

¿Debemos de congelar todos los embriones para transferir en diferido? Should we transfer frozen instead of fresh embryos ?

Rocío Núñez Calonge, Pedro Caballero Peregrín
Clínica Tambre. Madrid

RESUMEN

Existen evidencias crecientes en la literatura que demuestran que la estimulación ovárica, la cual produce niveles suprafisiológicos de hormonas, puede disminuir la tasa de gestación frente a los ciclos de criotransferencias. Además, el desarrollo endometrial puede controlarse de forma más precisa en los ciclos con embriones congelados y descongelados. Ya que la criopreservación es un procedimiento de rutina en el laboratorio de FIV, y dado el incremento de resultados, la política de congelación de todos los embriones para transferir en diferido, es una alternativa emergente para mejorar los resultados en FIV. Con la política de congelar todos los embriones, se criopreservan todos los embriones obtenidos en un ciclo de FIV y la transferencia se realiza más tarde, o bien en un ciclo natural o sustituido. La ventaja de este método es que proporciona un mejor ambiente y más fisiológico a los embriones, y pueden obtenerse mejores tasas de gestación y menos morbilidad materna y perinatal. Sin embargo, existen controversias en la literatura sobre el uso generalizado de esta estrategia. Por eso, el objetivo de esta revisión es examinar la literatura al respecto, identificando resultados de estudios randomizados en los que se criopreservan todos los embriones y se comparan con los resultados de embriones en fresco. También se estudian los posibles inconvenientes de esta técnica.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2015; 32; 11-17 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *criotransferencia, congelación embriones, descongelación embriones*

Aceptado: 8/8/15
Correspondencia: Rocío Núñez Calonge
(rocio@clinicatambre.com)
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

SUMMARY

Growing evidence in the literature shows that controlled ovarian stimulation, with its supraphysiologic hormonal levels, may decrease pregnancy rate against frozen-thawed cycles. Moreover, endometrial development can be controlled more precisely during its priming for frozen-thawed embryo transfer vs. for controlled ovarian stimulation. Therefore, as the embryo cryopreservation has become a routine procedure in IVF labs, the “freeze-all” policy has emerged as an alternative to fresh ET to improve IVF outcomes.

With the freeze-all policy, the entire cohort of embryos is cryopreserved, and the ET is performed later in a natural cycle, or in a cycle with hormonal replacement for endometrial priming. The potential advantage of this method is that it provides a more physiologic environment in which ET can occur; this advantage could lead to better pregnancy rates and decrease maternal and perinatal morbidity. However, controversies remain regarding patient selection and the threshold at which a cycle becomes supraphysiologic.

The purpose of the present systematic review was to examine the literature and identify results of randomized clinical trials to assess if the cryopreservation of all embryos of good quality, and subsequent transference, is associated with improvements in the ART outcomes compared with fresh embryo transfer.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2015; 32; 11-17 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *cryopreservation, embryo freezing, thawing.*

INTRODUCCIÓN

La implantación es uno de los pasos más importantes para asegurar el éxito de un ciclo de FIV; su efectividad depende de la calidad del embrión, la interacción entre el embrión y el endometrio y la receptividad endometrial (1). La ventana de implantación es un período limitado en el cual el endometrio adquiere el estado morfológico y funcional adecuado para la unión del blastocisto. Por eso, la receptividad endometrial es esencial para la concepción, tanto en ciclos naturales como en los tratamientos de infertilidad.

Existe una evidencia creciente en la literatura que demuestra que la estimulación ovárica, con sus niveles supra fisiológicos de hormonas, puede disminuir la receptividad endometrial (2, 3). Esta interacción está mediada por los niveles de estradiol y progesterona durante la fase folicular, que conducen a cambios morfológicos y bioquímicos que alteran el endometrio. Estos niveles hormonales podrían ser causantes de la asincronía entre el endometrio y los embriones que se transfieren, originando un medioambiente que podría ser responsable del fallo de implantación (4, 5).

Además, el desarrollo endometrial puede controlarse mejor en los ciclos de criotransferencias frente a los ciclos de transferencia de embriones en fresco (6).

De entre las técnicas de reproducción asistida que existen, la donación de ovocitos es la que mejores resultados ofrece, llegando a obtenerse una tasa de gestación por ciclo de más del 60 %. En estos ciclos, el endometrio se trata artificialmente y los embriones se transfieren en un medioambiente que no sufre los efectos suprafisiológicos hormonales de

una estimulación ovárica (7). Aunque los ovocitos son de la misma calidad, algunos estudios en los que se emplean ciclos compartiendo ovocitos, encuentran mayores tasas de gestación entre las receptoras que entre las pacientes que donan sus ovocitos, lo que prueba la importancia de la receptividad endometrial (7, 8).

Ya que la estimulación ovárica puede tener efectos adversos en el endometrio, y la vitrificación de embriones ha hecho que la tasa de gestación con embriones descongelados haya aumentado en los últimos años, la política de “congelar todos los embriones”, ha emergido como una estrategia a la transferencia de embriones en fresco para mejorar los resultados de implantación (9-11).

La Sociedad para la Tecnología en Reproducción Asistida americana (SART) ha comunicado que el número de criotransferencias con ovocitos propios ha aumentado un 32 % desde 2006 a 2012, mientras que el número de ciclos en fresco ha disminuido en un 3,2 %. (12) Este incremento se corresponde con un rápido aumento en la tasa de nacidos vivos tras criotransfer en comparación con los nacidos de ciclos en fresco (13).

Este aumento en la utilización de la criotransferencia, así como la mejora de resultados, puede deberse a diferentes causas como son: mejora de las técnicas de criopreservación que reducen el daño en los embriones y por lo tanto aumentan la supervivencia post descongelación, la utilización de análogos de GnRH para prevenir la hiperestimulación ovárica que hace que se congelen todos los embriones como primera opción, y por último el descenso en el número de embriones transferidos y la tendencia general a la transfe-

rencia de embrión único, que permite que se congelen más embriones.

Sin embargo, y a pesar de las publicaciones defendiendo esta opción, el punto de vista que sigue prevaleciendo es el de transferir los embriones en el mismo ciclo de la estimulación, en la idea de que los embriones que se congelan es un beneficio añadido al ciclo, más que una iniciativa de primera elección.

El objetivo de este trabajo es revisar la literatura existente hasta el momento e identificar cuáles son los beneficios de transferir embriones congelados y descongelados frente a la transferencia en fresco, así como conocer los posibles inconvenientes.

BENEFICIOS DE LA CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Mejora en la técnica de la criopreservación de embriones

El valor clínico de la criopreservación de embriones ha incrementado espectacularmente en la última década, debido a una mayor supervivencia embrionaria, tanto de embriones en células como en blastocistos.

El primer éxito obtenido con embriones previamente criopreservados se alcanzó utilizando la congelación lenta como método de congelación, y este ha sido el método de elección en las últimas décadas. Sin embargo, más recientemente, la optimización de los métodos de vitrificación y el aumento de las tasas de supervivencia embrionaria ha conducido a la utilización de este método en la mayoría de los centros de reproducción asistida.

En estudios sistemáticos y meta análisis recientes en los que se comparan los resultados de gestación con congelación lenta y vitrificación se demuestra una mayor tasa de supervivencia tanto para embriones en células (OR 15,57; intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %) 3,68-65,82) como para blastocistos (OR 2,2; IC 95 % 1,53-3,16) (14).

Además, se ha comprobado que los resultados clínicos con la vitrificación mostraron un aumento de la tasa de embarazo clínico de más del 50 % en los grupos de vitrificación frente a la congelación lenta (OR 1,55; IC 95 % 1,03-2,32), con similares resultados en la tasa de implantación y de niño nacido (15).

En un trabajo realizado por Veleva y col. en 2013 (16) en el cual se estudiaron los factores que afectan el resultado de transferencia con embriones descongelados, concluyen que el congelar embriones de calidad óptima, el protocolo de

preparación endometrial, el número de embriones transferidos y el índice de masa corporal son los factores que afectan de forma independiente al éxito en la criotransferencia. Estos autores encuentran que en el 78 % de los ciclos en los cuales se han congelado solo embriones de buena calidad, las características morfológicas de los mismos se conservan después de la descongelación. Cuanto mayor sea la calidad inicial de los embriones, más persistirá en el momento de la descongelación, y mayor será la probabilidad de embarazo. Además, los ciclos naturales con soporte de fase lútea presentan los mejores resultados de gestación en criotransferencia. Así, la congelación de embriones de calidad óptima junto con un ciclo natural y soporte de fase lútea ofrecerá tasas de gestación similares a las de la transferencia en fresco (16).

Sin embargo, otros autores opinan que la vitrificación, aún a pesar de obtener excelentes tasas de supervivencia post descongelación y muy buenos resultados clínicos, es una tecnología relativamente nueva cuyas consecuencias no están del todo demostradas (17). Hay trabajos que demuestran que la vitrificación puede per se, alterar la metilación en los embriones de ratón (18, 19) o en otros casos ser responsable de patologías en los recién nacidos como es la macromía, incremento que no puede explicarse únicamente por factores maternos (20).

Otra propuesta para conocer los efectos reales de la criopreservación embrionaria, es la de comparar con ciclos de donación de ovocitos. Sin embargo, existen también algunas limitaciones, como el hecho de comparar donantes con pacientes infértiles, o el medio ambiente inmunológicos que puede influir en el proceso (21).

Prevención de la hiperestimulación ovárica

El principal argumento que se ha utilizado para la congelación de todos los embriones de un ciclo y transferirlos posteriormente, es la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) en las pacientes con una alta respuesta en el ciclo de inducción de ovulación.

El SHO se origina por un incremento en la permeabilidad vascular. La hCG empleada para desencadenar la ovulación parece jugar un papel muy importante en la etiología del síndrome, ya que el trofoblasto derivado de la hCG empeora dramáticamente y se prolongan los síntomas de la SHO, pudiendo alcanzar una severa hiperestimulación (22). Por eso, una estrategia importante para reducir el riesgo de SHO ha sido cancelar la transferencia embrionaria y congelar todos los embriones.

Actualmente, el protocolo de estimulación de elección para eliminar los riesgos de la SHO tanto temprana como tardía,

es de utilizar GnRH para desencadenar la ovulación, seguido de la criopreservación embrionaria (23). La desventaja de este protocolo es el inadecuado soporte de fase lútea, el cual condiciona la posibilidad de gestación, debido al empleo de GnRH, transfiriendo los embriones en fresco (24). Aunque se han realizado intentos para aumentar la tasa de gestación en estos ciclos, de forma que se han añadido pequeñas cantidades de hCG en el momento del desencadenamiento con GnRH (25), no existen estudios randomizados para conocer si se restablecen las tasas de gestación sin aumentar el riesgo de SHO.

Mejora de los resultados obstétricos y perinatales

Un meta-análisis publicado hace un par de años (26) analizó datos de 11 estudios observacionales en los resultados obstétricos y perinatales. Los autores concluyeron que los embarazos únicos conseguidos tras transferencia de embriones descongelados era significativamente menos probable que tuvieran complicaciones perinatales: mortalidad perinatal, pequeño tamaño para la edad gestacional, nacimiento pretérmino, bajo peso del recién nacido y hemorragia anteparto que cuando se transfieren embriones en fresco. Aunque la evidencia de este meta-análisis aparece en favor de la transferencia de congelados, hay bastante heterogeneidad entre los 11 estudios a nivel de diseño, población y también los protocolos de congelación y descongelación.

Un estudio más reciente (27) publica la tasa de embarazo clínico y los resultados neonatales de 1.157 transferencias de blastocistos en fresco y 645 vitrificados y descongelados. La tasa de supervivencia de descongelación de los blastocistos era del 94,4 %, obteniéndose resultados de recién nacido vivo similares con transferencias en fresco o vitrificados: 52,8 versus 55,3 respectivamente.

Todos estos estudios indican que la tasa de nacimientos después de transferencias con embriones descongelados es mejor que cuando se compara con la transferencia en fresco. Pero debería enfatizarse que estos estudios son todos observacionales, y que los embriones que se han congelado, descongelado y transferido, son los embriones “sobrantes” del ciclo o de segunda elección, ya que en fresco se transfirieron los mejores. Así, no es descabellado pensar que si se hubieran congelado y transferido embriones de primera elección, los resultados obstétricos y perinatales aún podrían mejorarse (28).

En este sentido, un estudio clínico retrospectivo (29) comparó los resultados de nacimientos únicos obtenidos en 2.531 transferencias en fresco y 4.092 criotransferencias después de elegir el embrión a transferir y vitrificarlo. Este estudio utilizó una estimulación mínima con citrato de clomifeno en combinación con dosis bajas de gonadotropinas y trans-

ferencia de embrión único. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la prematuridad, defectos totales en el nacimiento o mortalidad perinatal pero se encontró mayor peso en el nacimiento y menores incidencias debidas al bajo peso en el grupo de criotransfer. Este estudio es interesante porque además de congelarse los embriones de “primera elección”, la utilización de dosis mínimas en la estimulación podría mitigar el efecto que ejercen las hormonas en el útero cuando se compara con la estimulación en los criotransfer.

La explicación que podría darse para el aumento de los efectos adversos perinatales tras transferencias en fresco, es la afectación de la placentación temprana por la estimulación durante los ciclos de FIV. En particular, podría ser debido a los niveles supra fisiológicos de estradiol durante la inducción (30).

Por el contrario, en un estudio muy reciente en el que se realizó un análisis multivariante, se observó una asociación significativa entre criotransfer y placenta acreta (OR 3,20, 95 % IC 1,14-9,02), que permanece cuando el análisis se restringe a placenta acreta con complicaciones (OR 3,87, IC 95 % 1,08-13,81). El grosor endometrial y el nivel de estradiol eran significativamente más bajos en los criotransfer asociados a acretismo (31).

En otros estudios se ha asociado a los niveles elevados de estradiol el incremento de riesgo de poco tamaño en relación con la edad gestacional (32) o el desarrollo de preclamsia (33).

Mejora de la tasa de gestación con embriones congelados

Uno de los argumentos más fuertes a favor de la transferencia de embriones descongelados es la tasa de gestación que actualmente se consigue con ella (28). Un meta-análisis de tres estudios controlados y randomizados que incluyen 633 mujeres en las cuales se compara la tasa de gestación y aborto después de transferencia con embriones frescos y descongelados (11) demuestra que la tasa de gestación clínica con embriones descongelados es mayor, así como no hay diferencias en la tasa de aborto. Estos resultados se observaron también transfiriendo embriones de día +5 (34) y +2 (35).

No obstante, hay que interpretar estos datos con precaución. Las poblaciones estudiadas eran generalmente jóvenes, con una media de edad entre 27 y 33 años, por lo cual sería necesario conocer si estos resultados también serían aplicables a mujeres mayores de esta edad o con peor pronóstico. Un estudio realizado por Schollcraft y Katz-Jaffe en 2013 (36), con mujeres mayores de 35 años parece corroborar los resultados anteriores, aunque no se presentan datos de nacido

vivo ni resultados perinatales. En cualquier caso, en ninguno de estos estudios se presentan datos de costes en ninguna de las dos estrategias, y no se conoce por lo tanto cuales son los datos económicos de transferir embriones descongelados frente a frescos.

Sería conveniente tener más información y realizar más estudios validando los resultados en pacientes mayores o bajas respondedoras y también empleando ciclo natural, ya que en todos los trabajos mencionados anteriormente se realizaba suplementación hormonal de los ciclos de criotransfer.

Es obvio que además de la calidad embrionaria el éxito de la criotransferencia dependerá de la preparación endometrial efectiva y en el soporte de la fase lútea. Sin embargo, estas técnicas están ya muy evolucionadas. En un meta análisis realizado en 2013 se encontró que la tasa de gestación no era significativamente diferente cuando se comparaban criotransfer en ciclo natural frente a criotransfer con ciclo natural modificado, ciclo natural frente a sustituido, ciclo sustituido con y sin agonistas de la GnRH y ciclo natural frente a sustituido con agonista de la GnRH (37).

INCONVENIENTES DE LA CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Implicaciones económicas

La criopreservación embrionaria y consecuente criotransferencia, podría aumentar el coste del procedimiento frente a la transferencia en fresco. Otro coste extra incluiría el asociado con el tiempo que necesitan las pacientes para el criotransfer. En otros casos, ya que el riesgo de hiperestimulación es mínimo utilizando agonistas de la GnRH para desencadenar la ovulación, se puede caer en la tentación de aumentar la dosis de gonadotropinas para obtener más ovocitos, aumentando así los gastos.

Sin embargo, se podría pensar, que criotransferencia podría reducir el coste que supone la hiperestimulación ovárica y quizás también lo que supone los riesgos perinatales en el caso de transferencias en fresco.

Efectos de la congelación en el genoma embrionario

Con excepción de un estudio (38), no existen trabajos que hayan estudiado el efecto de la criopreservación en el ADN de los embriones humanos. En este estudio se demostró que la congelación lenta aumentaba la fragmentación de ADN de los embriones mientras que la vitrificación no causaba daños. En este estudio no fue posible establecer si los cambios en la integridad del ADN eran causados directamente por la congelación o eran secundarios a apoptosis. Sin em-

bargo, estudios realizados en animales han demostrado que tanto la congelación lenta como la vitrificación de blastocistos afecta la integridad del ADN comprobada por TUNEL (39).

Respecto a alteraciones cromosómicas, en un trabajo realizado con embriones humanos se comprobó que el nivel de poliploidia aumentaba con la criopreservación (40). Esto se atribuía a un fenómeno de fusión de blastómeras, desencadenado por la congelación en el estadio de 2 a 10 células.

Por otra parte, sería importante comprobar el efecto de la criopreservación en el DNA mitocondrial de embriones y ovocitos de mamíferos, incluidos los humanos así como establecer si la criopreservación de células que están llevando a cabo una replicación activa de ADN, puede tener un efecto sobre la integridad genética (41).

Se ha demostrado que la expresión génica puede ser diferente en embriones congelados y descongelados comparados con embriones en fresco tanto en diferentes especies como en humanos (42, 43).

Estos estudios demuestran que incluso bajo condiciones óptimas de cultivo, el estado de metilación del ADN embrionario es lábil y así, la criopreservación embrionaria, la cual implica un gran rango de factores extremos, es posible que pueda tener consecuencias para la metilación y la subsecuente expresión génica (41). Además, hay que tener en cuenta que alteraciones en la metilación pueden dar origen a defectos de imprinting y enfermedades asociadas, como es el caso del Beckwith-Eedeman o el síndrome de Angelman.

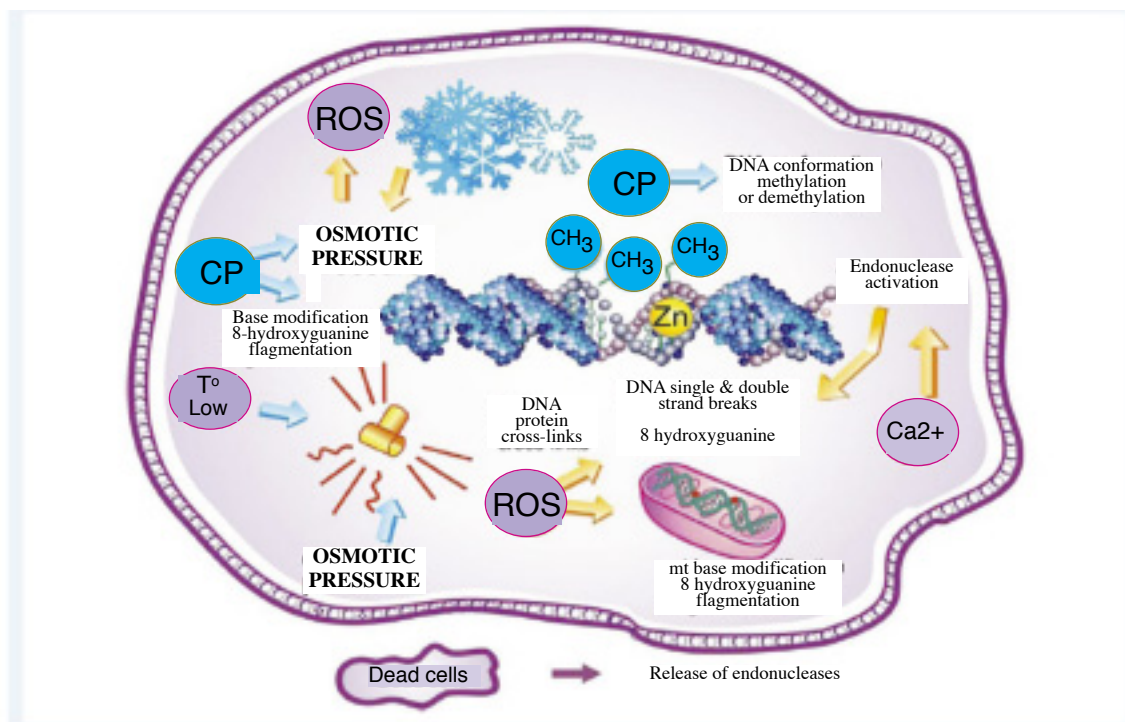
En la Figura 1 se muestran las posibles alteraciones que la criopreservación puede ocasionar en el genoma (40).

En resumen, los niños nacidos de embriones criopreservados parece ser que no están afectados por el procedimiento, según la literatura comentada hasta el momento. Incluso algunos autores sugieren que la criotransferencia puede dar lugar a niños más sanos que las transferencias en fresco (11) o mejores resultados obstétricos y perinatales (26). No obstante, estas conclusiones derivan de estudios con un alto grado de heterogeneidad, sin dar muchos detalles sobre el método de criopreservación.

La cuestión que permanece sin resolver es si la criopreservación tiene o no algún impacto directa o indirectamente en el genoma embrionario en términos de reprogramación. Son necesarios más estudios para comprobar los efectos moleculares de la exposición a los crioprotectores, particularmente cuando la criopreservación causa alguna conformación o reprogramación estructural o funcional en el genoma embrionario.

FIGURA 1

Mecanismos biológicos posibles del efecto de la criopreservación en el genoma: ROS: especies reactivas de oxígeno; CP: crioprotectores; T: baja temperatura; Ca²⁺: calcio; Zn: molécula de zinc incorporada en el complejo ADN-protamina; CH₃: ADN metilado. (De: Kopeika J, Thornhill A, and Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. 2014; Human Reproduction Update, Vol.0, No.0 pp. 1–19.)



CONCLUSIONES

- En la actualidad, la tasa de gestación con embriones previamente congelados es prácticamente similar a la que se obtiene con el transfer en fresco. Sin embargo, para pensar en utilizar como práctica de rutina la criotransferencia, hay que tener en cuenta aspectos como son el coste, tiempo empleado, y posibilidad de alteraciones de los embriones en su competencia y/o desarrollo con la congelación.

- Aunque a pesar de los resultados publicados no se puede decir que utilizar embriones congelados y descongelados sea la práctica de elección para todas las pacientes, este enfoque parece ser un modo muy eficiente de disminuir la morbilidad de los pacientes con alto riesgo de efectos adversos, particularmente aquellos con altos niveles de estradiol, elevación prematura de progesterona y alto riesgo de hiperestimulación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update 2006;12:731–46.

2. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Steirteghem AV, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin release hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. Fertil Steril 2002;78:1025–9.
3. Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, Fauser BC. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. Trends EndocrinolMetab 2004;15:84–90.
4. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. Fertil Steril 2011;95:50–60.
5. Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. Hum Reprod 1999;14:787–92.
6. Richter KS, Shipley SK, McVeary I, Tucker MJ, Widra EA. Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos. Fertil Steril 2006;86:862–6.
7. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. High ongoing pregnancy rates after deferred transfer through bipronuclear oocyte cryopreservation and post-thaw extended culture. Fertil Steril 2009; 92:1594–9.
8. Simon C, Velasco JJG, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohí J, et al. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. Fertil Steril 1998;70:234–9.

9. **Herrero L, Martínez M, García-Velasco JA.** Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr Opin ObstetGynecol* 2011;23:245–50.
10. **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S.** Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011; 96:344–8.
11. **Roque M, Lattes K, Serra S, Sol7a I, Geber S, Carreras R, et al.** Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;99:156–62.
12. **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson Loutradi KE,** Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *2014 Fertil Steril*; 102:3–9.
13. **Society for Assisted Reproductive Technology.** IVF success rate reports: 2006-2012. Available at: https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?ClinicPKID=0. Accessed February 17, 2014
14. **Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC.** Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186–193
15. **AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J.** Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2010;20:209–222.
16. **Veleva Z, Orava M, Nuojuu-Huttunen S, Tapanainen JS and Martikainen H.** Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Human Reprod* 2013; 28:9. 2425–2431.
17. **Weinerman R and Mainigi M.** Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: the translational rationale. *Fertil Steril* 2014; 102:1, 10–17.
18. **Wang Z, Xu L, He F.** Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil Steril* 2010;93:2729–33
19. **Zhao XM, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, et al.** Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Devel* 2012;79:445–50.
20. **Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN.** Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod* 2014;29:618–27.
21. **Gundogan F, Bianchi DW, Scherjon SA, Roberts DJ.** Placental pathology in egg donor pregnancies. *Fertil Steril* 2010;93:397–404.
22. **Aboulghar M.** Symposium: update on prediction and management of OHSS. *Prevention of OHSS.* *Reprod Biomed Online* 2009;19:33–42.
23. **Martinez MC, Ruiz FJ, Garcia-Velasco JA.** GnRH-agonist triggering to avoid ovarian hyperstimulation syndrome: a review of the evidence. *Curr Drug Targets* 2013; 14:843–849.
24. **Youssef MA, Van der Veen F, Al-Inany HG, Griesinger G, Mochtar MH, Aboulfoutouh I, Khattab SM, van Wely M.** Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;13:CD003719.
25. **Humaidan P, Polyzos NP, Alsberg B, Erb K, Mikkelsen AL, Elbaek HO, Papanikolaou EG, Andersen CY.** GnRH trigger and individualized luteal phase hCG support according to ovarian response to stimulation: two prospective randomized controlled multi-centre studies in IVF patients. *Hum Reprod* 2013; 28:2511–2521.
26. **Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S.** Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;98:368–377.
27. **Roy TK, Bradley CK, Bowman MC, McArthur SJ.** Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live-birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers. *Fertil Steril* 2014;101:1294–1301.
28. **Evans J, Hanna NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, Osianlis T, Salamonsen LA and Rombauts LJF.** Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Human Reprod Update* 2014; 20:6. 808-821
29. **Kato O, Kawasaki N, Bodri D, Kuroda T, Kawachiya S, Kato K, et al.** Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;161:46–50.
30. **Giorgetti C, Vanden Meerschaut F, De Roo C, Saunier O, Quarello E, Hairion D, Penaranda G, Chabert-Orsini V, De Sutter P.** Multivariate analysis identifies the estradiol level at ovulation triggering as an independent predictor of the first trimester pregnancy-associated plasma protein-A level in IVF/ICSI pregnancies. *Hum Reprod* 2013;28:2636–2642.
31. **Kaser DJ, Melamed A, Bormann CL, Myers DE, Missmer SA, Walsh BW, Racowsky C, and Carusi DA.** Cryopreserved embryo transfer is an independent risk factor for placenta accrete. *Fertil Steril* 2015;103:1176–84
32. **Griesinger G, Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Diedrich K, Van Steirteghem A, Devroey P, Ejdrup Breckjaer H, Humaidan P.** Triggering of final oocyte maturation with gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin. Live birth after frozen-thawed embryo replacement cycles. *Fertil Steril* 2007; 88:616–621.
33. **Imudia AN, Awonuga AO, Doyle JO, Kaimal AJ, Wright DL, Toth TL, Styer AK.** Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclampsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2012;97:1374–1379.
34. **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S.** Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011a;96: 344–348.
35. **Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L.** Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:357–363.
36. **Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG.** Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril* 2013;100:615–619.
37. **Groenewoud ER, Cantineau AE, Kollen BJ, Macklon NS, Cohen 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;19:458–70.
38. **Li L, Zhang X, Zhao L, Xia X, Wang W.** Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. *Mol Reprod Dev* 2012;79:229–236.
39. **Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T.** Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* 2009;91(5 Suppl.):2087–2094.
40. **Balakier H, Cabaca O, Bouman D, Shewchuk AB, Laskin C, Squire JA.** Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. *Hum Reprod* 2000;15:2404–2410.
41. **Kopeika J, Thornhill A, and Khalaf Y.** The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. 2014; *Human Reproduction Update*, Vol.0, No.0 pp. 1–19.
42. **Saenz-de-Juano MD, Marco-Jime'nez F, Pen'aranda DS, Joly T, Vicente JS.** Effects of slow freezing procedure on late blastocyst gene expression and survival rate in rabbit. *Biol Reprod* 2012;87:91
43. **Shaw L, Sneddon SF, Brison DR, Kimber SJ.** Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos. *Reproduction* 2012; 144:569–582.