

## Influencia de los medios y día de vitrificación en los resultados en pacientes con transferencia diferida

## Influence of media and vitrification day in outcoms in patients with delayed transference

D. Cano, R. Blanes, S. Hess, J. González, R. Vaca, A. Fernández, D. Báez, R. Rodríguez  
Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Santa Cruz de Tenerife.  
Master en Reproducción Humana Título Propio. Universidad de La Laguna.

### RESUMEN

**Introducción:** La criopreservación es una parte fundamental de los tratamientos de reproducción asistida. La vitrificación como método de criopreservación se ha convertido en la técnica mas ampliamente utilizada. Para mejorar los resultados en pacientes con síndrome de hiperestimulación ovárica la mejor opción es la criopreservación de los embriones aumentando la probabilidad de embarazo en un transfer diferido.

**Objetivos:** Comparar dos medios de criopreservación (Irvine® y Origio®) basados en la vitrificación de embriones en día +2 y en día +3 y la causa por la cual estos fueron vitrificados. Los factores principales de estudio fueron supervivencia, tasa de gestación, implantación y aborto.

**Material y métodos:** En este análisis retrospectivo se revisaron 899 ciclos de FIV-ICSI de mujeres sometidas a tratamiento de fertilidad en el HUC entre octubre 2008 y agosto de 2016. Los criterios de inclusión fueron mujeres con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, tratadas con bolo de agonista de GnRH o con rhCG.

**Resultados:** La supervivencia para Irvine fue 91,50 % y para Origio 74,68 %, la tasa de gestación 23 % para Origio y 31 % para Irvine, la tasa de implantación 24 % para Origio y 38 % para Irvine, con mayor implantación de múltiples para Irvine. En aborto no se encontraron diferencias significativas.

Aceptado:10/10/2017  
Correspondencia: Damaris Cano  
C/Hermano Pedro 51  
38395 Granadilla de Abona Tenerife  
Damaris.cano9@gmail.com  
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

---

**Discusión:** Irvine obtiene mejores resultados en los factores principales, excepto en aborto que fueron similares para los dos medios. Origio obtuvo menor rendimiento y peores resultados en todos los factores. Se planteó la hipótesis de si DMSO juega un papel importante en la supervivencia embrionaria. El día +3 de congelación en Irvine resultó tener mejor tasa de supervivencia y de gestación.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2017; 34; 3-11 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Palabras Clave:** *Criopreservación, Vitrificación, Supervivencia, Gestación, Aborto, Implantación.*

## SUMMARY

**Introduction:** Cryopreservation is a fundamental part of assisted reproduction treatments. Vitrification as a cryopreservation method has become the most widely used technique. To improve the results in patients with ovarian hyperstimulation syndrome the best option is the embryos cryopreservation by increasing the probability of pregnancy in a deferred transfer. **Objectives:** To compare two cryopreservation media (Irvine and Origio) based on the embryos vitrification in day +2 and day +3 and the reason why these were vitrified. The main factors of study were survival, gestation rate, implantation and abortion.

**Material and methods:** This retrospective analysis, 899 IVF-ICSI cycles of women through fertility treatment in the HUC between October 2008 and August 2016 were reviewed. The inclusion criteria were women at risk for ovarian hyperstimulation syndrome, treated with procrín bolus or rhCG.

**Results:** Survival for Irvine was 91.50% and 74.68% for Origio, gestation rate for Origio was 23% and 31% for Irvine and the implantation rate for Origio was 24% and 38% for Irvine, with higher implantation of multiple on Irvine. In abortion, no statistical significance was found.

**Discusión:** Irvine achieved better results in the main factors, except abortion which were similar for the two media. Origio obtained lower yield and worse results in all factors. It was hypothesized if DMSO plays an important role in embryonic survival. Irvine +3 day of freeze showed better survival and gestation rates.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2017; 34; 3-11 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Keywords:** *Cryopreservation, Vitrification, Survival, gestation, abortion, Implantation.*

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) se debe principalmente a una liberación excesiva de VEGF (vascular endothelial growth factor) debido a una respuesta excesiva a gonadotropinas y sigue siendo una de las morbilidades iatrogénicas más peligrosas asociadas a la estimulación ovárica (1). La etiología de la enfermedad se desconoce pero se sabe que el síndrome solo aparece con la presencia de la gonadotropina coriónica humana (hCG) que actúa como desencadenante de los mediadores implicados en la fisiopatología. Como alternativa a la hCG se utiliza el agonista de GnRH en los protocolos antagonistas, que ocupa el receptor de GnRH hipofisario sin internalizarse y evitando la activación de los mensajeros secundarios. Provoca una liberación brusca de FSH y LH, capaz de imitar el pico fisiológico de LH y dar lugar a la maduración de los ovocitos.

Para mejorar los resultados en estas pacientes la mejor opción es la criopreservación de los embriones, posponiendo su transferencia para obtener un ambiente uterino más favorable y aumentando la probabilidad de embarazo en estos casos lo que reduciría sustancialmente el desencadenamiento del síndrome de hiperestimulación, a la vez que permite mejorar la tasa de gestación en transfer diferido donde se consigue una mejor receptividad endometrial que en transfer en fresco (2, 3).

Trounson y Mor publicaron en 1983 el primer embarazo a partir de un embrión congelado (4) hecho que marcó un antes y un después en la historia de la reproducción. En 1984 Zeilmaker y col (5) consiguieron el primer nacimiento por tranferencia de embriones congelados y desde ese momento se empezó a desarrollar el protocolo de congelación lenta como método de criopreservación de embriones.

Actualmente, la vitrificación le ha ganado campo a la congelación lenta debido a las altas concentraciones de crioprotector (8mol/L) y las tasas de enfriamiento rápido (15000-30000°C/min) evitando la formación de cristales de hielo. Además de no precisar ni equipo costoso ni largos tiempos para su aplicación en comparación con la congelación lenta.

Masashige Kuwayama pionero en la criopreservación de embriones y ovocitos en el año 2000 mejoró el método de criopreservación a través del uso del método cryotop. Este método requiere únicamente de un equilibrado en dos etapas, cargar el embrión en microgotas sobre este soporte y sumergir rápidamente en nitrógeno líquido (6). Este volumen mínimo disminuye la probabilidad de nucleación y formación de cristales de hielo en la muestra (7) consiguiendo un volumen final de 0,1 µl, 10 veces inferior al que utilizan el resto de sistemas (8). Cryotop permite alcanzar una velocidad de enfriamiento de 43000°C/min, de este modo la formación de hielo es virtualmente imposible, lo que elimina totalmente el riesgo de fractura de la zona pelúcida (9).

Los métodos de criopreservación han conseguido mejorar la tasa de éxito clínico permitiendo almacenar los embriones en óptimas condiciones. Además del método de criopreservación hay otros factores que juegan un papel importante para conseguir mejorar las condiciones en esta técnica.

El estado de división en el que se encuentra el embrión el día de la criopreservación, es uno de los factores a tener en cuenta. En los inicios de la técnica se llevaba a cabo el día posterior a la fertilización cuando se observaba la aparición de los dos pronúcleos y por lo tanto se confirmaba la viabilidad del embrión. Estudios recientes revelaron mayor tasa de implantación en la transferencia de blastocitos sometidos a vitrificación (10). Esto implica que la vitrificación en estadios embrionarios más avanzados puede dar mejores resultados debido a una mejor valoración de los parámetros morfológicos que se pueden analizar a partir de día +2.

Los parámetros comúnmente más analizados en todos los laboratorios son el número de células, ritmo de división, porcentaje y fragmentación celular, simetría celular y multinucleación. Otros serían presencia de vacuolas, halo citoplasmático y tamaño, grosor e integridad de la zona pelúcida, siguiendo los criterios de ASEBIR (11), dando opción a escoger los mejores embriones para la vitrificación y posterior transferencia obteniendo mayores tasas de éxito.

## OBJETIVOS

Se compararon los resultados obtenidos con dos medios de vitrificación de embriones, Irvine Scientific® y Origio®, utilizados en el laboratorio de fecundación in vitro del Hos-

pital Universitario de Canarias (HUC). La causa de vitrificación de los embriones fue por Riesgo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárico (RSHO) en los que bien se desencadenó la ovulación con hCG recombinante o bien en ciclos con protocolo antagonista en que se desencadenó la ovulación con un bolo de agonista de la GnRH (Procrin®). El otro factor de estudio fue el día de congelación del embrión. Se trabajó con embriones en día +2 y día +3 y se descartaron los blastocistos debido al bajo número de ciclo registrados y para no incorporar un grupo que pudiera diferir ampliamente en cuanto a tasas de implantación. Dentro de cada grupo se estudió la tasa de supervivencia, tasa de gestación, tasa de implantación, edad y tasa de aborto. Se propone determinar que medio proporciona mejores resultados y además en que día es más óptimo vitrificar en cada caso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este análisis retrospectivo se revisaron 899 ciclos de FIV-ICSI de mujeres sometidas a tratamiento de fertilidad en el Hospital Universitario de Canarias entre octubre de 2008 y agosto de 2016.

Los criterios de inclusión fueron: transferencia de embriones congelados en mujeres con riesgo de hiperestimulación ovárica tratadas con bolo de procrin® (acetato de leuprorelina, agonista GnRH) antes de la punción (748) y mujeres con riesgo a hiperestimulación (151) después de la punción tratadas con ovitrelle® (hCG recombinante). Todos los embriones de la cohorte fueron congelados. Además de clasificar las pacientes según el riesgo, se hace una segunda clasificación según el medio utilizado para criopreservar dichos embriones. MediCult Vitrification (Origio) y Vit Kit®-Freeze (Irvine Scientific) fueron las marcas comerciales utilizadas para la criopreservación.

Los datos recogidos incluyen: edad materna en el momento de la transferencia, técnica de fertilización de óvulos (FIV/ICSI), el número de embriones congelados, el día en el que se encontraban los embriones cuando se congeló, embriones que sobreviven a la descongelación, embriones transferidos, número de ciclo (primero, segundo, tercero), número de células del embrión transferido, causa infertilidad (factor femenino, factor masculino, mixto, mujer sola, esterilidad de origen desconocido y otros), protocolo (Antagonista, largo), número de ovocitos obtenidos y si estos y tasa de fertilización.

La clasificación de los diferentes grupos se puede seguir en la figura 1.

Los embriones se evaluaron el día +1, +2, +3 después de la fertilización (FIV-ICSI). La calidad del embrión se asignó según el criterio ASEBIR, calidad A, B, C en referencia al

FIGURA 1

Clasificación de grupos de estudio

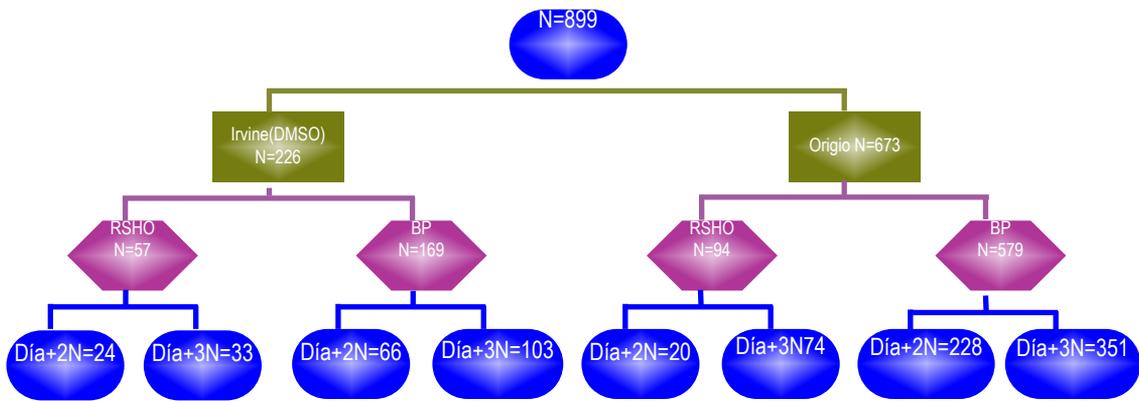
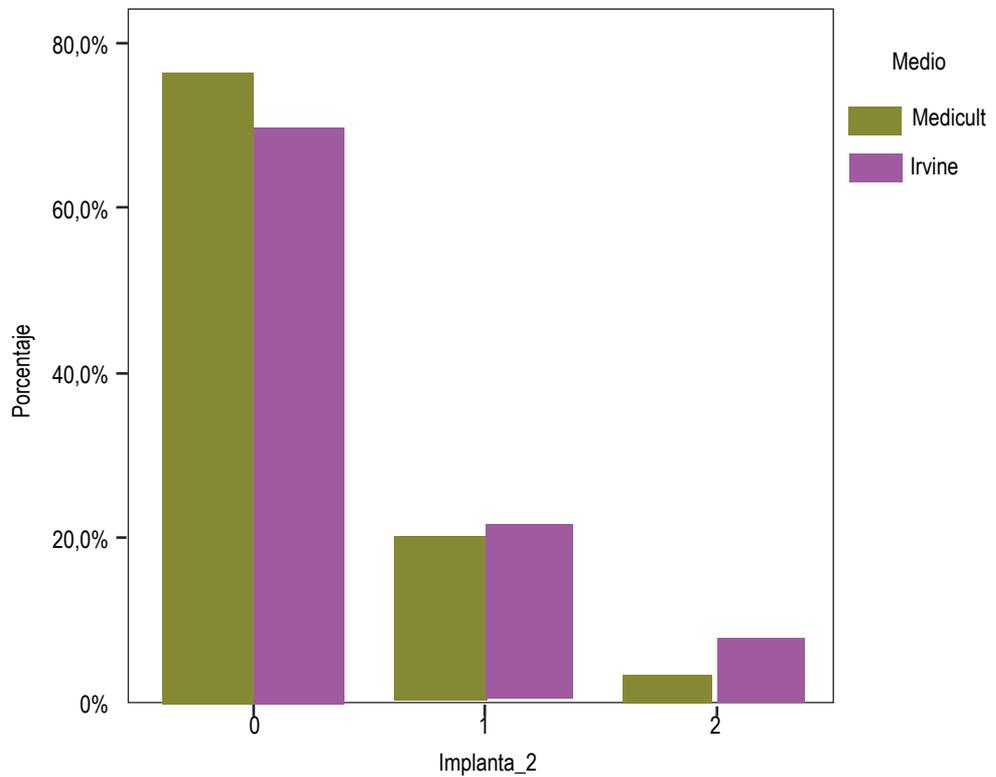


FIGURA 2

Distribución comparativa de la implantación para los dos medios



cuadernillo de ASEBIR de calidad (los embriones de calidad D no son congelados) (11).

Los embriones fueron criopreservados en día +2 o día +3 después de asignarles la calidad correspondiente para el proceso. Preferentemente se congelaron los embriones en día +3.

La vitrificación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el MediCult Vitrification Cooling (DMSO-free) y MediCult Vitrification Warming (DMSO-free) de la casa comercial Origio. Para la casa comercial Irvine Scientific se siguieron las instrucciones del fabricante de Vitrification Freeze Kit y Vitrification Thaw Kit.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versión 21, SPSS Inc. Análisis de Varianza. En todos los contrastes se ha comprobado la igualdad de varianzas que o bien se cumplía o bien se aprecia la varianza mayor en el grupo mayor. También se utilizó el test chi cuadrado.

## RESULTADOS

Se recogió en la tabla 1 los resultados para el grupo de estudio de supervivencia. Se observó significación estadística entre los medios (ver tabla 1). Se obtuvo mayor tasa de supervivencia para los embriones vitrificados con Irvine® (74,68 % vs 91,50 %  $p < 0,001$ ) y entre la interacción entre el día de congelación y el medio ( $P = 0,002$ ), Origio® mejoró su tasa de supervivencia vitrificando embriones en día +2 (78,30 % vs 72,56 %), en cambio Irvine® presentó mejores resultados vitrificando en día +3 (87,17 % vs 94,36 %). Además del medio de vitrificación y el día de congelación también se valoró la causa de criopreservación de embriones y las diferentes interacciones entre los grupos pero no se obtuvieron diferencias significativas. En la tabla 2 se recogieron los resultados para gestación, implantación y edad. En cuanto a la gestación también se encontró diferencias sig-

nificativas para el medio de vitrificación de embriones. Irvine® obtuvo mayores tasas de gestación que Origio® (30,97 % vs 23,03 %  $p = 0,006$ ) Para el resto de factores e interacciones no se encontró significación estadística excepto para la interacción entre medio-causa-día de congelación. En el caso de Irvine® se obtuvieron mayores tasas de gestación cuando se vitrificó en caso de BP en día +3 y en caso de RSHO en día +2. (32,04 % vs 41,67 %  $p = 0,031$ ). Irvine obtuvo mayor tasa de implantación que Origio® (20,10 % vs 14,61 %  $p = 0,021$ ) pero no se obtuvieron mas diferencias significativas. En cuanto a la edad únicamente encontramos significación estadística entre los grupos de causa de criopreservación, siendo mayor en el caso mujeres con RSHO que en mujeres con BP (34,87 vs 33,17  $p < 0,001$ ).

Tal como se observa en la tabla 2, la tasa de implantación obtenida con medio Irvine es significativamente mayor que la obtenida con Origio (20,1 % vs 14,6 %,  $p = 0,021$ ) y además de ello, vemos en la tabla 3 que además se obtiene una tasa de gestaciones gemelares mayor con el medio de Irvine (8,07 % vs 3,28 % respecto al total de pacientes de cada grupo,  $p = 0,012$ ). Respecto al total de gestaciones del grupo con Irvine, el 29,5 % serían gestaciones gemelares.

En la tabla 4 se registra en términos de rendimiento de la técnica, el número de embriones necesarios para conseguir una gestación en cada uno de los cuatro grupos, y como puede observarse el número de embriones que se necesitan para conseguir una gestación con el medio Irvine es mucho menor que con Origio (8,05 vs 17,12 para RSHO, y 9,45 vs 25 para BP,  $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que la edad no fue significativa en la comparación de datos entre medios. Fue una cuestión de gran relevancia en nuestro estudio comparar

TABLA 1

Resultados para supervivencia						
Supervivencia						
	Origio		Irvine		Irvine	
			Día 2	Día 3	Día 2	Día 3
N	672	226	248	424	90	136
Media	74,68%	91,50%	78,30%	72,56%	87,17%	94,36%
Desv tip.	27,81%	19,85%	27,23%	27,96%	23,02%	16,93%
P	<0,001			0,002		

TABLA 2						
Resultados para gestación, Implantación y edad.						
	Gestación		Implantación		Edad	
	Origio	Irvine	Origio	Irvine	RSHO	BP
N	673	226	609	223	150	743
Media	23,03%	30,97%	14,61%	20,10%	34,87	33,17
Desv tip.	42,13%	46,34%	28,77%	33,46%	4,47	4,01
P	0,006		0,021		<0,001	

TABLA 3			
Resultados Nº de embriones implantados			
Medio	Embriones Implantados		
	0	1	2
Origio	76,35%	20,36%	3,28%
Irvine	69,96%	21,97%	8,07%
P	0,012		

las edades de las pacientes de los dos grupos de medio de vitrificación, para descartar que no fuera la causa que determinara la diferencia en los resultados. La edad juega un papel muy importante tanto en la calidad ovocitaria como en la posterior calidad embrionaria, tasas de gestación e implantación tal y como se describió en artículos anteriores (12-14). La edad obtuvo significación ( $p=0,000$ ) según la causa RSHO en los dos medios lo que es muy congruente con el hecho de que son pacientes que a priori no se espe-

raba que pudieran hiperestimularse precisamente por ser de mayor edad.

El 91,5 % de los embriones vitrificados con Irvine sobrevivieron al proceso quedando por detrás Origio con 74,68 % de supervivencia para su grupo de embriones. Los resultados del estudio revelaron que para el medio Origio se consiguió una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0,002$ ) en la tasa de supervivencia embrionaria cuando se vitrificó en día +2 y por el contrario, cuando vitrificamos con Irvine, son significativamente mejores las tasas de supervivencia embrionaria vitrificando en día +3. Estos resultados podrían declinar en que el mejor día de vitrificación del embrión con Origio fuera el día +2 obteniendo mayores porcentajes de supervivencia igual que para Irvine vitrificando en día +3. Kuwayama, referente mundial en vitrificación, publicó en 2005 mediante el método cryotop supervivencias del 98 % en embriones de 4 células, además de un 90 % para blastocitos (15). En referencia a otros estudios no encontraron diferencias significativas en la supervivencia cuando se criopreservó los embriones en día +2 o día +3 (16).

TABLA 4		
Rendimiento en número de embriones que se requiere descongelar por gestación conseguida.		
Medio	Causa	NºEmbriones descongelados por gestación
Irvine	RSHO	8,05
	BP	9,45
Origio	RSHO	17,12
	BP	25

P<0,05

---

Para los medios de vitrificación de estudio en este trabajo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los principales factores excepto para el aborto, a favor de Irvine. Esto nos llevó a pensar que su composición tenía relevancia en su justificación.

La composición de los medios de vitrificación muestra diferencias que básicamente radican en el DMSO (dimetilsulfóxido) que se encuentra ausente en la composición de la casa comercial Origio en los medios usados en este trabajo. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de si DMSO como crioprotector penetrante y de bajo PM, juega un papel importante en la supervivencia embrionaria.

DMSO puede producir efecto tóxico sobre la célula. Aunque en estudios anteriores sobre tejidos celulares (17, 18) demostraron que la ausencia total de este en el medio de criopreservación disminuía la supervivencia celular y que a su vez en bajas concentraciones puede, además de no causar efecto tóxico, contribuir a un aumento de la supervivencia celular. Otro estudio, en este caso sobre embriones, comparó dos protocolos de vitrificación con osmolaridades similares, uno de ellos contenía DMSO y el otro no. Los resultados concluyeron que DMSO en el medio de criopreservación protege la integridad de la membrana embrionaria (19). Esto, a su vez, nos lleva a una mejor tasa de supervivencia embrionaria que a su vez nos permite conseguir mejores resultados tanto en gestación como en implantación. Ya en 1993 se planteó la idea de que el tamaño de las blastómeras podía afectar a la difusión del crioprotector en las células, produciendo daños celulares durante la congelación (20). Quizás por este motivo, al ser inferior el tamaño de las blastómeras en día +3 permite una mejor difusión del DMSO (más efectiva) que en día +2, cuando el tamaño es mayor debido a una inferior división, y por lo tanto esto produce daño celular y una menor supervivencia cuando vitrificamos en día +2 con Irvine.

Los resultados mostraron que la tasa de gestación fue significativamente mayor ( $p=0,006$ ) para las pacientes cuyos embriones fueron vitrificados con Irvine con un total de 30,97 % de media muy distante al 23,03 % presentado por Origio. Cuando la causa de vitrificación de embriones fue RSHO la tasa de gestación fue mayor para los embriones vitrificados en día +2 en Irvine, en cambio cuando la causa fue BP la tasa de gestación fue mayor para los embriones congelados en día +3. Por lo tanto, cada causa de criopreservación de embriones obtiene mayores gestaciones en días de congelación embrionaria diferentes. Otros autores no encontraron diferencia significativa en la tasa de gestación según si el embrión se encontraba en día +2 o día +3 (21). Un segundo estudio, logró tasas de gestación del 61 % cuando se vitrificaron embriones en día +3 y estos alcanza-

ron la etapa de blastocito (22), planteando la opción de alta tasa de supervivencia vitrificando en Irvine en día +3 y alta tasa de gestación si el embrión llegara a blastocisto. Esta opción parece interesante, puesto que la tasa de implantación mejora si se transfiere en blastocisto, y lo que debería de considerarse en el laboratorio para desarrollar este protocolo de trabajo sería la necesidad de descongelar un mayor número de embriones para llevar a cultivo a blastocisto y realizar la mejor selección en la transferencia.

En cuanto a las diferencias en las tasas de gestación para Irvine en día +2 y día +3 puede ser cuestionable debido a que el estadio de división en el que se encuentran los embriones no es siempre el mismo en día +2 o día +3. Podemos encontrar un embrión en día +2 en estadio de 2 blastómeras, 3 o 4. En 2015 se publicó un artículo en el que destacaron el número de blastómeras por delante del día de división para obtener una mayor tasa de implantación, sincronizando el endometrio con el estadio del embrión (23). Quizás sería destacable estudiar estas propiedades para obtener mejores conclusiones en este punto.

En cuanto al rendimiento de los medios por los datos obtenidos en descongelación de embriones por gestación se observa que es necesario descongelar muchos más embriones para conseguir una transferencia en Origio que en Irvine. Todo el proceso desde que se inicia la estimulación de la mujer hasta que se consigue una gestación cuando se trabaja con el medio de vitrificación Origio se ve afectado, aumentando en inversión. Se necesitarán mayor cantidad de embriones y por lo tanto más tiempo invertido y todo lo que esto implica.

La tasa de implantación también fue superior para Irvine con respecto a Origio, siendo de 20,10 % la tasa de implantación para Irvine y de 14,61 % la de Origio. No se obtuvieron resultados significativos para el día de congelación del embrión en cuanto a la implantación. El día de desarrollo en el que se encuentra el embrión cuando se lleva a cabo la crioconservación genera cierta controversia. Hay autores que proponen día +2 (24) como óptimo para conseguir mayores tasas de gestación, en cambio hay autores que proponen día +3 (25) y otros que no obtuvieron resultados significativos en la tasa de implantación en cuanto a criopreservar en día +2 o día +3 (26) igual que en nuestros resultados. MJ de los Santos et al tampoco encontraron diferencias significativas en cuanto a implantación en día +2 o día +3 (21).

Además la tasa de gestación gemelar fue significativamente mayor para Irvine, dando una tasa global de gemelar respecto al grupo total de gestantes del 29,5 %. Este alto porcentaje podría ser indicador de decisión a la hora de escoger entre transferir uno o dos embriones conociendo los riesgos

obstétricos que un embarazo múltiple supone. Un metanálisis confirmó que la transferencia electiva de un solo embrión se asocia con una menor probabilidad de nacimiento vivo en comparación con la transferencia de dos embriones, pero que esta aumenta en el caso de una segunda transferencia mediante embriones congelados apuntando esto a la importancia de la transferencia acumulada a la hora de determinar las tasas de gestación. Pero hay que tener en cuenta que este estudio trabajó con mujeres en edades jóvenes, cuando las mujeres pertenecían al grupo de edad más avanzada los resultados descendieron (27). Como ya se sabe, las tasas de cesárea y parto prematuro aumentan el riesgo obstétrico en embarazos múltiples concebidos a través de técnicas de reproducción asistida (28) y la transferencia electiva de un solo embrión reduce significativamente el riesgo de parto prematuro y bajo peso al nacer.

## CONCLUSIONES

La vitrificación con Irvine obtiene mejores resultados en cuanto a la tasa de supervivencia, gestación e implantación que Origio.

En caso de BP, vitrificando con Irvine, en día +3 se obtienen mejores resultados en supervivencia y gestación.

Cuando se trabaja con Origio se obtienen mejores resultados si se vitrifica en día +2.

El DMSO juega un papel importante en la composición de los crioprotectores, favoreciendo la tasa de supervivencia embrionaria.

En BP con Irvine habría que valorar la opción de transferencia de un solo embrión en los casos más favorables para reducir la incidencia de embarazos gemelares.

Con Irvine se consigue una mayor tasa de gestación acumulada con un mayor rendimiento de los embriones vitrificados frente Origio.

## BIBLIOGRAFIA

- Gunnala V, Melnick A, Irani M, Reichman D, Schattman G, Davis O, et al. Sliding scale HCG trigger yields equivalent pregnancy outcomes and reduces ovarian hyperstimulation syndrome: Analysis of 10,427 IVF-ICSI cycles. *PLoS ONE*. 2017; 12(4): e0176019.
- Atkinson P, Koch J, Ledger WL. GnRH agonist trigger and a freeze-all strategy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome: A retrospective study of OHSS risk and pregnancy rates. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2014 Dec;54(6):581-5.
- Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A, van Steirteghem A, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. A lower ongoing pregnancy rate can be expected when GnRH agonist is used for triggering final oocyte maturation instead of HCG in patients undergoing IVF with GnRH antagonists. *Human Reproduction*, Volume 20, Issue 10, 1 October 2005, Pages 2887–2892.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305:707–709.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, Gent I, Rijkman CPM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*. 1984;42(2):293–6
- Kuwayama Masashige. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* 2006; 67:73-80.
- Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387–402.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive Bio-Medicine Online*. 2005;11: 300–308.
- Cobo A, Bellver J, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Pellicer A, et al. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. *Reprod. Biomed. Online*. 2008;17: 68–72
- Zhu, Dandan et al. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles —time for a new embryo transfer strategy? *Fertility and Sterility*. 2011; 95(5):1691-1695.
- Criterios ASEBIR de Valoración de Oocitos, Embriones y Blastocistos Humanos. 3ª Edición. 2015.
- Scheffer JB, Scheffer BB, de Carvalho RF, Rodrigues J, Grynberg M, Mendez Lozano DH. Age as A Predictor of Embryo Quality Regardless of The Quantitative Ovarian Response. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2017;11(1):40-46.
- Meczekalski B, Czyzyk A, Kunicki M, et al. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment. *Journal of endocrinológica Investigación*. 2016;39(11): 1259-1265.
- Sherry L, Farr L, et al. Pregnancy Loss among Pregnancies Conceived through Assisted Reproductive Technology, United States, 1999–2002. *Am J Epidemiol* 2007;165(12):1380-1388.
- Kuwayama M, Vajta G, Et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod BioMed Online*. 2005;11(5):608-614.
- Konc J, Kanyó K, Cseh S. Clinical experiences of ICSI-ET thawing cycles with embryos cryopreserved at different developmental stages. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2005;22(5):185-190.
- Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 2010;19(4):513-522.
- Liseth K, Abrahamsen JF, Bjorsvik S, Grottebo K, Bruserud O. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy*. 2005;7:328–333.
- Kartberg AJ, Hambiliki F, Arvidsson T, Stavreus-Evers A, Svalander P. Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solutions without DMSO. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:378–384.
- Nilsson E, Cloud J et al. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres. *Living Resour*. 1993; 6: 77-80.
- De los Santos, M.J. et al. Implantation Rates after Two, Three, or Five Days of Embryo Culture. *Placenta*. 2003;24 (2):S13 – S19.
- Desai N, Faten, A, et al. Clinical pregnancy and live births after transfer of embryos vitrified on day 3. *Reprod BioMed Online*. 2010;20:808-813.
- Burks H, Buckbinder J, Francis-Hernandez M, et al. Developmentally delayed cleavage-stage embryos maintain comparable implantation rates in frozen embryo transfers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015;32(10):1477-1481.
- Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R, et

- 
- al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod.* 2003;18:1890–1895.
25. **Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Martin-Pont B, Porcher R, Hugues JN, et al.** Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the outcome of frozen-thawed embryo transfers. *Fertil Steril.* 2006;86:1537–1540.
26. **Solé M, Santaló J, Rodríguez I, et al.** Correlation between embryological factors and pregnancy rate: development of an embryo score in a cryopreservation programme. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2011;28(2):129-136.
27. **McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, et al.** Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *The BMJ.* 2010;341:c6945.
28. **Baxi A, Kaushal M.** Outcome of twin pregnancies conceived after assisted reproductive techniques. *Journal of Human Reproductive Sciences.* 2008;1(1):25-28.