que se desencadena la ovulación con hCG y 36 horas más tarde, se realiza la punción folicular.



**Figura 1.2.** Empleo de agonistas de GnRH en los protocolos largo, corto y ultracorto (Tomado de Escudero Velando LE. Rev peru ginecol. obstet. 2012; 58 (3): 191-200).

## 1.2. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES.

La crioconservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido, para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poder conservarlo en un estado de viabilidad del que podrá ser recuperado. A esa temperatura cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan detenidas. Esto ha permitido la transferencia de un número limitado de embriones y el almacenamiento de aquellos restantes para uso futuro, maximizando así la eficacia acumulativa de un ciclo de FIV. Las dos grandes técnicas de crioconservación utilizadas en las clínicas de reproducción son la vitrificación y la congelación lenta (Tabla 1.1).

La supervivencia después de la crioconservación pretende impedir aquellos efectos deletéreos del procedimiento que son evitar la formación de cristales de hielo intracelular, mediante la deshidratación celular, así como prevenir efectos tóxicos de los agentes crioprotectores que permiten el equilibrio osmótico.

**Tabla 1.1.** Tabla de las principales características comparativas entre ambas técnicas de crioconservación (Edgar y Gook, 2012).

Congelación lenta vs Vitricación	
Congelación lenta	Vitricación
Baja concentración de crioprotectores	Alta concentración de crioprotectores
Tasas de congelación lentas y controladas (-0.1;-0.5 °C /min)	Tasas de congelación muy altas (>-20.000 °C /min)
Deshidratación celular lenta: posible formación de cristales	No formación de cristales: no daño
Requiere de un congelador programable	No necesita equipamiento
Consume más tiempo: 2 horas	Pocos minutos

En la congelación lenta se produce una rampa de congelación en un equipo programable pasando de -7 °C a -30 °C y después de -150 °C a -196 °C en nitrógeno líquido a una tasa de congelación de -0.5 °C/ min para minimizar la formación de hielo. La vitricación en cambio se produce una solidificación intracelular por la extrema viscosidad del medio que se enfría a velocidades muy elevadas, cuya tasa de congelación ocurre a > -20.000 °C /min, evitando la formación de cristales de hielo.

En la vitricación deben de acortarse los tiempos de exposición, ya que se utilizan concentraciones muy elevadas de los medios crioprotectores permeables que podrían producir un efecto tóxico. Los crioprotectores más usados en la vitricación de embriones humanos son aquellos permeables como el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol. Además existen algunos crioprotectores no permeables como la sacarosa que no son tóxicos para los embriones.

La vitricación actualmente se asocia con mayores tasas de supervivencia y desarrollo embrionario, aunque en aquellos laboratorios que llevan a cabo un óptimo sistema de congelación lenta modificado parece ser que se están alcanzando resultados comparables. (Edgar y Gook, 2012).

Entre los tipos de embriones que se pueden crioconservar se encuentran aquellos que se encuentran en estadio pronuclear o cigotos (D+1), embriones en estadio de división (D+2 y D+3) y blastocistos (D+5 y D+6). Aunque actualmente la mayoría de laboratorios de embriología congelan embriones en estadio de división y blastocistos, ya que en ellos se

pueden llevar a cabo un cribaje o valoración de la calidad relacionado con la probabilidad que tengan de implantación. En la crioconservación, siempre que sea posible, congelaremos aquellos embriones sobrantes de mejor calidad (A, B, C) una vez hayan sido transferidos en fresco los mejores.

En la descongelación tanto embrionaria como ovocitaria, es conveniente un periodo de incubación mínimo de entre 2-5 horas antes de su posterior transferencia, para que se reorganicen (repolimericen) los microtúbulos, entre otros procesos bioquímicos (Ciotti *et al.*, 2009).

Las tasas de supervivencia ( $\geq 50\%$  blastómeras intactas) de embriones en estadio de división con la vitrificación es de  $\geq 90\%$ , de las cuales, más del 70 % presentan blastómeras sin lizar. En cambio las tasas de supervivencia en embriones en estadio de división son entorno al 70-80 % utilizando el método convencional de congelación lenta. Los mismos resultados se presentan tanto en vitrificación como en congelación lenta en embriones en estadio de blastocisto. Aunque actualmente existen resultados equivalentes entre ambas técnicas utilizadas debido a la modificación de protocolos de congelación lenta. Existe evidencia que los embriones tanto en estadio de división como blastocistos que sobreviven a la crioconservación, presentan un potencial de implantación similar a los embriones frescos (Edgar y Gook, 2012).

La crioconservación de embriones es un procedimiento bien establecido que puede ser utilizado para preservar la fertilidad en las mujeres en edad reproductiva que tengan pareja o recurran a semen de donante. Entre los motivos de preservación de la fertilidad pueden deberse por causas médicas oncológicas (cirugía, pretratamiento radioterápico o quimioterápico), médicas no oncológicas como enfermedades autoinmunes, hematológicas y sistémicas candidatas a tratamientos gonadotóxicos y por motivos sociales como medida preventiva en mujeres que quieren retrasar su maternidad.

Actualmente la crioconservación de embriones debe ser ofrecido cómo método de preservación de la fertilidad ya que, las tasas de éxito son cada vez más mayores que la vitrificación de ovocitos (Donnez y Dolmans, 2013).

Según la ley española 14/ 2006 sobre TRA los diferentes destinos posibles que podrán darse a los embriones crioconservados (art. 11.4) son: a) su utilización por la propia mujer o

pareja; b) la donación con fines reproductivos; c) la donación con fines de investigación; d) el cese de su conservación sin otra utilización. No obstante, la Ley reserva esta última opción para los casos en que, finalizado el plazo de crioconservación, no se haya optado por alguno de los destinos mencionados en los apartados anteriores (Germán Zurriarain, 2009).

### **1.2.1. Causas de la crioconservación de embriones:**

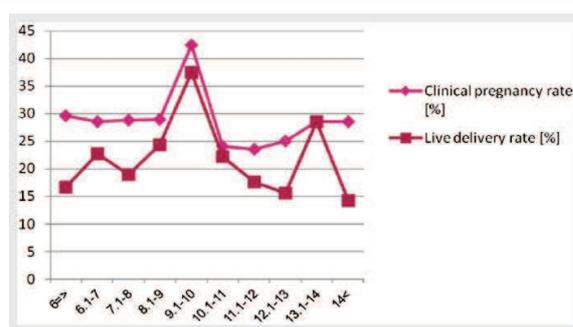
#### *1.2.1.1. Cancelación del ciclo por mala preparación endometrial.*

El desarrollo madurativo del endometrio es esencial para la implantación del embrión y el crecimiento posterior. La proliferación y diferenciación adecuada durante la fase proliferativa se siguen por cambios secretores durante la fase lútea, con decidualización del estroma endometrial.

La evaluación ecográfica del endometrio, debido a su exactitud y no invasividad, se ha convertido en el estándar para valorar dicho engrosamiento antes de realizar la transferencia embrionaria. El patrón trilaminar endometrial considerado como óptimo para la implantación es de entre 9-10 mm de grosor (Figura 1.3). Aunque en un estudio reciente no se encontró diferencia estadísticamente significativa en las tasas de nacidos vivos en los ciclos con el grosor endometrial <6 mm en comparación con aquellos con espesor > 6 mm (Dain *et al.*, 2013).

Por el contrario, cuando se detecta una línea endometrial fina, < 6 mm, se suelen obtener tasas de embarazo más bajas, reflejando una posible desventaja al mantener el embarazo. Aunque un endometrio demasiado engrosado (> 14 mm) también parece afectar a las tasas de embarazo, pudiendo ser debido a un mayor daño mecánico a la hora de la transferencia embrionaria. En casos de endometrios muy finos, es posible que sea necesario retrasar la transferencia hasta que se consiga un grosor endometrial más favorable (Dain *et al.*, 2013).

Posibles soluciones se han llevado a cabo como terapias con estrógenos más prolongados, el consumo de ácido acetilsalicílico (AAS), vitamina E, sildenafil o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), entre otros. Sin embargo, a pesar de que en algunos casos se obtuvieron buenos resultados, actualmente no existe un protocolo estándar aceptado para su aplicación en estos casos (Lebovitz y Orvieto, 2014).



**Figura 1.3.** Tasas de embarazo clínico y nacidos vivos relacionado con el engrosamiento endometrial (Tomado de Dain *et al.*, Fertil Steril 2013. 100: 1289–95).

#### 1.2.1.2. Riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHEO).

El SHEO es una complicación iatrogénica potencialmente grave que afecta a las mujeres sometidas a estimulación ovárica para el tratamiento de la infertilidad ocurriendo durante la fase luteínica o durante el embarazo temprano. La mayoría de los casos de SHEO se han asociado con el uso de gonadotropinas para la inducción de la ovulación en mujeres anovuladoras o, más importante, por la estimulación ovárica controlada en TRA.

Esta complicación se divide en varios estadios en función de la gravedad del cuadro clínico que presente, que son: leve, moderado, severo y grave. La prevalencia de éste exceso de respuesta ovárica tras tratamiento varía entre el 3 % y el 6 % en SHEO moderado y entre un 0.1 % y el 2 % en SHEO grave. Una forma leve de SHEO se ha reportado entre un 20 - 23 % en los casos de FIV. La tasa de mortalidad con los tratamientos de EOC es muy baja estimándose en 6/ 100.000 ciclos, documentándose al menos 6 complicaciones letales en TRA (Braat *et al.*, 2010).

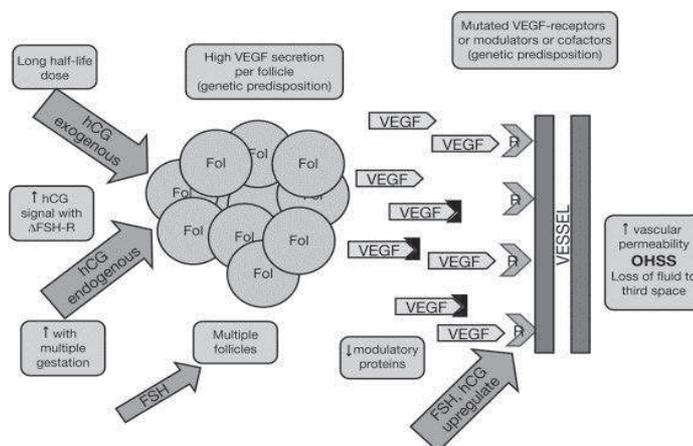
Por otra parte, una distinción se puede hacer entre una forma temprana y tardía del SHEO. El SHEO temprano es causada por la administración de hCG exógena, mientras que el SHEO tardío es el resultado de la liberación endógena de hCG en caso de embarazo, siendo ésta más probable de desencadenar un problema aún más grave (Fiedler y Ezcurra, 2012).

Se caracteriza por una ampliación quística de los ovarios y un movimiento agudo de fluidos desde el espacio intravascular hacia el tercer espacio (intersticial) pudiendo originar problemas como ascitis, distrés respiratorio, extravasación pleural, edema pericárdico, tromboembolismo, insuficiencia renal o incluso la muerte, como resultado de la

hemoconcentración y la reducción de la perfusión de órganos vitales como son los riñones, el corazón y el cerebro (Saha *et al.*, 2013).

La hCG estimula un alto número de células de la granulosa durante la fase luteínica que conduce a una alta producción de *ARNm* del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*). Altas cantidades de *VEGF* son producidas y liberadas de las células de la granulosa uniéndose al receptor de *VEGF-2* (*VEGFR-2*) en las membranas de las células endoteliales, la cual, produce un aumento de la permeabilidad vascular y extravasación de líquido y proteínas al tercer espacio (Figura 1.4).

La crioconservación de embriones no evita que se produzca el SHEO temprana pero puede evitar el desarrollo tardío del síndrome y el posible agravamiento, al evitar la producción de hCG endógena en el embarazo (Vloeberghs *et al.*, 2009). Los embriones crioconservados se transfieren en un ciclo posterior no estimulado, evitando así la exposición excesiva de hCG y cuyas tasas de embarazo son similares a los alcanzados en ciclos en fresco (Fiedler y Ezcurra, 2012).



**Figura 1.4.** Patogénesis del síndrome de hiperestimulación ovárica. (Tomado de Humaidan *et al.* Fertil Steril. 2010; 94(2):389-400).

El mecanismo de cómo la hCG puede aumentar la permeabilidad vascular en mujeres con ovarios estimulados con gonadotropinas todavía está en duda y se han propuesto diferentes agentes, tales como los estrógenos, progesterona, interleucinas (IL-2, -6, -8, -10 y -18), VEGF, angiogenina, endotelina, prostaglandinas, histamina, prolactina, el sistema renina-angiotensina y cininas. Sin embargo, VEGF ha sido identificado como el principal mediador (Fiedler y Ezcurra, 2012).

1.2.1.3. Acumulación de embriones en mujeres pobres respondedoras (POR).

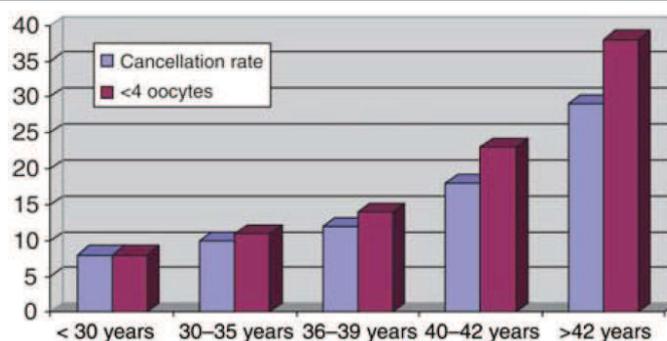
El objetivo de la EOC en la FIV es el reclutamiento de múltiples folículos en un esfuerzo por compensar las ineficiencias del cultivo embriológico, la selección de embriones para la transferencia y la posterior implantación. Por lo tanto, una mala respuesta a la EOC indica una reducción en la respuesta folicular, dando lugar, a un número reducido de ovocitos recuperados. La crioconservación de embriones en mujeres POR se podría utilizar para generar un mayor número de embriones en el laboratorio tras un segundo ciclo de EOC, aumentando el número de embriones a transferir.

Ha existido múltiples definiciones con respecto a este concepto, hasta que la *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) para estandarizar la definición de una manera simple y reproducible, estableció unos criterios mínimos en un consenso llevado a cabo en Bolonia (Ferraretti *et al.*, 2011).

Al menos dos de las tres características deben de estar presentes:

1. Edad materna avanzada ( $\geq 40$  años) o algún otro factor de riesgo para pobre respuesta.
2. Una pobre respuesta previa ( $\leq 3$  ovocitos con un protocolo de EOC convencional).
3. Un test de reserva ovárica anormal (es decir, recuento de folículos antrales (RFA)  $< 5-7$  folículos u hormona anti-Mülleriana (AMH)  $< 0.5- 1.1$  ng/ ml).

En esta definición la edad es el mayor criterio, ya que es ampliamente aceptado que la pobre respuesta puede ser una señal temprana de envejecimiento ovárico y disminución de dicha reserva (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Relación entre la edad y la pobre respuesta. Pacientes sometidas a protocolos convencionales de estimulación ovárica con diferentes dosis iniciales de FSH/ HMG dependiendo de la edad (Tomada de Ferraretti *et al.*, Human Reproduction 2010; 26 (7): 1616–24).

#### 1.2.1.4. Transferencia de embrión único o Single Embryo Transfer (SET).

La complicación más común de las TRA es el embarazo múltiple. Esto causa una serie de riesgos para la salud tanto de la madre (como diabetes gestacional y presión arterial alta) como para sus hijos (destacando el parto prematuro, bajo peso al nacer, parálisis cerebral y muerte perinatal). Siendo dichos riesgos mucho mayor que los nacimientos de un único hijo. En el año 2006, los gemelos resultantes de TRA representaban casi el 20 % de todos los nacimientos vivos en Europa.

Actualmente la SET se está considerando seriamente con el fin de reducir los embarazos múltiples. Sin embargo, esto debe equilibrarse contra el riesgo de poner en peligro la tasa global de nacidos vivos. Por eso se evaluó en una revisión Crochane (Pandian *et al.*, 2013) que en un solo ciclo de FIV en fresco la SET se asocia con una tasa de nacidos vivos menor que la transferencia de dos embriones (DET), como era de esperar. Sugiriendo que la DET tiene la probabilidad del 40 % de nacidos vivos a diferencia de entre un 22 % y un 30 % en SET. Aunque la DET presenta un riesgo de embarazo múltiple del 15 % frente a 1- 4 % de la SET. La tasa de nacidos vivos fue dos veces mayor en el grupo DET, pero las probabilidades de embarazo múltiple fueron siete veces mayor.

Finalmente se evidenció que la tasa acumulativa de transferencias repetidas de embriones en estadio de división eran muy semejantes, sugiriendo que se puede minimizar el riesgo de embarazo múltiple (15 % en DET frente a 0- 2% en SET) en parejas sometidas a TRA sin reducir sustancialmente la probabilidad de lograr un nacimiento vivo (40 % DET frente 30- 42% en SET). Estableciéndose que el objetivo primordial en las técnicas de FIV es el nacimiento a término de un niño sano en casa (Braude, 2013).

Una vez comprendido el riesgo que supone la transferencia de más de un embrión en un mismo ciclo, deberemos de seleccionar el mejor embrión a transferir. Para ello tendremos en cuenta una serie de factores que nos faciliten la valoración de un embrión óptimo capaz de dar lugar a un niño vivo sano, que son: el estadio del embrión a transferir, la calidad embrionaria, la efectividad de la crioconservación y un cribado o *screening* genético preimplantacional (Braude, 2013).

#### 1.2.1.5. Para diagnóstico o cribado genético preimplantacional.

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es utilizado para analizar los embriones genéticamente antes de su transferencia al útero. Se ofrece a las parejas en riesgo portadores de alguna alteración genética hereditaria con la oportunidad de tener un niño afectado, sin hacer frente a la interrupción del embarazo.

En el caso de parejas infértiles se puede llevar a cabo el cribado o *Screening* genético preimplantacional (SGP) cuyo objetivo es lograr el nacimiento de un niño. El SGP esta indicado en mujeres con edad materna avanzada, en fallos de implantación repetida, en abortos de repetición y factor severo masculino, cuyos padres presentan un cariotipo normal en busca de posibles aneuploidias (Harper y Sengupta, 2012).

El análisis genético se lleva a cabo en uno o dos blastómeros, por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el diagnóstico citogenético, o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico molecular. Los resultados de la biopsia se pueden presentar en tan sólo 4 horas, pero dado que la mayoría de programas de FIV no tienen sus propios laboratorios de genética, necesitan de 2 a 3 días para realizar el análisis. Pero debido a la alta disponibilidad de vitrificación, una vez conocido el diagnóstico se podrá hacer la transferencia tras una preparación endometrial posterior (Scott *et al.*, 2013).

### 1.3. PREPARACIÓN ENDOMETRIAL PARA EMBRIONES CRIOCONSERVADOS.

En los últimos años el número de ciclos de preparación endometrial de embriones descongelados han incrementado debido a que se transfieren menos embriones frescos para disminuir los embarazos múltiples y a la mejora de las técnicas en crioconservación (Min *et al.*, 2010). Por otra parte, la crioconservación de embriones después de la FIV es una forma

segura y rentable para aumentar las tasas de embarazo acumulativos por la recuperación de ovocitos (Ghobara y Vandekerckhove, 2008).

La implantación y el establecimiento de embarazo dependen de las interacciones entre el desarrollo del embrión y la receptividad del endometrio (Nardo *et al.*, 2003). El éxito de la transferencia de embriones crioconservados es dependiente de que el endometrio sea receptivo a los embriones que han sido creados en un ciclo previo de EOC.

Los protocolos establecidos son más simples y económicos que los empleados para la EOC, cuyo objetivo es preparar el endometrio para recibir la transferencia de uno o más embriones descongelados. Aunque actualmente hay poco consenso sobre el mejor método para la preparación endometrial en mujeres ovuladoras (Ghobara y Vandekerckhove, 2008). Para ello, existen 4 métodos diferentes establecidos que son: ciclo natural, natural modificado, artificial u hormonalmente manipulado y artificial con pre-tratamiento agonista de GnRH.

#### **1.3.1. Ciclo natural:**

El primer nacimiento reportado por Trounson y Mohr en 1983 de un embrión crioconservado se obtuvo a partir de este tipo de preparación endometrial en un embrión en estadio de división utilizando la técnica de congelación lenta (Gelbaya *et al.*, 2006).

Este tipo de preparación endometrial ocurre por la producción endógena de esteroides sexuales a partir de un folículo en desarrollo. El momento de la transferencia de embriones se determina detectando el pico espontáneo de LH, que precede a la ovulación, para iniciar la luteinización. Este tipo de preparación sólo se puede llevar a cabo en mujeres con ciclos regulares.

Las tasas de embarazo en ciclo natural dependen estrechamente de la identificación oportuna de la ovulación y del cálculo óptimo de receptividad endometrial. La descongelación y la transferencia se debe de realizar durante este período, cuando se establece la “ventana de implantación”, poco después de la ovulación. Si un embrión se transfiere dentro de esta ventana, las posibilidades de concebir aumentan.

Los niveles de LH deben ser monitorizados regularmente en suero de sangre periférica o en la orina. Para poder evaluar los niveles de LH correctamente antes de la

ovulación, la determinación se debe de realizar al menos 4 días antes de dicha ovulación mediante la monitorización cada 12 o 24 h. Cuando se observa un aumento en los niveles séricos de LH, se estipula que la ovulación se producirá 36-40 h más tarde. Sin embargo, la medición de LH en orina presenta varios problemas, en tanto que el pico de LH se retrasa hasta 21 h tras la aparición de la oleada de LH en sangre, debiéndose de tener en cuenta en la interpretación, como que la detección de la oleada de LH espontánea varía en el tiempo entre ciclos y entre los pacientes.

Además los kits de LH en orina tienen una gran variación en los umbrales, el cual implica el riesgo de hasta el 30 % de las pruebas de falsos negativos, y son a menudo reportados por los pacientes como difícil de interpretar (Park *et al.*, 2007).

La administración de progesterona, antes y después de la transferencia, no suele ser requerido, aunque existen estudios que sugieren el uso de soporte de progesterona para mejorar la tasa de nacidos vivos en ciclos naturales (Bjuresten *et al.*, 2011).

Este tipo de preparación no puede ser usado en mujeres con irregularidad menstrual, en ciclos irregulares, en mujeres anovuladoras o en aquellas que presenten síndrome del ovario poliquístico (SOP). No es la opción correcta cuando se desea un mayor control y flexibilidad temporal, ya que es más difícil de planificar que en ciclos artificiales. El tratamiento puede causar ansiedad en la paciente existiendo una tasa de cancelación entorno al 6 % debido a una insuficiencia en el desarrollo del folículo dominante y/o engrosamiento endometrial (< 7 mm).

La planificación en este ciclo conlleva el riesgo de ovulación inesperada y dificulta el tiempo oportuno para asegurar la descongelación y la transferencia del embrión, siendo en este caso, el tratamiento generalmente cancelado. Sin embargo, una clara ventaja en ciclos naturales es el hecho de que no requiere tomar medicamentos durante varias semanas.

### **1.3.2. Ciclo natural modificado:**

Este tipo de preparación no requiere la supervisión o la monitorización de LH, aunque es necesaria, la evaluación ecográfica regular del folículo dominante para asegurar el momento adecuado de la administración de hCG para inducir la ovulación. Se suele usar en pacientes con ovarios funcionales que presentan anovulación o ciclos irregulares.

Una vez que el folículo dominante alcanza un tamaño de unos 17-18 mm se administra la hCG para sustituir el pico endógeno de LH que desencadenará la maduración final de los ovocitos y la ovulación aproximadamente 36-38 h después. A pesar de la vigilancia ecográfica, también se puede producir ovulaciones espontáneas. En tal caso, el inicio de la “ventana de implantación” no se puede estimar con precisión. Para minimizar la cancelación, los pacientes están obligados a visitar su clínica en varias ocasiones siendo este procedimiento largo y costoso.

En ambos ciclos naturales, la descongelación y la transferencia del embrión se debe realizar 3-5 días después de la ovulación en función del estadio embrionario en que fue congelado (Groenewoud *et al.*, 2013).

### **1.3.3. Ciclo artificial u hormonalmente manipulado:**

En este tipo de ciclo sustituido se administra estrógenos y progesterona de manera exógena en un régimen secuencial cuyo objetivo es mimetizar la exposición endocrina del endometrio en el ciclo normal. Al principio se administra estradiol diariamente durante la fase folicular (2º - 3º día del ciclo) con el fin de provocar la proliferación y el crecimiento del endometrio, mientras que suprime el desarrollo del folículo dominante. Existe bastante flexibilidad en la duración del tratamiento con estrógenos, pudiendo variar entre 5 días hasta 6 semanas sin afectar a la posterior receptividad del endometrio o a las tasas de embarazo. Por convenio, se suele utilizar un tratamiento óptimo de unas dos semanas. Los estrógenos pueden ser administrados por varias vías como la oral, transdérmica, subcutánea o vaginal.

La vía de administración es variable, siendo la más usada la transdérmica, y los compuestos más utilizados son el Valerato de estradiol y las formulaciones de compuestos micronizados. En cuanto las dosis, variarán en función del facultativo, pudiendo ser secuenciales o de dosis fija.

La administración de estrógenos continúa hasta que el endometrio presenta un patrón trilaminar de unos 7 - 9 mm de espesor en la ecografía, momento en que se añade la administración de progesterona que será la encargada de convertir el endometrio proliferativo en un endometrio de tipo secretor, preparado para recibir el embrión. El tratamiento con progesterona exógena inicia la ventana de implantación, que durará entre 24 y 48 horas. Esta etapa de receptividad endometrial parece situarse entre 3 y 5 días

después de iniciar la exposición a la progesterona. Las vías de administración de la progesterona pueden ser tanto vaginal, rectal, nasal, intramuscular, oral o sublingual. Aunque la mejor ruta de administración tanto de los estrógenos como de la progesterona para la preparación endometrial de embriones crioconservados aún no es clara (El- Toukhy *et al.*, 2008).

La principal ventaja de este tratamiento es que requiere poca vigilancia por ecografía y por lo tanto es más fácilmente programada, depositando menos carga (*less time consuming*) tanto para los pacientes como a los médicos. Aunque también presenta desventajas como son posibles efectos secundarios y mayor riesgo de eventos tromboembólicos.

La planificación de la descongelación y transferencia del embrión es flexible y puede realizarse sobre la base de la conveniencia de la paciente, minimizando tanto el miedo como la ansiedad de la cancelación del ciclo. Además los centros son capaces de organizar su carga de trabajo semanal. Algunos autores afirman que la suplementación de estrógenos reduce las tasas de cancelación debido a la preparación óptima del endometrio, a diferencia de lo que puede ocurrir en algunos ciclos naturales.

El momento de la descongelación y posterior transferencia de embriones no se debe de realizar antes del día 3º o 4º día de tratamiento con progesterona (en el caso de un embrión en día 2 - 3) (Nawroth y Ludwig, 2005). Los niveles de estrógenos séricos no es un factor importante para decidir el momento de la transferencia embrionaria, pero sí, el nivel de progesterona sérica medida (< 10 ng/ ml) y una buena preparación endometrial adecuada es suficiente para iniciar dicha transferencia (El- Toukhy *et al.*, 2008). Además los altos niveles de estradiol podrían conducir a la alteración en las características del endometrio y el momento del cierre de la ventana de implantación.

Una vez realizada la transferencia embrionaria, la paciente deberá de seguir con el aporte exógeno de progesterona, si el test de embarazo es positivo ( $\beta$ hCG), hasta la semana 10-12 de gestación. A partir de este momento el aporte de progesterona será producido de forma endógena por la placenta del embrión.

#### 1.3.4. Ciclo artificial con agonista de GnRH:

Este tratamiento que fue desarrollado originalmente en programas de donación de ovocitos, también ha sido establecido para la transferencia de embriones crioconservados para superar aquellas desventajas que presentaban los ciclos naturales.

La administración de estrógeno y progesterona no garantiza la supresión pituitaria completa y podría desarrollarse un folículo dominante. En caso de que esto ocurriese, el folículo dominante se sometería a una luteinización espontánea (5 % de los casos) y el endometrio podría estar expuesto antes de tiempo a la progesterona.

Por esta razón el pre-tratamiento con el agonista de GnRH se usa para producir una baja regulación/desensibilización de la glándula pituitaria y así prevenir el crecimiento folicular. En este caso el agonista de GnRH más utilizado es una dosis de depósito (*depot*) que se administra en el día 21 de la fase lútea del ciclo anterior para lograr una correcta supresión del ovario.

Ambos ciclos artificiales requieren el uso de medicamentos y por lo tanto son menos "fisiológicos" aunque presentan la ventaja de que son más fáciles de planificar, por eso, son más empleados con frecuencia en las clínicas de reproducción.

Se ha observado que este tipo de preparación presenta menor tasa de cancelación a diferencia del ciclo natural (4.5 % frente a 17.4 %), debido al efecto preventivo de baja regulación con respecto a la luteinización y la ovulación. Además presenta la ventaja que disminuye la necesidad de monitorización tanto ecográfica como endocrina y facilita el control de la transferencia embrionaria.

La elección del tipo de preparación endometrial establecido para la transferencia de embriones crioconservados presenta tanto ventajas como inconvenientes (Tabla 1.2).

A pesar de ello, los mejores predictores de éxito establecidos para conseguir el embarazo son: presentar una buena calidad del embrión después de la descongelación y tener un patrón ecográfico trilaminar del endometrio (Zhu *et al.*, 2001).

**Tabla 1.2.** Ventajas e inconvenientes al utilizar un ciclo natural frente a un ciclo artificial para la preparación endometrial de embriones crioconservados.

Ciclo natural vs ciclo artificial	
Ciclo natural	Ciclo artificial
No requiere medicación	Requiere medicación
Frecuente control ecográfico	Poca vigilancia ecográfica
<i>“More time consuming”</i>	<i>“Less time consuming”</i>
Riesgo de ovulación inesperada	Ovulación inducida
Transferencia establecida	Flexibilidad para la transferencia
Mayor tasa de cancelación	Menor tasa de cancelación
Difícil de planificar	Más fácil de planificar
Más barato	Más caro

#### 1.4. SINCRONIZACIÓN MATERNO-EMBRIONARIA EN CRIOTRANSFERENCIAS.

El éxito de un programa de transferencia de embriones crioconservados está estrechamente relacionado con la sincronización exacta entre la maduración del endometrio y el desarrollo embrionario. Tal sincronización puede lograrse mediante un ciclo natural o tras la preparación artificial del endometrio con esteroides exógenos.

La implantación representa uno de los pasos primordiales para garantizar el cumplimiento de las TRA. Su eficacia se basa en tres parámetros principales: la calidad embrionaria, la receptividad endometrial y una sincronización embrión-endometrio. En aquellos casos que presentan fallos de implantación, la fuente principal se debe en gran medida al deterioro de dicha receptividad. La ventana de implantación es un período limitado en que el endometrio ha adquirido el estado morfológico y funcional para la fijación del blastocisto. Durante la apertura de la ventana de implantación, el endometrio se encuentra receptivo para poder llevar a cabo la concepción. Dicha receptividad endometrial podría estar alterada debido a los niveles suprafisiológicos de estradiol y  $P_4$  que se producen en ciclos de EOC. Esto podría conducir cambios bioquímicos y morfológicos en el endometrio, así como, una posible “luteinización precoz”.

Las mayores tasas de embarazo en TRA se obtienen en ciclos de donación de ovocitos ( $\geq 50\%$ ), mediante preparación endometrial hormonal con estradiol y  $P_4$  evitando sufrir la exposición de aquellos niveles suprafisiológicos tal y como ocurre en ciclos de EOC. Hay

evidencia que muestra que los niveles altos de estradiol (> 2500 pg / ml) pueden perjudicar la maduración del endometrio y posterior implantación embrionaria. Por ello un reciente meta-análisis reportó que el uso de transferencias de embriones crioconservados (tras una adecuada preparación endometrial) en comparación con las transferencias de embriones frescos bajo EOC, aumenta significativamente las tasas de embarazo clínico y en curso, en pacientes sometidos a TRA. Se consigue una mejor receptividad uterina durante los ciclos naturales o con terapia de reemplazo hormonal exógena en comparación con ciclos estimulados al mejorar la sincronía embrión- endometrio (Roque *et al.*, 2013).

#### **1.4.1. El papel del endometrio: La “ventana de implantación”.**

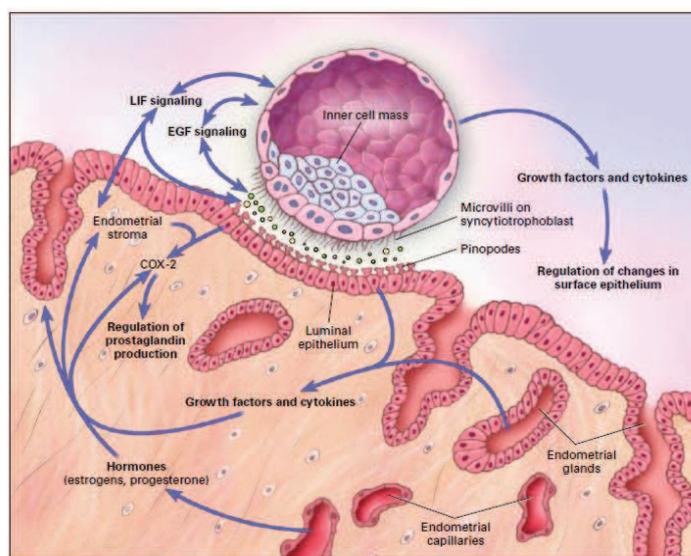
La implantación es un fenómeno que implica una interacción sincronizada entre el embrión y el endometrio materno. La implantación consta de dos periodos: un primer periodo preimplantatorio que implica tanto la preparación endometrial en un estado “receptivo” como el desarrollo del embrión en estadio de blastocisto, y un segundo periodo implantario que consta de 3 fases consecutivas de interacción entre el embrión y el endometrio que se definen como: aposición, adhesión e invasión.

La preparación del endometrio se produce inicialmente con la proliferación de la capa funcional de la mucosa uterina en respuesta a los estrógenos producidos por las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. Una vez alcanza la fase secretora, el endometrio pasa de un epitelio proliferativo (8-12 mm de grosor) a un epitelio de tipo secretor siendo la progesterona producida por el cuerpo lúteo la responsable de este proceso. Durante esta etapa el estroma endometrial se vuelve más edematoso, aumenta tanto la vascularización como el crecimiento de las glándulas para potenciar las secreciones.

El endometrio es receptivo a la implantación del blastocisto sólo durante un corto tiempo en la fase lútea, que comienza aproximadamente siete días después de la ovulación y dura no más de dos días (24-48 h). Esto se reconoce como la “ventana de implantación” que puede ser definida como el periodo de máxima receptividad uterina para la implantación (Lindhard *et al.*, 2002). Se cree que el momento de máxima receptividad endometrial sucede entre los días 20-24 del ciclo, y se manifiesta por la expresión de péptidos y proteínas que pueden servir como marcadores biológicos de receptividad uterina. Para ello, el endometrio sufre una transformación de las células del estroma conocido como decidualización,

favoreciendo el desarrollo glandular y la acumulación de lípidos y glucógeno. Además se produce la formación de pinópodos que son pequeñas protuberancias de la membrana con forma digital que solo están presentes durante el corto periodo de la “ventana de implantación” concretamente durante los días 20 y 21 del ciclo natural, siendo dependientes de progesterona. Los pinópodos absorben parte del fluido y macromoléculas presentes en la cavidad uterina, lo que favorece la adherencia del blastocisto (Quinn y Casper, 2009).

Para que se produzca la implantación el blastocisto tiene que salir de la ZP a la luz endometrial a través de un proceso llamado “hatching” o eclosión. La interacción entre el embrión y el endometrio se caracteriza por un diálogo molecular, con la participación de citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y moléculas de adhesión celular, que pueden funcionar como marcadores bioquímicos de receptividad endometrial (Figura 1.6). Existe una regulación hormonal, paracrina y autocrina materno-embionaria destacando entre estos factores MUC-1, LIF, CSF-1, IL-1, IL-11, EGF, glicodelina, integrinas, IGF, prostaglandinas y HB-EGF, entre otros (Dimitriadis *et al.*, 2010).



**Figura 1.6.** Factores hormonales, paracrinos y autocrinos implicados durante el proceso de implantación entre el endometrio y el embrión (Tomado de Norwitz y Schust. *N Engl J Med.* 2001; 345(19): 1400-8).

#### 1.4.1.2. Importancia de la progesterona en el proceso de implantación.

La receptividad endometrial está estrechamente vinculada al medio hormonal presente en el momento de la transferencia embrionaria en un ciclo de FIV. Como ya se

comentó, durante el tratamiento de EOC, el desarrollo folicular excesivo y las concentraciones séricas suprafiológicas de estradiol pueden conducir a un aumento prematuro de  $P_4$  en la fase folicular tardía, dando lugar a una asincronía asociado con fallo de implantación. Dicha “luteinización prematura” se refiere a un aumento de los niveles séricos de  $P_4$  en el mismo día o antes de la administración de hCG, reportándose en torno al 35-38 % tanto en protocolos de EOC con agonistas como con antagonistas de la GnRH. Esto puede deberse a una supresión pituitaria incompleta o tras la administración de hCG, dando lugar al incremento prematuro o excesivo de LH.

La elevación de los niveles de  $P_4$  obtenidos tanto el día de la administración de hCG como en el día de la recuperación de ovocitos afecta negativamente a la tasa de implantación y de embarazo, debido al efecto perjudicial que produce en la receptividad endometrial (Wu *et al.*, 2012). En cambio no se han observado efectos adversos en el ovocito ni en la calidad del embrión. Su aparición parece estar directamente relacionada con la dosis total de FSH utilizada durante la EOC, concentración de estradiol alto y el número de ovocitos obtenidos, pudiendo ser originado por la proliferación excesiva de células de la granulosa independientemente de la exposición de LH (Bosch *et al.*, 2010).

El umbral de elevación de la  $P_4$  preovulatoria es de 0.9-1.2 ng/ml, siendo deletéreos aquellos niveles séricos  $> 1.5$  ng/ ml (Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013). En el único estudio que evalúa la  $P_4$  el mismo día de la captación ovocitaria establece que los niveles de  $P_4 \geq 12$  ng/ ml podría ser un valor predictivo de menores tasas de implantación y de embarazo (Nayak *et al.*, 2014). La elevación del nivel de  $P_4$  durante 2 o más días antes de la oleada de LH, también presenta un efecto adverso en las tasas de embarazo en ciclos naturales para transferencia de embriones crioconservados, similares a los ciclos de FIV estimulados (Lee *et al.*, 2014). Aunque no solo se ha establecido valores de  $P_4$  perjudiciales, sino que niveles  $> 3$  ng / ml el día siguiente de la recuperación ovocitaria, es considerado como un marcador de éxito en la tasa de embarazo.

#### **1.4.1.3. Endometrial Receptivity Array (ERA).**

El único estudio realizado sobre el endometrio era la ecografía, y no había métodos de análisis disponibles para ayudar a los médicos en su práctica clínica. Actualmente, gracias a la medicina molecular, el perfil de expresión génica endometrial puede catalogar con

precisión y diagnosticar el ciclo endometrial humano y, específicamente, su estado receptivo en base a su perfil transcriptómico.

El ERA conduce a la evaluación, a nivel molecular, del factor endometrial. Esta herramienta molecular nos permite diagnosticar si el endometrio es receptivo o no mediante el análisis de la expresión de un grupo de 238 genes relacionados con la receptividad del endometrio (Ruiz-Alonso M *et al.*, 2013). Para ello se debe de realizar una biopsia endometrial, ya sea, en el día LH+7 (día 7 tras el pico de LH) bajo un ciclo natural o bien en el día P+5 (día 5 de administración de progesterona) en un ciclo sustituido o terapia de reemplazo hormonal. De acuerdo con estos valores de expresión, el endometrio se clasifica como receptivo o no receptivo por un factor de predicción computacional, siendo capaz de diagnosticar la ventana de implantación personalizada de un determinado paciente, independientemente de la apariencia histológica de la muestras. El análisis revela la sincronización de la ventana de implantación y conduce a una transferencia de embriones personalizada (pET) en el tiempo, en base, a los resultados obtenidos individualmente. Dicha transferencia de embriones se debe hacer en el mismo tipo de ciclo en el que se obtiene un resultado receptivo. Este método diagnóstico se utiliza actualmente en casos de fallo de implantación repetida, cuya ventana de implantación se ve desplazada (retardada o adelantada) entorno al 20 % de estas pacientes (Díaz-Gimeno *et al.*, 2013).

#### **1.4.2. El papel del embrión.**

Antiguamente la transferencia de embriones en TRA se llevaba a cabo cuando éstos estaban en fase de división (D+2 y D+3) presentándose entre 2-8 células o blastómeras, ya que se pensaba que el útero proporciona el mejor ambiente para la supervivencia del embrión (Laverge 2001). Aunque actualmente está cogiendo cada vez más fuerza la transferencia de embriones en estadio de blastocisto (D+5 o D+6) debido a una mayor sincronización fisiológica con el endometrio.

Todo esto ha llevado a discrepancias entre varios laboratorios de cuál es el mejor estadio embrionario para llevar a cabo dicha transferencia. Por eso, existen 2 modelos de pensamiento en TRA, unos a favor de transferencia en estadio de división y otros en estadio de blastocisto.

Aquellos que defienden la transferencia en estadio de división aportan que el mejor incubador es el vientre materno al evitar la exposición a medios de cultivo, luz, cambios de temperatura, variaciones de pH, osmolaridad, así como, disminuir la incidencia de trastornos epigenéticos reportados en el patrón de metilación génica tal y como ocurre en los síndromes de Beckwith–Wiedemann y Angelman (1: 13.700 nacidos), causados por la exposición embrionaria a los cultivos *in vitro* (Savage *et al.*, 2011).

Por otro lado aquellos que defienden la transferencia en estadio de blastocisto aportan que existe una mayor sincronización fisiológica, disminuye la tensión del embrión al exponerlo a un ambiente nutricional uterino adecuado con el nivel de desarrollo, aquellos embriones más viables alcanzarán el estadio de blastocisto gracias al proceso de autoselección, hay un menor peristaltismo uterino en dicho periodo, es posible validar aún mejor la calidad embrionaria, y además presenta mayor potencial de implantación.

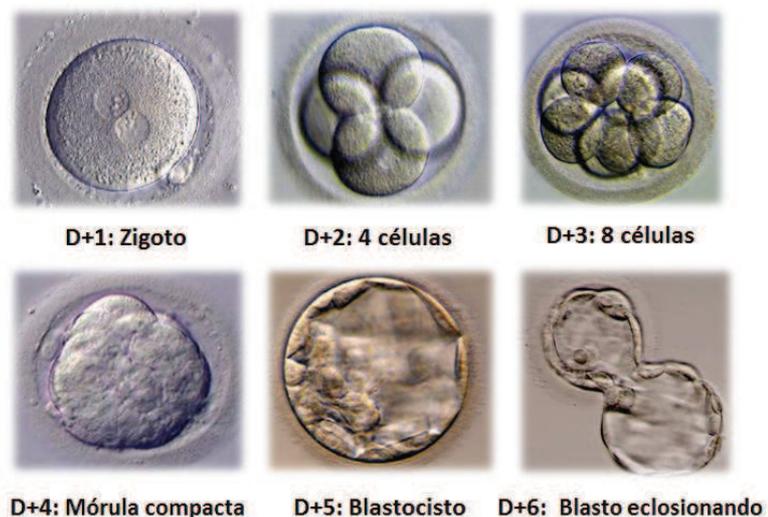
Una reciente revisión Cochrane mostró que existe una diferencia significativa en las tasas de nacidos vivos a favor de la transferencia de blastocistos en comparación con los ciclos de transferencia de embriones en fase de división (Día 2-3: 31.2 % frente a Día 5-6: 38.8%). Aunque las tasas acumulativas de embarazo clínico de fase de división (derivados de ciclos frescos y descongelados) aumenta las tasas de embarazo clínico frente a ciclos de blastocisto (Día 2-3: 56.8% frente a Día 5-6: 46.3%). La razón más probable de esto puede deberse a que hubo mayores tasas de embriones congelados en fase de división y dependa de la eficacia de las técnicas de crioconservación utilizadas (Glujovsky *et al.*, 2012).

#### **1.4.2.1. La calidad embrionaria.**

Como se ha citado anteriormente, el éxito de la implantación depende tanto de la receptividad endometrial, la calidad embrionaria y de la sincronización embrión-endometrio.

La calidad embrionaria define la capacidad que presenta el embrión para implantar en el endometrio, evaluado mediante valoración morfológica *in vitro* de cada estadio de desarrollo temprano preimplantacional. Actualmente el método utilizado en los laboratorios de reproducción asistida en España para valorar la calidad embrionaria es la clasificación ASEBIR (ASEBIR, 2008). Basado en la valoración morfológica, utiliza 5 parámetros clave para estimar la calidad del preembrión o blasto, siendo: el número de células, % de fragmentación, simetría, multinucleación y vacualización. Estos serían los parámetros más relevantes,

aunque dependiendo del estadio que se mire, se evalúan otros que pueden ser indicadores de buena o mala calidad (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Estadios de desarrollo embrionario temprano *in vitro*.

Los parámetros observados en **D+1** en el cigoto tras fertilización (17-20 h) son: número y apariencia de los corpúsculos polares (CP), número y apariencia de los pronúcleos (PN) teniendo en cuenta su simetría, localización y número de precursores nucleares; presencia de halo citoplasmático o aclaramiento de la zona cortical, siendo considerado un patrón de buen pronóstico y presencia de división temprana.

Con todas las observaciones recogidas a lo largo del desarrollo del embrión se establece una estimación de la calidad. Esta clasificación se divide en 4 categorías que tienen en cuenta el potencial implantatorio del embrión, la cual se explica brevemente a continuación:

**Categoría A:** óptima calidad con máxima capacidad de implantación.

**Categoría B:** buena calidad con elevada capacidad de implantación.

**Categoría C:** calidad regular con una probabilidad de implantación media.

**Categoría D:** mala calidad con una probabilidad de implantación baja.

## 1. Introducción

Para la clasificación del embrión en **D+2** y **D+3** se tomarían las referencias de la siguiente tabla que recoge un resumen de las pautas seguidas por ASEBIR (Tabla 1.3):

**Tabla 1.3.** Gradación de la calidad embrionaria en transferencias de D+2 y D+3 según ASEBIR (Tomado de ASEBIR, 2008. Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos).

Categoría	Evolución D+2 a D+3	% fragmentación	Simetría	Vacuolización	Multinucleación
A	4 células a 7-8 células	Menos del 10%	Todas iguales o semejantes	Ausencia	Ausencia
B	Incremento de 3-4 células (cualquier combinación)	Hasta el 25%	Todas iguales o semejantes	Ausencia	Ausencia
C	Incremento de 1-3 células (cualquier combinación)	Hasta el 35%	Desiguales	Ausencia o pocas	Ausencia
D	Incremento de una sola célula	Más del 35%	Desiguales	Abundantes	Presencia

El único parámetro a valorar en **D+4** es si presenta compactación de las blastómeras.

En el caso de los blastocistos (**D+5** y **D+6**) cambian los parámetros a valorar, presentes a continuación en la tabla para su clasificación (Tabla 1.4):

**Tabla 1.4.** Gradación de la calidad embrionaria en transferencias de D+5 y D+6 según ASEBIR (Tomado de ASEBIR, 2008. Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos).

Categoría	Organización en blastocisto	ZP	MCI	Tamaño MCI	TE	Grado de expansión
A	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800-1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio homogéneo células elípticas	Blastocele ocupa todo el volumen
B	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800-1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio irregular	
C	En D+6			<1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio homogéneo células elípticas	
D	En D+6			<1900 $\mu\text{m}^2$	Epitelio irregular células escasas	

La clasificación embrionaria en las diversas etapas del desarrollo es crucial para los embriólogos que trabajan en una unidad de reproducción asistida, ya que depende de la categoría que se asigne en cada uno se tomarán decisiones cómo: que embrión/es se van a transferir, qué día es el más idóneo para transferir, qué embrión/es son aptos para la congelación o que embrión/es se desechan.

#### **1.4.2.2. Tiempo de cultivo embrionario tras descongelación.**

Hasta ahora se le había dado mayor importancia a la selección de embriones antes de la crioconservación, sin embargo, la selección después de la descongelación de los embriones juega un papel importante en el éxito de la criotransferencia.

Los dos procedimientos más comunes para seleccionar embriones en criotransferencias difieren en el tiempo de cultivo post-descongelación: uno se basa en la observación de la proliferación de blastómeras que requiere un cultivo más prolongado, generalmente durante toda la noche anterior (18-24 h), y el otro se basa en la observación de la supervivencia después de la descongelación de las blastómeras, que requiere un cultivo más corto (2-5 h). La efectividad de una estrategia sobre la otra no está claro aún, debido a que hay pocos estudios establecidos.

La evaluación de la reanudación mitótica después de la descongelación se convirtió en una estrategia ampliamente utilizada para la clasificación y selección de embriones. Estudios indican que la capacidad de presentar actividad mitótica adicional tras descongelación de embriones crioconservados puede ser un buen indicador de viabilidad, además de presentar mayores tasas de embarazo frente a aquellos embriones sin ninguna división adicional (Ziebe *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2010).

En un estudio llevado a cabo en el año 2012 indica que la descongelación de embriones en estadio de división prolongando el cultivo hasta el estadio de blastocisto, es un buen predictor de viabilidad de los embriones y en el éxito del embarazo (Eftekhar *et al.*, 2012).

Aunque algunos autores se oponen a esto, ya que creen que los embriones podrían ser particularmente sensibles a las influencias ambientales no óptimas durante el cultivo después de la descongelación, posiblemente interfiriendo en el potencial de implantación y en el desarrollo de un nacimiento vivo (Rato *et al.*, 2012).

En el estudio realizado por Rato y colaboradores afirman que la tasa de implantación y de nacidos vivos por embrión transferido fue significativamente mayor en cultivo corto tras descongelación que en cultivo largo. Dicho estudio refuerza las ventajas de este tipo de cultivo evaluando la criosupervivencia de las blastómeras y sugiriendo que la reducción del cultivo disminuye el estrés generado tras la descongelación, además de aumentar el potencial de desarrollo embrionario y por tanto del resultado de la criotransferencia.

Finalmente un reciente estudio llevado a cabo por Guo y colaboradores afirman que la tasa de implantación, de embarazo clínico, de aborto, de embarazo múltiple, de nacidos vivos y el peso al nacer fueron similares en el grupo de cultivo corto comparado con los del grupo de cultivo largo (Guo *et al.*, 2013).

Aunque todos los estudios coinciden que el mejor resultado logrado después de la crioconservación de embriones será en aquellos que presentan una mayor calidad antes de la congelación, que conservan su número inicial de blastómeras, pero sobre todo mantengan su potencial de desarrollo llegando a la reanudación de la actividad mitótica en la cavidad uterina.

El tiempo optimo puede estar identificado en la técnica de crioconservación, ya que sabemos que a bajas temperaturas se produce una despolimerización de los microtúbulos del huso meiótico y/o mitótico pudiendo afectar a la competencia funcional del desarrollo embrionario *in vivo* y con ello repercutir a las tasas de embarazo.

Posibles daños en la organización del citoesqueleto, los microtúbulos y microfilamentos de actina y tubulina tanto del huso meiótico como mitótico sigue siendo un problema sin resolver y una posible causa de aneuploidía en embriones. Dicho huso meiótico de la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos, es muy sensible a los cambios de temperatura, e incluso una ligera disminución de la temperatura puede provocar la ruptura de la estructura. Sin embargo, el huso es capaz de una total repolimerización después de la exposición a bajas temperaturas como ocurre en el caso de los ovocitos cuando son devueltos a 37 °C.

Actualmente mediante técnicas como la inmunocitoquímica y posterior utilización de microscopía confocal podemos visualizar una imagen estática del huso, sin embargo, dicho ovocito no puede ser fertilizado por tratarse de una técnica invasiva (Cao *et al.*, 2009). Por el

contrario gracias a técnicas no invasivas como la microscopía de luz polarizada ha permitido el estudio del comportamiento dinámico del huso meiótico *in vivo*, demostrando que la despolimerización de microtúbulos comienza aproximadamente a 32 °C, alcanzándose una despolimerización completa pocos minutos después de iniciar el enfriamiento. Los husos meióticos de ovocitos descongelados necesitan al menos 3 horas de cultivo para la repolimerización o “reconstrucción de novo” para que dicho uso sea visible. Los resultados son diferentes dependiendo de la especie, etapa de maduración, y la metodología utilizada. Un estudio afirma que la repolimerización del huso meiótico se produce en el 100% de los ovocitos supervivientes a la crioconservación realizado tanto con la congelación lenta y vitrificación. Sin embargo, utilizando un sistema de vitrificación la recuperación del huso meiótico tras la descongelación se produce en menor tiempo que utilizando congelación lenta (Ciotti *et al.*, 2009).

## ***2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

Debido a que el éxito de la transferencia de embriones crioconservados depende de la sincronización materno-embriónica, nos lleva a la hipótesis de cuál es el mejor tipo de preparación endometrial para obtener un buen estado de receptividad y el tiempo óptimo de cultivo necesario tras descongelación embrionaria respecto a la tasa de embarazo.

Los objetivos propuestos fueron:

1. Determinar si existen diferencias en tasas de embarazo en las transferencias de embriones crioconservados según el tipo de preparación endometrial establecido, ya sea mediante ciclo natural o ciclo sustituido.
2. Establecer la influencia del tiempo de cultivo, ya sea corto (2-5 h) o largo (18-24 h), tras la descongelación embrionaria en relación a la tasa de embarazo.

### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***

### **3.1. TIPO DE ESTUDIO.**

El presente trabajo consiste en un estudio retrospectivo analítico y experimental llevado a cabo en el Instituto de Reproducción Humana – FIV4, situado en la Clínica Asturias (Oviedo). El periodo de recogida de datos se realizó desde el 8 de noviembre del 2012 y finalizó el 9 de marzo del 2014.

### **3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.**

Se estudiaron a 34 parejas de las cuales se sometieron a 52 ciclos de preparación endometrial para la transferencia de embriones crioconservados tras un ciclo previo de FIV/ICSI. Entre los distintos tipos de infertilidad que padecían las parejas se encontraban tanto factor tubárico, baja reserva ovárica, índice de masa corporal (IMC) elevado, endometriosis, SOP, factor masculino, esterilidad de origen desconocido (EOD) y aquellos casos que recurrieron a donación de óvulos por posibles trastornos genéticos. El rango de edad de las mujeres comprendía entre 29-40 años. Todas las parejas sometidas a tratamiento contaban con un estudio de esterilidad básico previo, que consistía en el análisis del perfil hormonal, histerosalpingografía, cariotipo y serología. A todas las pacientes se les explicó detalladamente en que consiste el tratamiento bajo consentimiento informado.

### **3.3. PROTOCOLOS DE EOC.**

Los ciclos de EOC llevados a cabo en las pacientes en estudio se empleó tanto protocolos con agonistas (protocolo largo) como antagonistas (protocolo corto), siendo estos últimos los más empleados.

Algunas pacientes tomaron anticonceptivos orales en el ciclo previo a la estimulación durante un promedio de 15 días, para mantener el ovario en reposo y así programar el ciclo. En la mayoría de los casos la estimulación ovárica se llevó a cabo mediante gonadotropinas recombinantes, aunque hubo algunos casos en los que se utilizaron gonadotropinas urinarias ultrapurificadas. Las dosis empleadas se ajustaron a cada paciente, teniendo en cuenta su peso, edad y marcadores de reserva ovárica, como el RFA y los niveles basales de FSH y estradiol, medidos en el tercer día del ciclo. El control ecográfico para valorar tanto el

desarrollo folicular, los niveles hormonales de FSH y estradiol como determinar el grosor endometrial, se llevaron a cabo cada 2 o 3 días tras el inicio de la EOC. La duración del tratamiento de estimulación varió entre 10 y 12 días, en función de la respuesta de la paciente.

En aquellas pacientes en las que existe un alto riesgo de SHEO debido al rápido incremento de estradiol sérico, cuando éste sobrepasaba los 2500 pg/ ml o cuando hubo un número elevado de folículos de entre 14 y 18, el desencadenamiento de la ovulación se llevaba a cabo con un bolo agonista de GnRH para disminuir esta complicación iatrogénica. El uso del agonista de GnRH para desencadenar la ovulación, precisa que los embriones generados en el laboratorio sean criopreservados para prevenir el SHEO grave y debido a una mala preparación endometrial.

#### **3.4. PUNCIÓN FOLICULAR: RECUPERACIÓN DE OVOCITOS.**

La recuperación de ovocitos se realizó el día 13 o 14 del ciclo, siempre 36 horas tras la administración de la hormona hCG o del agonista de la GnRH que desencadenaría la ovulación. La punción folicular se llevó a cabo en el quirófano, con la paciente sometida a sedación en posición de litotomía o ginecológica, mediante punción transvaginal guiada por ecografía.

El líquido folicular contenido en los tubos de aspiración era depositado en una placa de Petri sobre la campana de flujo laminar con superficie calefactada a 37 °C, situada en el laboratorio de embriología.

#### **3.5. PROTOCOLO DE LABORATORIO.**

Las técnicas de FIV/ICSI se llevaron a cabo siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio de embriología de dicha Unidad. Todos los medios de cultivo fueron de la marca comercial *COOK*<sup>®</sup> y se siguieron los protocolos establecidos por el fabricante para el mantenimiento de gametos y embriones.

Los complejos cúmulo-ovocito obtenidos tras la punción folicular se examinaron en las lupas binoculares estereoscópicas en la campana de flujo laminar calefactada a 37 °C para

extraer o decumular las células de la granulosa con la enzima Hialuronidasa. Posteriormente se evaluó el grado de madurez y su morfología según los criterios de ASEBIR (2008).

El procesamiento del semen, ya sea, obtenido del cónyuge o de donante se llevó a cabo mediante capacitación utilizando las técnicas de *swim-up* o por gradientes de densidad. El conteo de espermatozoides y el diagnóstico del estado del semen se realizaron según los criterios de referencia de la OMS (2010).

En función del número de ovocitos recuperados tras una EOC, se realizó ICSI o FIV convencional. Normalmente cuando se obtuvo tras la punción folicular un número  $\leq 10-12$  ovocitos maduros la técnica a utilizar es la ICSI, aunque si se recuperó un número mayor, también se realizaba FIV convencional.

Los ovocitos inyectados o inseminados se mantuvieron en el incubador a 37 °C y a 6% de CO<sub>2</sub> hasta la valoración de la fertilización, al ver dos pronúcleos y dos corpúsculos polares, 17-20 horas tras la punción.

Los embriones se mantuvieron en cultivo en las mismas condiciones durante 3, 5 ó 6 días tras la punción, valorando su desarrollo y calidad diaria según los criterios morfológicos de ASEBIR (2008).

Teniendo en cuenta la calidad embrionaria y el número de embriones generados en el laboratorio se vitrificaban los embriones en estadio de división o en estadio blastocisto. La calidad embrionaria fue establecida según cuatro categorías (A, B, C y D) siendo aquellos embriones tipo A los que presentan una máxima capacidad de implantación, mientras que los de tipo D presentan baja probabilidad de implantación.

### **3.6. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES.**

La técnica de crioconservación de embriones utilizada en el laboratorio de embriología de FIV4 es la de vitrificación, debido a que actualmente presenta una mayor tasa de supervivencia tras la descongelación. Entre las principales causas de vitrificación en este estudio destacan el exceso de ovocitos obtenidos tras la punción folicular, elevados niveles hormonales el día de la administración de hCG, ya sea, progesterona o estradiol sólo o combinados, por mala preparación endometrial y un caso puntual de acumulación de embriones para aumentar el número a transferir.

En la crioconservación embrionaria siempre que sea posible, congelaremos los sobrantes de mejor calidad (A, B, C) una vez hayan sido transferidos en fresco los mejores, en aquellos casos en los que previamente se haya llevado a cabo.

Antes de comenzar a vitrificar preparamos las pajuelas poniendo una pegatina de identificación de la paciente haciendo constar el nombre, apellidos, el número del embrión y un color para su correcto almacenaje en el tanque de nitrógeno líquido. Los medios utilizados para la vitrificación de embriones en estadio de división como en estadio de blastocistos son de la casa comercial *Vitrolife*<sup>®</sup> siguiendo los protocolos del fabricante mediante el dispositivo Rapid-I.

### 3.7. PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN ENDOMETRIAL.

En este estudio los 3 tipos de preparación endometrial establecidos para la transferencia de embriones crioconservados son mediante ciclo artificial con pretratamiento agonista de la GnRH ( $n = 45$ ), ciclo natural ( $n = 5$ ) y ciclo natural modificado ( $n = 2$ ), englobados bajo ciclo sustituido y ciclo natural, debido al bajo número de muestras.

La preparación endometrial establecido en las pacientes bajo un ciclo sustituido se realizó siempre bajo un pretratamiento agonista de la GnRH. Para ello, previamente se les administraban 3.75 mg de agonista de depósito de GnRH por vía intramuscular que suprimía el eje hipotálamo-hipófisis-gónada antes de empezar con los estrógenos exógenos. El análogo utilizado era un agonista de depósito de GnRH que se administraba en el día 21 de la fase lútea del ciclo anterior para lograr una correcta supresión ovárica.

En cuanto a la administración de los estrógenos encargados de la proliferación endometrial, existe bastante flexibilidad en la duración del tratamiento pudiendo variar desde 5 días hasta 6 semanas sin afectar a la posterior receptividad del endometrio. Por convenio, se solía utilizar un tratamiento de unas dos semanas. Los estrógenos utilizados fueron Valerato de estradiol administrados por vía oral. En cuanto las dosis, variaba en función de la respuesta de la paciente pudiendo ser secuenciales o de dosis fija (2 mg, 4 mg o 6 mg al día).

Una vez que la paciente, a través de controles ecográficos, presentaba un buen engrosamiento endometrial (7-9 mm) comenzaba con la administración diaria de 400 mg o 600 mg de progesterona micronizada por vía intravaginal (200 mg cada 8 o 12 horas) al

menos 3 días antes de la transferencia embrionaria. Dicha administración será la encargada de convertir el endometrio proliferativo en un endometrio de tipo secretor, preparado para recibir al embrión.

Una vez realizada la transferencia de uno o dos embriones, la paciente deberá de seguir con el aporte exógeno de progesterona micronizada por vía vaginal hasta la semana 10-12 de la gestación para dar apoyo a la fase lútea.

En los casos en que se llevó a cabo la preparación endometrial mediante un ciclo natural, dichas pacientes presentaban ciclos menstruales regulares. Para controlar los niveles de LH previos a la ovulación, se les hizo dos extracciones de sangre periférica. La primera, una vez que presentan un tamaño folicular de unos 16 mm de diámetro y la segunda, 24 horas después de la primera extracción, para ver el aumento en los niveles de LH. Cuando se observó un aumento en los niveles séricos de LH, se estipula que la ovulación se producirá 36 horas más tarde.

En el caso de preparación endometrial mediante un ciclo natural modificado o inducido, se administró 250 mg (10.000 UI) de hCG por vía subcutánea una vez que el folículo dominante alcanzaba un tamaño de unos 17 -20 mm de diámetro.

En ambos ciclos naturales se administró unos 400 mg de progesterona micronizada (200 mg cada 12 h/ día) por vía intravaginal para dar apoyo a la fase lútea. La administración de progesterona comenzó al menos 3 días antes de la transferencia embrionaria y si las pacientes presentaron un engrosamiento endometrial de unos 7-9 mm, tal y como ocurrió en todos los casos estudiados.

### **3.8. DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES CRIOCONSERVADOS.**

Los embriones descongelados fueron sometidos a cultivo corto (2- 5 horas) o cultivo largo (18-24 horas) antes de la transferencia, manteniéndose en la incubadora en iguales condiciones que los embriones en fresco a 37 °C y al 6 % de CO<sub>2</sub>. Los medios utilizados para la desvitrificación de embriones en estadio de división como en estadio de blastocistos son de la casa comercial *Vitrolife*® siguiendo los protocolos del fabricante mediante el dispositivo Rapid-I.

### 3.9. CRIOTRANSFERENCIA DE EMBRIONES DESCONGELADOS.

El día de la criotransferencia, se evaluó la supervivencia a la desvitrificación, la actividad mitótica adicional y, así como, su calidad según los criterios ASEBIR (2008).

Mediante la preparación endometrial de las pacientes, ya sea, bajo ciclo sustituido o ciclo natural se iba realizando un seguimiento ecográfico. Cuando el engrosamiento endometrial alcanzaba unos 7-9 mm se iniciaba el aporte de progesterona intravaginal. Un mínimo de 3 días de progesterona (400 mg o 600 mg al día) era necesario para la criotransferencia embrionaria en embriones en estadio de división. En aquellos embriones en que fueron transferidos en un estadio de blastocisto, se estableció previamente 5 o 6 días de administración de progesterona intravaginal, en función del desarrollo embrionario.

Los embriones descongelados, se transfirieron (un máximo de dos) en los días de desarrollo +3 (en división), +4 (mórula), +5 (blastocisto) y +6 (blastocisto eclosionando).

Todas las criotransferencias fueron realizadas en el quirófano por el mismo ginecólogo, colocándose a la paciente en posición ginecológica o de litotomía y sin anestesia. Primero se insertaba el espéculo para visualizar el cérvix y realizar un lavado vaginal con suero fisiológico para eliminar restos de progesterona y de moco cervical. En este momento se evaluó también el engrosamiento endometrial para comprobar que estaba en buenas condiciones óptimas para recibir los embriones.

El catéter estándar empleado en todas las transferencias fue el *Cook Oliva*, indicado para transferencias fáciles, salvo que la prueba de transferencia indicara dificultad en la misma, en cuyo caso, se utilizaron los catéteres tipo *Frydman* y *Wallace*. La criotransferencia se realizó canalizando el cuello uterino con el catéter externo e introduciéndose el catéter interno para la descarga de los embriones en el tercio inferior del útero. Todo el proceso se realizó de forma guiada por ecografía transabdominal con la vejiga llena para visualizar mejor el útero de la paciente.

Tras dos semanas, se realizó en las pacientes el test de embarazo ( $\beta$ -hCG) en sangre periférica para verificar si el embarazo bioquímico dió positivo. De ser positivo, el embarazo clínico se confirma en la semana 5 post-transferencia al ver mediante control ecográfico latido fetal. El aporte de progesterona intravaginal (400 mg o 600 mg al día) deberá de ser continuado hasta la semana 10-12 de gestación, momento en la placenta comienza a producir progesterona de manera endógena.

### **3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados obtenidos se expresan como variables ordinales, nominales y en escala. Los valores de las variables continuas se expresan como medias  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Los valores de las variables discretas y categóricas se expresan como frecuencias absolutas y porcentajes. La significación estadística se ha realizado mediante el Test de la  $t$  de Student para datos independientes, considerándose significativos los valores de  $p \leq 0.05$ .

Todos los cálculos se han realizado con los programas informáticos Excel (Microsoft Office) e IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU).

## ***4. RESULTADOS***

#### 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.

La media de edad de las mujeres que quedaron embarazadas fue de  $33.81 \pm 0.80$  ( $n = 16$ ), siendo 2 años mayor la del grupo de no embarazo ( $n = 36$ ). Considerándose embarazo en aquellas mujeres cuya prueba  $\beta$ -hCG dieron positivo en sangre periférica, tras 14 días de la criotransferencia embrionaria.

En ambos grupos la media de ovocitos recuperados fue muy semejante, entorno a unos 12 ovocitos tras EOC ( $12.38 \pm 1.84$  frente a  $12.17 \pm 1.02$ ).

En el grupo de embarazadas el número de ciclo en el cual obtuvieron gestación parece acercarse a un segundo ciclo de preparación endometrial en criotransferencias ( $1.75 \pm 0.17$ ) frente al grupo que no obtuvieron gestación ( $1.36 \pm 0.12$ ).

Los días de administración de progesterona previos a la criotransferencia, es muy similar en ambos grupos, estableciéndose entre 3 y 4 días ( $3.81 \pm 0.27$  frente a  $3.78 \pm 0.18$ ).

Tanto en el grupo de embarazo como no embarazo el número de embriones transferidos tras cada preparación endometrial fue de uno o dos embriones ( $1.44 \pm 0.12$  frente a  $1.44 \pm 0.08$ ) (Tabla 4.1.1).

**Tabla 4.1.1.** Grupos de sujetos a estudio respecto a la media, el error estándar de la media (EEM) y el número ( $n$ ) de ciclos de preparación endometrial para la transferencia de embriones crioconservados. P<sub>4</sub>: Progesterona.

Grupo		Edad	Ovocitos recuperados	Nº de ciclo	Días de P <sub>4</sub>	Nº embriones transferidos
Embarazo	Media	33.81	12.38	1.75	3.81	1,44
	EEM	0.80	1.84	0.17	0.27	0.12
	$n$	16	16	16	16	16
No embarazo	Media	35.67	12.17	1.36	3.78	1.44
	EEM	0.62	1.02	0.12	0.18	0.08
	$n$	36	36	36	36	36
Total	Media	35.10	12.24	1.48	3.79	1,44
	EEM	0.51	0.90	0.10	0.15	0.07
	$n$	52	52	52	52	52

Entre las principales causas por las cuales se vitrificaron dichos embriones se deben tanto al exceso de ovocitos obtenidos tras la punción folicular como a los altos niveles de estradiol sérico recogidos en el día previo a la inducción de la ovulación (32.7 % debido al exceso de ovocitos y 34.6 % al estradiol). Un 15.4 % es debido a los altos niveles hormonales tanto de estradiol como progesterona y un 3.8 % por causas de endometrio fino (< 7 mm). Además se presentó un caso puntual de acumulación de embriones para aumentar el número a transferir, tras un segundo ciclo de EOC (Tabla 4.1.2).

**Tabla 4.1.2.** Valores de las frecuencias y porcentajes de las causas de vitrificación de las pacientes que se someten a un ciclo posterior de preparación endometrial para criotransferencia. P<sub>4</sub>: Progesterona; E<sub>2</sub>: Estradiol.

	Motivo de la Vitrificación	
	Frecuencia	Porcentaje
<b>Exceso ovocitos</b>	17	32.7
<b>P<sub>4</sub></b>	6	11.5
<b>E<sub>2</sub></b>	18	34.6
<b>E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub></b>	8	15.4
<b>Mala preparación endometrial</b>	2	3.8
<b>Acumulación de embriones</b>	1	1.9
<b>Total</b>	52	100.0

De los 52 ciclos de preparación endometrial llevados a cabo para la transferencia de embriones crioconservados presenta una tasa de embarazo del 30.8 % ( $n = 16$ ) frente a una tasa restante del 69.2 % en el grupo de no embarazo ( $n = 36$ ) (Tabla 4.1.3).

**Tabla 4.1.3.** Valores de las frecuencias y porcentajes de la tasa de embarazo y no embarazo de las pacientes que se han sometido a transferencia de embriones crioconservados.

Tasa de Embarazo		
	Frecuencia	Porcentaje
<b>Embarazo</b>	16	30.8
<b>No embarazo</b>	36	69.2
<b>Total</b>	52	100.0

#### 4.2. EFECTO ENTRE EL TIPO DE PREPARACIÓN ENDOMETRIAL ESTABLECIDO Y LA TASA DE EMBARAZO.

La mayoría de los ciclos de preparación endometrial, el 86.5 % ( $n = 45$ ), se llevaron a cabo bajo ciclo sustituido u hormonalmente manipulado con pre-tratamiento agonista de GnRH (suplementado con o sin parches de  $E_2$ ) frente al 13.5 % restante ( $n = 7$ ) en ciclo natural (incluyendo 2 ciclos naturales modificados o inducidos). De los 16 ciclos de preparación endometrial que dieron lugar a embarazo, el 81.3 % fueron bajo ciclo sustituido, el cual no hubo diferencias significativas ( $p = 0.45$ ) con respecto al tipo de preparación endometrial establecido (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Valores de las frecuencias y porcentajes de los ciclos de preparación endometrial que se someten las pacientes, ya sea bajo ciclo sustituido o ciclo natural, para la criotransferencia respecto a todas las pacientes expuestas y a la tasa de embarazo. IC 95 %: Intervalo de confianza al 95 %. Valor  $p$ : Valor de significación estadística realizado mediante el test de la  $t$  student para datos independientes, considerándose significativo valores de  $*p \leq 0.05$ .

	Preparación endometrial Global		Preparación endometrial respecto a embarazo		Chi cuadrado de Pearson		
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Odds ratio	IC 95 %	Valor $p$
<b>Ciclo sustituido</b>	45	86.5	13	81.3	0.54	0.10 - 2.76	0.45
<b>Ciclo natural</b>	7	13.5	3	18.8			
<b>Total</b>	52	100	16	100			

#### 4.3. EFECTO ENTRE EL TIEMPO DE ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA Y LA TASA DE EMBARAZO.

Podemos observar que en casi todos los ciclos, cerca del 90.4 % ( $n = 47$ ), se administró regularmente 200 mg de progesterona 3 veces/día (cada 8 horas) frente al 9.6 % ( $n = 5$ ) restante 2 veces /día (cada 12 horas). De los ciclos de preparación que dieron lugar a embarazo, el 18.8 %, se obtuvo de la administración intravaginal de progesterona cada 12 horas, estableciéndose la mayoría de los embarazados tras la administración regular cada 8 horas (81.3 %). No hubo diferencias significativas ( $p = 0.13$ ) en la elección del tiempo de

administración de progesterona, ya sea, cada 8 o 12 horas con respecto a la tasa de embarazo (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Valores de las frecuencias y porcentajes del tiempo de administración de progesterona que se someten las mujeres en ciclos de preparación endometrial para la transferencia de embriones crioconservados, ya sea cada 8 horas o cada 12 horas respecto a todas las pacientes expuestas y a la tasa de embarazo. P<sub>4</sub>: Progesterona; c/ 8 h: cada 8 horas; c/ 12 h: cada 12 horas; IC 95 %: Intervalo de confianza al 95 %. Valor *p*: Valor de significación estadística realizado mediante el test de la *t* student para datos independientes, considerándose significativo valores de  $*p \leq 0.05$ .

	Administración P4 Global		Administración de P4 respecto a embarazo		Chi cuadrado de Pearson		
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Odds ratio	IC 95 %	Valor <i>p</i>
c/ 8 h	47	90.4	13	81.3	0.25	0.38 - 1.70	0.13
c/ 12 h	5	9.6	3	18.8			
Total	52	100.0	16	100.0			

#### 4.4. EFECTO ENTRE EL TIEMPO DE CULTIVO POSTDESCONGELACIÓN Y LA TASA DE EMBARAZO.

Se llevó a cabo cultivo corto (2-5 horas) o cultivo largo (18-24 horas) en embriones tras la descongelación para la posterior criotransferencia. En la mayoría de las criotransferencias, el 82.7 % ( $n = 43$ ), se estableció un cultivo corto para la recuperación de los embriones tras el proceso de vitrificación. En todas aquellas en las que se obtuvo gestación ( $n= 16$ ), excepto en 2 casos, fue mediante el cultivo corto de embriones post-vitrificados ( $n=14$ ). No se observaron diferencias significativas ( $p = 0.54$ ) en las tasas de embarazo en el grupo de cultivo corto en comparación con el grupo de cultivo largo. Pese a no existir diferencias significativas, existe una ligera tendencia (OR: 1.69) a presentar embarazo en aquellos embriones que se llevaron a cultivo corto en comparación al grupo de cultivo largo (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Valores de las frecuencias y porcentajes del tiempo de cultivo de embriones post-descongelados, ya sea, cultivo corto (2-5 horas) o cultivo largo (18-24 horas) previo a la criotransferencia en ciclos de preparación endometrial de embriones crioconservados respecto a todas las pacientes expuestas y a la tasa de embarazo. IC 95 %: Intervalo de confianza al 95 %. Valor *p*: Valor de significación estadística realizado mediante el test de la *t* student para datos independientes, considerándose significativo valores de  $*p \leq 0.05$ .

	Tiempo de cultivo Global		Tiempo de cultivo respecto a embarazo		Chi cuadrado de Pearson		
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Odds ratio	IC 95 %	Valor <i>p</i>
<b>Cultivo corto</b>	43	82.7	14	87.5	1.69	0.30 - 9.21	0.54
<b>Cultivo largo</b>	9	17.3	2	12.5			
<b>Total</b>	52	100.0	16	100.0			

#### 4.5. EFECTO ENTRE LA ACTIVIDAD MITÓTICA EN CULTIVO POSTDESCONGELACIÓN Y LA TASA DE EMBARAZO.

Para valorar la actividad mitótica o reanudación de la mitosis de embriones post-descongelados en cultivo, se dividió su clasificación en aquellos que aumentan su número de células, en aquellos que mantenían el mismo número de células o blastómeras antes de la vitrificación o aquellos embriones que fueron congelados en estadio de blastocisto en el cual no podíamos valorar la reanudación de la actividad mitótica por su morfología. Por lo que realmente se valoraría dicha actividad en embriones que se encuentran en estadio de división (D+3). De todos los ciclos establecidos, tanto los embriones con división adicional como los que mantuvieron el mismo número de células, se presentaron equitativamente entorno a un 40.4 % ( $n = 21$ ) en cada caso. En el 19.2 % ( $n = 10$ ) restante no se pudo valorar dicha división, ya que, el embrión previo a la vitrificación se encontraba en estadio de blastocisto (D+5). En aquellos ciclos en los que se presentó gestación, el 62.5 % ( $n = 10$ ), fue en aquellos embriones en estadio de división (D+3) en la que se observaron una actividad mitótica adicional en cultivo después de la vitrificación. Aunque también se obtuvo embarazo, en el 31.3 % ( $n = 10$ ), en aquellos embriones en los que no se observó ninguna división celular adicional. Los resultados que obtuvimos no dieron diferencias significativas en la tasa de embarazo ( $p =$

0.10) al elegir embriones con actividad mitótica adicional en comparación con aquellos embriones que presentaban el mismo número de células en cultivo post-descongelación. Pese a no existir diferencias significativas, existe una tendencia 2 veces mayor (OR: 2.90) de presentar embarazo en aquellos embriones en los que se observó un aumento en el número de células en cultivo en comparación al grupo en el que no se observó ningún tipo de actividad adicional (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Valores de las frecuencias y porcentajes de la actividad mitótica adicional de embriones post-descongelados (aumenta el número de células, no aumenta el número de células o no se puede valorar en estadio de blastocisto) tras el tiempo de cultivo, previo a la criotransferencia en ciclos de preparación endometrial de embriones crioconservados respecto a todas las pacientes expuestas y a la tasa de embarazo. IC 95 %: Intervalo de confianza al 95 %. Valor *p*: Valor de significación estadística realizado mediante el test de la *t* student para datos independientes, considerándose significativo valores de  $*p \leq 0.05$ .

Actividad mitótica Global			Actividad mitótica respecto a embarazo				
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje			
<b>Aumenta</b>	21	40,4	10	62,5	<b>Chi cuadrado de Pearson</b>		
<b>No aumenta</b>	21	40,4	5	31,3	<b>Odds ratio</b>	<b>IC 95 %</b>	<b>Valor <i>p</i></b>
<b>Blastocisto</b>	10	19,2	1	6,3	2.90	0.77 - 10.88	0.10
<b>Total</b>	52	100,0	16	100,0			

#### 4.6. EFECTO ENTRE EL ESTADIO EMBRIONARIO Y LA TASA DE EMBARAZO.

Respecto a la criotransferencia también valoramos el estadio de desarrollo embrionario en que fueron vitrificados antes de la vitrificación. La mayoría de las transferencias se realizaron con la descongelación de embriones en estadio de división en el 73.1 % ( $n = 38$ ) repartiéndose el resto, entre embriones en estadio de blasto en D+5 en el 15.4 % y en D+6 en el 11.5 %. En aquellas criotransferencias que dieron lugar a embarazo, el 75 %, se estableció en embriones en estadio de división previo a la vitrificación. En el caso de la transferencia en estadio de blasto, se obtuvo gestación de manera equitativa en el 12.5 % tanto en D+5 ( $n = 2$ ) como en D+6 ( $n = 2$ ) (Tabla 4.6.1).

**Tabla 4.6.1.** Valores de las frecuencias y porcentajes del estadio embrionario antes de la vitrificación, ya sea en D+3, en D+5 o en D+6 previo a la criotransferencia en ciclos de preparación endometrial de embriones crioconservados respecto a todas las pacientes expuestas y a la tasa de embarazo. D+3: día 3 de desarrollo embrionario temprano o estadio de división; D+5: día 5 de desarrollo embrionario temprano o estadio de blastocisto; D+6: día 6 de desarrollo embrionario temprano o estadio de blastocisto eclosionando.

Estadio embrionario previo a la vitrificación Global			Estadio embrionario previo a la vitrificación respecto a embarazo	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
<b>D+3</b>	38	73.1	12	75.0
<b>D+5</b>	8	15.4	2	12.5
<b>D+6</b>	6	11.5	2	12.5
<b>Total</b>	52	100.0	16	100.0

Se analizaron independientemente el tipo de estadio embrionario elegido en la criotransferencia en relación con la tasa de embarazo, en cuyos resultados, no se obtuvieron ninguna diferencia significativa con respecto a la elección de embriones en estadio de división ( $p = 0.83$  en D+3) o en estadio de blastocistos ( $p = 0.70$  en D+5 y  $p = 0.88$  en D+6) (Tabla 4.6.2).

**Tabla 4.6.2.** Valores de Odds ratio, Intervalo de Confianza y significación estadística ( $p$ ) de criotransferencias en distintos estadios embrionarios en relación a la tasa de embarazo obtenidos a partir de la Chi cuadrado de Pearson. IC 95 %: Intervalo de confianza al 95 %. Valor  $p$ : Valor de significación estadística realizado mediante el test de la  $t$  student para datos independientes, considerándose significativo valores de  $*p \leq 0.05$ .

	Criotransferencia respecto a embarazo		
	Chi cuadrado de Pearson		
	Odds ratio	IC 95 %	Valor $p$
<b>D+3</b>	1.15	0.30 - 4.43	0.83
<b>D+5</b>	0.71	0.12 - 3.99	0.70
<b>D+6</b>	1.14	0.18 - 6.98	0.88

#### 4.7. RELACIÓN ENTRE LA CALIDAD EMBRIONARIO Y LA TASA DE EMBARAZO.

Debido a que la mayoría de las criotransferencias se realizaron con embriones en estadio de división (73.1 %), en estos casos y bajo consenso con la paciente, se solían transferir 2 embriones por ciclo. Por ello, en función de la capacidad de implantación de los embriones se estableció 3 tipos de calidad embrionaria en la criotransferencia: buena calidad referido a aquellos embriones tipo A y B antes de la vitrificación, mala calidad referido a embriones tipo C y D, y calidad regular referido a la transferencia de al menos un embrión de buena calidad.

Una vez establecido dicha clasificación, los embriones en estadio de división que dieron lugar a un mayor número de embarazos fueron aquellos de buena calidad, en el 37.5 % ( $n = 6$ ) de todas las gestaciones, seguido de embriones de mala calidad en un 25 % ( $n = 4$ ) y de un 12.5 % ( $n = 2$ ) de calidad regular. En el caso de embriones en estadio de blastocisto (D+5) se logró la concepción sólo en aquellos que presentaron buena calidad en un 12.5 % ( $n = 2$ ) de todas las gestaciones y en aquellos blastocistos en periodo de eclosión (D+6) se estableció bajo la transferencia de embriones tanto de buena y regular calidad de manera equitativa en un 6.3 % ( $n = 1$ ), en cada caso (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Valores de las frecuencias y porcentajes de la calidad embrionaria antes de la vitrificación, ya sea buena, regular o mala previo a la criotransferencia en ciclos de preparación endometrial de embriones crioconservados respecto a todas las pacientes expuestas y a la tasa de embarazo. D+3: día 3 de desarrollo embrionaria temprano o estadio de división; D+5: día 5 de desarrollo embrionario temprano o estadio de blastocisto; D+6: día 6 de desarrollo embrionario temprano o estadio de blastocisto eclosionando.

	Calidad embrionaria previo a la vitrificación respecto a embarazo					
	D+3		D+5		D+6	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
<b>Buena : A y B</b>	6	37.5	2	12.5	1	6.3
<b>Regular</b>	2	12.5	-	-	1	6.3
<b>Mala: C y D</b>	4	25.0	-	-	-	-
<b>Total</b>	12	75.0	2	12.5	2	12.5

## ***5. DISCUSIÓN***

Los resultados de este trabajo pretenden evaluar principalmente los tipos de preparación endometrial establecidos en las pacientes de la clínica de reproducción FIV4 en criotransferencias y el tiempo óptimo de cultivo embrionario tras descongelación, respecto a las tasas de embarazo. Se estudiaron a 34 parejas con diversos tipos de infertilidad, de las cuales, se sometieron a 52 ciclos de preparación endometrial para la transferencia de embriones crioconservados tras un ciclo previo de FIV/ICSI. El rango de edad de las mujeres comprendía entre 29-40 años estableciéndose una media de 35 años ( $n = 52$ ). La esterilidad de la pareja debido a un factor masculino, fue diagnosticado en la mayoría de los casos en que las mujeres sometidas a EOC presentaban una edad  $\leq 35$  años, destacando que la disminución de la calidad espermática está generando problemas a la hora de concebir embarazo, siendo la infertilidad no sólo un problema de la mujer (Jørgensen *et al.*, 2012).

La media de edad de las mujeres que quedaron embarazadas es menor que el grupo de mujeres que no obtuvieron gestación (33.81 frente a 35.67), debido a que al incrementar la edad de la mujer disminuye su fertilidad (Wallace y Kelsey, 2010). Aunque en ambos grupos de edad la media de ovocitos recuperados fue muy semejante, entorno a unos 12 ovocitos tras EOC, podría existir un impacto negativo en la calidad de los ovocitos afectando al futuro desarrollo, así como, existir un aumento de daño oxidativo e incremento de aneuploidias por fenómenos de no disyunción meiótica (Egbert, 2002).

Entre las causas por las cuales se vitrificaron dichos embriones fueron principalmente debido al exceso de ovocitos ( $n = 17$ ) obtenidos tras la punción folicular como a los altos niveles hormonales ( $n = 32$ ) de estradiol y  $P_4$ , solos o combinados, el día previo a la inducción de la ovulación. En aquellas pacientes en las que existe un rápido incremento de estradiol sérico sobrepasando de los 2500 pg/ml o cuando haya un número elevado de folículos de entre 14 y 18 mm, el desencadenamiento de la ovulación se lleva a cabo con un bolo agonista de GnRH para disminuir el riesgo de SHEO (Braat *et al.*, 2010). El uso del agonista de GnRH para desencadenar la ovulación, precisa que los embriones generados en el laboratorio sean crioconservados debido a una mala preparación endometrial. En el caso de que exista elevación de los niveles de  $P_4$  obtenidos tanto el día de la administración de hCG como en el día de la recuperación de ovocitos afecta negativamente a la tasa de implantación y de embarazo, debido al efecto perjudicial que produce en la receptividad endometrial (Wu *et al.*, 2012). El umbral de elevación de la  $P_4$  preovulatoria es de 0.9-1.2 ng/ml, siendo deletéreos aquellos niveles séricos  $>1.5$  ng/ml (Fatemi y Popovic-Todorovic, 2013).

También se vitrificaron embriones en menor cantidad debido a una mala preparación endometrial ( $n = 2$ ) y debido a la acumulación de embriones ( $n = 1$ ). Respecto a la mala preparación endometrial ocurrió en aquellas pacientes que presentaron endometrio fino ( $< 7$  mm), ya que, fisiológicamente para lograr una correcta receptividad endometrial previamente el endometrio debe de presentar un engrosamiento entre 8-12 mm para poder incrementar las tasas de embarazo (Dain *et al.*, 2013). En el caso de acumulación de embriones, la paciente era POR ( $< 3$  ovocitos tras EOC) siendo aconsejable someterla a un segundo ciclo de EOC para generar un mayor número de embriones en el laboratorio y aumentar las posibilidades de obtener gestación (Ferraretti *et al.*, 2011).

El número de ciclo en el cual se obtuvo gestación parece acercarse más a un segundo ciclo de preparación endometrial (Media: 1.75), pudiendo ser debido a que al establecer un cambio en el tipo de preparación optimizamos un tratamiento individualizado para cada paciente.

Los días de administración de  $P_4$  previos a la criotransferencia, fueron muy similares en ambos grupos, estableciéndose al menos entre 3 y 4 días (Nawroth y Ludwig, 2005).

El número de embriones transferidos tras cada ciclo de preparación endometrial fue de un máximo de 2 embriones en aquellos que se encuentran en estadio de división y de uno en embriones en estadio de blastocisto, disminuyendo así el riesgo de gestación múltiple (Braude, 2013).

De los 52 ciclos de preparación endometrial llevados a cabo para la transferencia de embriones crioconservados presenta una tasa de embarazo del 30.8 %, siendo superior a los ciclos de embriones en fresco, en un 21 %, obtenidos en FIV4. Esto determina que existe una mejor receptividad uterina durante los ciclos naturales o sustituidos en comparación con ciclos estimulados al mejorar la sincronía embrión-endometrio. Dicha receptividad endometrial podría estar alterada debido a los niveles suprafisiológicos de estradiol y  $P_4$  que se producen en ciclos de EOC, pudiendo conducir cambios bioquímicos y morfológicos en el endometrio, así como, una posible luteinización precoz (Roque *et al.*, 2013).

Dos recientes meta-análisis llevados a cabo para determinar cuál es el mejor tipo de preparación endometrial, afirman que no hay ninguna ventaja significativa en términos de tasas de embarazo clínico y nacido vivo (Ghobara y Vandekerckhove, 2008; Groenewoud *et al.*, 2013). Al valorar el efecto que tenían el tipo de preparación endometrial en nuestro trabajo, ya sea mediante ciclo sustituido o ciclo natural respecto a la tasa de embarazo, al

igual que estos autores no dieron diferencias significativas ( $p = 0.45$ ). A pesar de ello, según nuestros resultados el 42 % (3/7) de los embarazos se obtuvieron en ciclos naturales frente al 28 % (13/45) en ciclos sustituidos. Estos resultados nos sugieren que la elección en el tipo de preparación endometrial para la transferencia de embriones crioconservados debería ser individualizado, observando que en algunos casos tras cambiar el tipo de preparación tuvo lugar gestación.

En el caso de ciclo natural sugerimos que podría ser óptimo inicialmente para aquellas mujeres jóvenes,  $\leq 35$  años, que presentan periodos menstruales regulares, debido a que dicha preparación endometrial ocurre de manera fisiológica, sin exponerse a una respuesta hormonal excesiva. En cambio en mujeres  $\geq 35$  años o aquellas que presenten ciclos menstruales irregulares podrían responder mejor tras un ciclo sustituido, debido a una mayor exposición de niveles hormonales administrados exógenamente (Hancke *et al.*, 2012; Tomax *et al.*, 2012), ya que, podría existir una mayor resistencia o tolerancia a dichas hormonas como son el estradiol y la progesterona.

Actualmente existen ensayos multicéntricos prospectivos aleatorizados en desarrollo para verificar dichos datos respecto a tasas de cancelación, embarazo clínico, embarazo en curso, nacidos vivos, efectos adversos, costo-eficiencia y carga percibida a las pacientes dependiendo del tratamiento establecido (Groenewoud *et al.* 2012).

El tiempo de administración de progesterona al menos 3 días antes de la criotransferencia establecido cada 8 o 12 horas (400 mg o 600 mg por vía vaginal) no dieron diferencias significativas con respecto a la tasa de embarazo ( $p = 0.13$ ). Los resultados analizados muestran que en el grupo de administración de progesterona cada 12 horas logró el 60 % (3/5) de las gestaciones frente al 27 % (13/47) en el grupo cuya administración fue cada 8 horas. Esto nos sugiere que se podría establecer una menor dosis diaria de progesterona para obtener un endometrio receptivo necesario para la implantación del embrión. A pesar de que algunos autores no muestren diferencias significativas en tasas de embarazo respecto a la vía de administración de progesterona (Yanushpolsky *et al.*, 2010), creemos que sí podría repercutir en el estado madurativo del endometrio (Kaser *et al.*, 2012), así como, en el desarrollo de pinópodos y moléculas implicadas en la apertura de la “ventana de implantación”. Identificar el breve periodo de tiempo (entre 24-48 h) que tiene lugar dicha “ventana de implantación”, será crucial para determinar el éxito de la implantación del embrión (Lindhard *et al.*, 2002).

Fisiológicamente el inicio de la fase lútea en el endometrio es debido a la producción de progesterona secretado por el cuerpo lúteo (Quinn y Casper, 2009), aunque actualmente existe poca evidencia de si podría ser beneficioso el soporte de progesterona al inicio de la fase lútea en pacientes sometidos a ciclos naturales. Aunque podría ser perjudicial una mayor dosis de progesterona que influya negativamente en la implantación del embrión.

Tras la descongelación de embriones seleccionados para la posterior criotransferencia, se llevaron a cabo sobre ellos un cultivo corto (2-5 horas) o un cultivo largo (18-24 horas) necesario para la repolimerización de los microtúbulos del huso mitótico, entre otros procesos bioquímicos. Al analizar la influencia del tiempo de cultivo embrionario, los resultados obtenidos mostraron en el grupo de cultivo corto un 32 % (14/43) de embarazo frente al 22 % (2/9) en el grupo de cultivo largo. Pese a no existir diferencias significativas ( $p = 0.54$ ), existe una ligera tendencia (OR: 1.69) al presentar embarazo en aquellos embriones que se llevaron a cultivo corto en comparación al grupo en que se llevaron a cultivo largo.

Hasta ahora se le había dado mayor importancia a la selección de embriones antes de la crioconservación, sin embargo, la selección después de la descongelación de los embriones juega un papel importante en el éxito de la criotransferencia. El estudio de Ciotti y colaboradores evaluaron la repolimerización del huso meiótico en ovocitos maduros humanos comparando ambos sistemas de crioconservación, cuyos resultados obtuvieron que dicha repolimerización es más rápida bajo vitrificación que en congelación lenta, afirmando que existe un posible efecto protector de la vitrificación y posterior descongelación a 37 ° C (Ciotti *et al.*, 2009). Esto nos sugiere que podría ser beneficioso utilizar el cultivo corto debido a que genera menos estrés a los embriones tras descongelación al disminuir el tiempo de exposición (Rato *et al.*, 2012) y preservar un mayor potencial implantatorio, el cual, podría aplicarse en aquellos laboratorios que presenten un buen sistema de vitrificación para la crioconservación embrionaria.

La evaluación de la reanudación mitótica tras la descongelación se ha convertido en una estrategia utilizada para la clasificación y selección de embriones. Estudios indican que la capacidad de división adicional tras descongelación de embriones crioconservados puede ser un buen indicador de viabilidad, además de presentar mayor tasa de embarazo frente a aquellos embriones sin ninguna división adicional. Sugiriendo en embriones que presentan actividad mitótica tendrán mayores tasas de éxito frente a embriones que no se observan ninguna división adicional postdescongelación (Ziebe *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2010).

Al valorar la presencia de actividad mitótica adicional en embriones en estadio de división no era necesario recurrir a un cultivo largo (18-24 horas) para observar dicha actividad tal y como muestran algunos autores, pudiendo ser suficiente la exposición embrionaria a un cultivo corto para evaluarlo (Joshi *et al.*, 2010). La mayoría de los embarazos fueron obtenidos bajo cultivo corto, identificándose el 47 % (10/21) de las gestaciones entre aquellos embriones con actividad mitótica adicional frente al 23 % (5/21) de los embriones en los que no se observaron ningún tipo de reanudación mitótica, tras 2-5 horas en cultivo. Pese a no existir diferencias significativas respecto a la tasa de embarazo ( $p = 0.10$ ), existe una tendencia de 2 veces mayor de presentar embarazo en aquellos embriones en los que se observó un aumento en el número de células en cultivo post-descongelación en comparación al grupo en el que no se observó ningún tipo de actividad adicional (OR: 2.90). Esto nos sugiere que se podría categorizar/ seleccionar entre aquellos embriones en los que se observen actividad mitótica adicional (Joshi *et al.*, 2010) en cultivo corto a la hora de la criotransferencia, no desechando en ningún caso aquellos embriones que no presenten reanudación mitótica en cultivo tras descongelación, ya que, dieron lugar a nacidos vivos. Esto último podría deberse a que el tiempo que tarde los embriones en reactivar la actividad mitótica tras descongelación dependa de la edad de la mujer, de la fisiopatología de la esterilidad, de las condiciones de cultivo o del sistema de crioconservación utilizado en el laboratorio.

Respecto a la criotransferencia también se valoró el estadio de desarrollo embrionario en que fueron vitrificados. Tras los análisis realizados no se observaron diferencias significativas en la tasa de embarazo con respecto a la elección del estadio embrionario transferido ( $p = 0.83$  en D+3;  $p = 0.70$  en D+5;  $p = 0.88$  en D+6). Los resultados obtenidos fueron del 31 % (12/38) de los embarazos en cuya transferencias fueron llevadas a cabo en embriones en estadio de división (D+3), el 25 % (2/8) en embriones estadio de blastocisto (D+5) y el 33 % (2/6) en blastocistos eclosionando (D+6).

Según nuestros resultados, el estadio de los embriones en que fueron crioconservados no efectan a la hora de obtener gestación. Aunque debemos de plantear otros factores a la hora de seleccionar el estadio embrionario a transferir como puede ser el tipo de respuesta de las pacientes tras EOC y la optimización de un buen sistema de cultivo a blastocisto. Como ocurre en el caso de FIV4, el 54 % de sus pacientes fueron pobres respondedoras ( $\leq 3$  ovocitos obtenidos) tras un ciclo de EOC, el cual, disminuye el número de

embriones generados en el laboratorio. Esto provoca que gran parte de los embriones sean vitrificados en estadio de división (D+3), puesto que muchos de ellos pudieran no llegar a estadio de blastocisto. Por ello, en aquellas mujeres normo y altas respondedoras tras EOC podrían generarse un mayor número de embriones en el laboratorio, seleccionando aquellos de mayor calidad para prolongarlos a cultivo largo y poder obtener blastocistos para vitrificar. Esto ha mejorado gracias a equipos de videografía como son el Embryoscope®, EEVA® y Primo vision® que evalúan la morfocinética de los embriones en la incubadora, evitando así, la exposición a un estrés adicional causada por la constante manipulación y el cambio de las condiciones de cultivo (temperatura, CO<sub>2</sub>, pH, osmolaridad) debido a la valoración morfológica diaria. Dichos equipos aumentan el desarrollo de blastocistos en el laboratorio y con ello, el incremento en un 10-15 % en las tasas de implantación (Meseguer *et al.*, 2011).

Finalmente se valoró la calidad embrionaria previa a la vitrificación en relación a la tasa de embarazo. Debido a que la mayoría de las criotransferencias se realizaron con embriones en estadio de división, en estos casos y bajo consenso con la paciente, se solían transferir 2 embriones por ciclo. En función de la capacidad de implantación de los embriones se estableció 3 tipos de calidad embrionaria en las criotransferencias: buena calidad referido a aquellos embriones tipo A y B antes de la vitrificación, mala calidad referido a embriones tipo C y D, y calidad regular referido a la transferencia de al menos un embrión de buena calidad. De todas las transferencias de embriones crioconservados en D+3, el 50 % (6/12) de los embarazos fueron con embriones de buena calidad, el 33 % (4/12) de mala calidad y el 16 % (2/12) de calidad regular. Al observar un mayor número de gestaciones en embriones de mala calidad en comparación con aquellos de calidad regular, hace replantearnos que las condiciones óptimas del vientre materno podrían modificar aquellas alteraciones morfológicas a medida que avanza el estadio embrionario *in vivo*, o que otros factores como el patrón genético del embrión determine el éxito del embarazo (Braude, 2013). En cambio los embarazos que se obtuvieron con embriones en estadio de blastocisto (D+5 y D+6) fueron aquellos de buena y regular calidad ( $n= 4$ ), pudiendo ser determinante una mejor calidad a la hora de la transferencia en estadios más avanzados.

Dichos resultados no son extrapolables debido al bajo número de casos presentado en este trabajo, siendo necesario un incremento muestral para verificar dichas hipótesis y demostrar si realmente existen diferencias significativas en las variables analizadas.

En resumen, no es posible recomendar un método de preparación endometrial sobre otro en criotransferencias. Podría ser requerido un tratamiento individualizado dependiendo de las características de la paciente para optimizar el estado de receptividad uterina. Además la elección de un tiempo de cultivo corto y la observación de actividad mitótica adicional postdescongelación en embriones en estadio de división, podría aumentar el número de gestaciones aplicado bajo un sistema de vitrificación. Se requiere la necesidad de realizar futuros ensayos aleatorios prospectivos para verificar dichas hipótesis, no sólo frente a las tasas de embarazo, sino también considerar la conveniencia y la eficiencia en los costes establecidos.

## ***6. CONCLUSIONES***

1. No existen diferencias significativas en las tasas de embarazo respecto al tipo de preparación endometrial establecido, ya sea mediante ciclo natural o ciclo sustituido, en transferencias de embriones crioconservados.
2. No se han encontrado diferencias significativas en tasas de embarazo en la elección del tiempo de cultivo utilizado en embriones descongelados, ya sea mediante cultivo corto (2-5 horas) o cultivo largo (18-24 horas), en criotransferencias embrionarias.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

1. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2008.
2. Bjuresten K, Landgren BM, Hovatta O, Stavreus-Evers A. Luteal phase progesterone increases live birth rate after frozen embryo transfer. *Fertil Steril*. 2011; 95(2): 534-537.
3. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod*. 2010; 25(8): 2092-2100.
4. Braat DD, Schutte JM, Bernardus RE, Mooij TM, van Leeuwen FE. Maternal death related to IVF in the Netherlands 1984-2008. *Hum Reprod*. 2010; 25(7): 1782-1786.
5. Braude P. Selecting the 'best' embryos: prospects for improvement. *Reprod Biomed Online*. 2013; 27(6): 644-653.
6. Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2009; 92(4): 1306-1311.
7. Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril*. 2009; 91(6): 2399-2407.
8. Dain L, Bider D, Levron J, Zinchenko V, Westler S, Dirnfeld M. Thin endometrium in donor oocyte recipients: enigma or obstacle for implantation? *Fertil Steril*. 2013; 100(5): 1289-1295.
9. Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Garrido N, Pellicer A, Simón C. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2013; 99(2): 508-517.
10. Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, Paiva P, Salamonsen LA. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int J Dev Biol*. 2010; 54 (2-3): 313-322.
11. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*. 2013; 9(12): 735-749.

12. Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2012; 18(5): 536-554.
13. Egbert R.te Velde and Peter L.Pearson. The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update*. 2002; 8(2):141-154.
14. El Toukhy T, Taylor A, Khalaf Y, Al Darazi K, Rowell P, Seed P, Braude P. Pituitary suppression in ultrasound-monitored frozen embryo replacement cycles. A randomised study. *Hum Reprod*. 2004; 19: 874–879.
15. El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, Sunkara K, Seed P, Khalaf Y, Braude P. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*. 2008; 89: 832–839.
16. Escudero Velando LE. Estimulación ovárica en reproducción asistida. *Rev peru ginecol. obstet*. 2012; 58 (3): 191-200.
17. Fatemi HM, Kyrou D, Bourgain C, Van den AE, Griesinger G, Devroey P. Cryopreserved-thawed human embryo transfer: spontaneous natural cycle is superior to human chorionic gonadotropin-induced natural cycle. *Fertil Steril*. 2010; 94: 2054–2058.
18. Fatemi HM, Popovic-Todorovic B. Implantation in assisted reproduction: a look at endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online*. 2013; 27(5): 530-538.
19. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011; 26(7): 1616-1624.
20. Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10-32.
21. Gelbaya TA, Nardo LG, Hunter HR, Fitzgerald CT, Horne G, Pease EE, Brison DR, Lieberman BA. Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study. *Fertil Steril*. 2006; 85(3): 603-609.

22. Germán Zurriarán R. La progresiva desprotección jurídica de la vida humana embrionaria en España: de la ley 35/1988 a las leyes 14/2006 y 14/2007. *Cuad Bioet.* 2009; 20(69): 155-181.
23. Ghobara T, Vandekerckhove P. Cycle regimens for frozen-thawed embryo transfer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 1: CD003414.
24. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 7: CD002118.
25. 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 meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(5): 458-470.
26. Groenewoud ER, Macklon NS, Cohlen BJ; ANTARCTICA trial study group. Cryo-thawed embryo transfer: natural versus artificial cycle. A non-inferiority trial. (ANTARCTICA trial). *BMC Womens Health.* 2012; 12-27.
27. Guo L, Luo C, Quan S, Chen L, Li H, Guo Y, Han Z, Ou X. The outcome of different post-thawed culture period in frozen-thawed embryo transfer cycle. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30(12): 1589-1594.
28. Hancke K, More S, Kreienberg R, Weiss JM. Patients undergoing frozen-thawed embryo transfer have similar live birth rates in spontaneous and artificial cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29: 403-407.
29. Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet.* 2012; 131(2):175-186.
30. Hill MJ, Miller KA, Frattarelli JL. A GnRH agonist and exogenous hormone stimulation protocol has a higher live-birth rate than a natural endogenous hormone protocol for frozen-thawed blastocyst-stage embryo transfer cycles: an analysis of 1391 cycles. *Fertil Steril* 2010; 93: 416-422.
31. Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil Steril.* 2010; 94(2): 389-400.
32. Jørgensen N, Joensen UN, Jensen TK, Jensen MB, Almstrup K, Olesen IA, Juul A, Andersson AM, Carlsen E, Petersen JH, Toppari J, Skakkebaek NE. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study

- of 4867 men. *Reproductive medicine, obstetrics and gynaecology*. *BMJ Open*. 2012; 2: e000990 doi: 10.1136/bmjopen-2012-000990.
33. Joshi BV, Banker MR, Patel PM, Shah PB. Transfer of human frozen-thawed embryos with further cleavage during culture increases pregnancy rates. *J Hum Reprod Sci*. 2010; 3(2):76-79.
34. Kaser DJ, Ginsburg ES, Missmer SA, Correia KF, Racowsky C. Intramuscular progesterone versus 8% Crinone vaginal gel for luteal phase support for day 3 cryopreserved embryo transfer. *Fertil Steril*. 2012; 98(6): 1464-1469.
35. Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, Dhont M. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Human Reproduction*. 2001; 16(3): 476–480.
36. Lebovitz O, Orvieto R. Treating patients with "thin" endometrium - an ongoing challenge. *Gynecol Endocrinol*. 2014 [Epub ahead of print].
37. Lee VC, Li RH, Chai J, Yeung TW, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Effect of preovulatory progesterone elevation and duration of progesterone elevation on the pregnancy rate of frozen-thawed embryo transfer in natural cycles. *Fertil Steril*. 2014; 101(5): 1288-1293.
38. Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, Islin H, Hviid T, Rex S, Bangsbøll S, Sørensen S. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil Steril*. 2002; 78(2): 221-233.
39. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011; 26(10): 2658-2671.
40. Min JK, Hughes E, Young D, Gysler M, Hemmings R, Cheung AP, Goodrow GJ, Senikas V, Wong BC, Sierra S et al. Elective single embryo transfer following in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010; 32: 363–377.
41. Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med*. 2003; 48: 137– 147.
42. Nawroth F, Ludwig M. What is the 'ideal' duration of progesterone supplementation before the transfer of cryopreserved-thawed embryos in estrogen/progesterone replacement protocols? *Hum Reprod*. 2005; 20(5): 1127-1134.

43. Nayak S, Ochalski ME, Fu B, Wakim KM4, Chu TJ, Dong X, Wakim AN. Progesterone level at oocyte retrieval predicts in vitro fertilization success in a short-antagonist protocol: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2014; 101(3):676-682.
44. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*. 2001; 345(19): 1400-1408.
45. OMS. Laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 2010.
46. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 7: CD003416.
47. Park SJ, Goldsmith LT, Skurnick JH, Wojtczuk A, Weiss G. Characteristics of the urinary luteinizing hormone surge in young ovulatory women. *Fertil Steril*. 2007; 88: 684–690.
48. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*. 2009; 15(2):229-236.
49. Rato ML, Gouveia-Oliveira A, Plancha CE. Influence of post-thaw culture on the developmental potential of human frozen embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29(8): 789-795.
50. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, Checa MA. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013; 99(1): 156-162.
51. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2013; 100(3): 818-824.
52. Saha PK, Goel P, Tandon R. Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) Presented as Massive Hydrothorax. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7(12): 2996-2997.
53. Savage T, Peek J, Hofman PL, Cutfield WS. Childhood outcomes of assisted reproductive technology. *Hum Reprod*. 2011; 26(9): 2392-2400.
54. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013; 100(3): 608-614

55. Tomax C, Alsbjerg B, Martikainen H, Humaidan P. Pregnancy loss after frozen-embryo transfer-a comparison of three protocols. *Fertil Steril*. 2012; 98: 1165–1169.
56. Vloeberghs V, Peeraer K, Pexsters A, D'Hooghe T. Ovarian hyperstimulation syndrome and complications of ART. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2009; 23(5): 691-709.
57. Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8772.
58. Wu Z, Li R, Ma Y, Deng B, Zhang X, Meng Y, Chen X, Liu P, Qiao J. Effect of HCG-day serum progesterone and oestradiol concentrations on pregnancy outcomes in GnRH agonist cycles. *Reprod Biomed Online*. 2012; 24(5): 511-520.
59. Yanushpolsky E, Hurwitz S, Greenberg L, Racowsky C, Hornstein M. Crinone vaginal gel is equally effective and better tolerated than intramuscular progesterone for luteal phase support in in vitro fertilization-embryo transfer cycles: a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2010; 94(7): 2596-2599.
60. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*. 2009; 92 (5): 1520-1524.
61. Zhu Y, Huang H, Zhou F. [Analysis of factors influencing the clinical in a frozen thawed embryo transfer program]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2001; 36(5): 290-292.
62. Ziebe S, Bech B, Petersen K, Mikkelsen AL, Gabrielsen A, Andersen AN. Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer. *Hum Reprod*. 1998; 13(1):178-181.
63. Zimmermann G, Ackermann W, Alexander H. Epithelial human chorionic gonadotropin is expressed and produced in human secretory endometrium during the normal menstrual cycle. *Biol Reprod*. 2009; 80: 1053–1065.