



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia, i de
Medicina Preventiva
Àrea de Ginecologia

**Resultados reproductivos en mujeres
sometidas a ciclos de Fecundación in Vitro
en fresco versus ciclos segmentados
(Freeze-all)**

Tesis Doctoral

2019

Doctoranda:

Karina Andrea Lattes Altamirano

Directores:

Dr. Miguel Ángel Checa Vizcaíno

Dra. Rita Vassena

El Dr. Miguel Ángel Checa Vizcaíno, Profesor de la UAB, y la Dra. Rita Vassena, Directora Científica del grupo EUGIN,

CERTIFICAN

Que Karinna Andrea Lattes Altamirano ha realizado, bajo su dirección, el trabajo para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona, en el programa de Doctorado del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y Medicina Preventiva, titulado:

“Resultados reproductivos en mujeres sometidas a ciclos de Fecundación in Vitro en fresco versus ciclos segmentados (Freeze-all)”

Doctoranda Karinna A. Lattes Altamirano

Dr. Miguel A. Checa Vizcaíno

Dra. Rita Vassena

Barcelona, Julio de 2019

*A mis padres, por creer siempre en mí.
A Héctor y Martín, porque sin ellos la vida no tendría
sentido.
Y a Noe, por todo.*

Agradecimientos

Eso de que la vida da muchas vueltas es tan cliché que acaba siendo absolutamente cierto.

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres, quienes se esforzaron por darnos a mi hermana y a mi no sólo la mejor educación que nos pudieron dar, sino también por proporcionarme un ambiente sano y seguro donde dar rienda suelta a mi curiosidad, la confianza suficiente para emprender desafíos y la tranquilidad de siempre tener un lugar a dónde regresar si las cosas no salían como las había pensado. Me han grabado a fuego que lo mejor que se puede heredar a los hijos no son bienes materiales, sino las herramientas que te permitan ser bueno en lo que decidas hacer de tu vida. Sois los mejores ejemplos que he podido tener.

Mi completa gratitud a mis directores de tesis: al Dr. Miguel Ángel Checa, por no solo incentivar me a escribir esta tesis doctoral, sino también por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por potenciar mis ideas y enseñarme a trabajar con rigor científico. Y a la Dra. Rita Vassena, por la dedicación a este proyecto y por animarme a buscar una perspectiva diferente para abordar cada pregunta.

Gracias a mis compañeros de trabajo en CIRH (Alicia, Anna, Dani, Elena, Enrique, Maite, Manuel, María, Rosa y Sara) que no son sólo un equipo de cracks sino también unas personas maravillosas con un sentido de trabajo en equipo admirable. A Marta, Ana y Rafa, por innumerables almuerzos y charlas sobre la vida cuando las cosas han ido bien y no tan bien (que no todo es trabajo, y siempre sale el sol). A

todo el personal del CIRH, sobre todo a las enfermeras, las chicas de administración y al equipo de laboratorio, porque con su amabilidad y simpatía han hecho mi vida infinitamente más fácil. Gracias por la paciencia que siempre habéis tenido conmigo. Y especialmente a mi jefe, el Dr. Brassesco, porque es el principal culpable de que yo haya cambiado el Océano Pacífico por el Mar Mediterráneo y si no fuera por su confianza y su ayuda desinteresada desde el principio, probablemente yo no estaría aquí.

A Desirée García por el tiempo que hemos pasado hablando y revisando la estadística de este trabajo.

A mis pacientes, por motivarme siempre a seguir estudiando y aprendiendo.

Pero, por encima de todo, a mi pequeña familia “made in Spain”. Por la paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto. Porque el tiempo dedicado al mismo le ha sido “robado” a la vida familiar y, sin su apoyo esta tesis nunca se habría escrito.

A todos, infinitas gracias.

Karina Lattes Altamirano

2019

Resumen

Introducción

Los buenos resultados reproductivos obtenidos tras la transferencia de embriones criopreservados en fecundación in vitro (FIV) han provocado un aumento significativo de la proporción de ciclos segmentados que se realizan actualmente en todo el mundo. A pesar de esto, la evidencia científica disponible indica que esta estrategia sólo parece indiscutible en ciertas situaciones clínicas (prevención del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica, presencia o sospecha de anomalías endometriales al momento de la recuperación ovocitaria y/o necesidad de otras intervenciones tales como la realización de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT) o estudios de receptividad endometrial). Sin embargo, no hay evidencia publicada que analice si la edad de la mujer constituye un factor a tener en cuenta a la hora de decidir segmentar un ciclo de FIV. Por otro lado, una vez hemos decidido segmentar, surgen otras interrogantes como cuándo es el mejor momento para realizar la primera criotransferencia embrionaria. Este trabajo busca responder estas dos preguntas.

Materiales y métodos

Se plantean dos estudios de cohortes retrospectivos:

1. Comparación de resultados reproductivos de la primera transferencia en fresco (1412 ciclos) vs. ciclo segmentado (470

ciclos) en ciclos autólogos, estratificando en tres grupos de edad materna (menores de 35 años, entre 35 y 38 años y mayores de 38 años).

2. Comparación de resultados reproductivos de pacientes sometidas a una FIV segmentada que hayan realizado la primera criotransferencia de embriones durante el primer ciclo menstrual tras la punción folicular (263 ciclos) versus aquellas que la hayan realizado en ciclos posteriores (249 ciclos).

Estas comparaciones se llevaron a cabo mediante un análisis univariado (Chi-cuadrado) y multivariado (regresión logística) para ajustar por factores que potencialmente puedan generar confusión.

Resultados

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de nacido vivo en mujeres de más de 35 años, independientemente del número de ovocitos recuperados. La tasa de aborto fue significativamente más baja en los ciclos segmentados de mujeres entre 35 y 38 años, sin impacto sobre la tasa de nacido vivo.

Tampoco observamos diferencias significativas del momento en el cual se realiza la primera criotransferencia de un ciclo segmentado en la tasa de nacido vivo, embarazo clínico ni aborto.

Conclusiones

Las pacientes de menos de 35 años de edad se beneficiarían de la segmentación del ciclo de FIV para optimizar su tasa de nacido vivo.

Las pacientes entre 35 y 38 años de edad se beneficiarían de la segmentación del ciclo de FIV para disminuir su tasa de aborto.

El tiempo transcurrido entre la estimulación ovárica controlada y la primera criotransferencia de embriones en la estrategia freeze-all, no influye en las tasas de nacido vivo, embarazo clínico ni aborto. Esta nueva información permite al clínico tener en cuenta las preferencias de los pacientes al momento de decidir cuándo es el mejor momento para transferir en esta población de pacientes.

Abstract

Introduction

The promising reproductive results of frozen embryo transfers (FET) in in-vitro fertilisation (IVF) have been currently associated with a significant increase in the proportion of “freeze-all” cycles worldwide. Despite this, available evidence only supports its use in certain clinical scenarios (Ovarian Hyperstimulation Syndrome prevention, evidence of endometrial pathology and need for preimplantation genetic screening or endometrial receptivity assays). However, no published trials have assessed if the maternal age is an independent factor to take into account when deciding to undergo a freeze-all strategy. On the other hand, once we’ve decided to perform an elective freezing of all the embryos, we come across other relevant clinical questions such as when is the best moment to perform the first FET. This thesis aims to provide an answer to these questions.

Materials and methods

This thesis includes two independent studies:

1. Comparison of reproductive results of the first embryo transfer in autologous fresh (1412 cycles) versus freeze-all cycles (470 cycles, stratifying patients into three age groups (under 35 years, between 35 and 38 years, and over 38 years)).

2. Comparison of reproductive results of patients undergoing a “freeze-all” IVF cycle who have received their first FET during the first menstrual cycle after egg retrieval (263 cycles) versus those who received it in subsequent cycles (249 cycles).

We performed a univariate (Chi-square) analysis of the results and a multivariate logistic regression to adjust for potential confounders.

Results

We observed no statistically significant differences in live birth rate in women older than 35 years of age, independently of the number of retrieved oocytes. The pregnancy loss rate was significantly lower in the 35-38 years group that underwent a freeze-all cycle.

Our results showed no significant impact of timing of the first FET on live birth, clinical pregnancy or pregnancy loss rates in women undergoing a freeze-all strategy.

Conclusions

Women under 35 years of age would benefit from a freeze-all strategy to optimize their live birth rate. Women between 35 and 38 years of age would benefit from a freeze-all strategy to decrease their pregnancy loss rate.

Time elapsed between egg retrieval and the first FET in women undergoing a freeze-all strategy has no impact on live birth, clinical pregnancy or pregnancy loss rates. This information allows clinicians

to take patients' preferences into account when deciding the best moment to perform the embryo transfer in this population of patients.

Índice de contenidos

1	INTRODUCCIÓN.....	19
1.1	Definición y Epidemiología.....	19
1.2	Causas de esterilidad.....	21
1.3	Fecundación in Vitro.....	22
1.3.1	Hiperestimulación ovárica controlada y receptividad endometrial.....	24
1.4	Criopreservación embrionaria.....	25
1.4.1	Congelación lenta vs. vitrificación.....	27
1.5	Síndrome de hiperestimulación ovárica.....	29
1.6	Resultados obstétricos y perinatales.....	32
1.7	Resultados reproductivos.....	34
2	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	37
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1	Resultados reproductivos de la primera transferencia en fresco vs ciclo segmentado.....	41
3.1.1	Población de estudio.....	42
3.1.2	Protocolo de estimulación ovárica controlada.....	43
3.1.3	Análisis estadístico.....	45
3.2	Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.....	47
3.2.1	Población de estudio.....	48
3.2.2	Protocolos de estimulación ovárica controlada y preparación endometrial.....	49
3.2.3	Análisis estadístico.....	51
4	OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ESTUDIO.....	55
4.1	Resultados reproductivos de la primera transferencia en fresco vs. ciclo segmentado.....	55
4.1.1	Hipótesis.....	55
4.1.2	Objetivos.....	56
4.2	Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.....	57
4.2.1	Hipótesis.....	57
4.2.2	Objetivos.....	57
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Resultados reproductivos de la primera transferencia en fresco vs. ciclo segmentado.....	59
5.1.1	Población global del estudio.....	59

5.1.2	Pacientes menores de 35 años.....	65
5.1.3	Pacientes entre 35 y 38 años	69
5.1.4	Pacientes mayores de 38 años.....	75
5.2	Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.....	80
5.2.1	Datos demográficos y resultado de la estimulación ovárica.....	81
5.2.2	Análisis univariado de resultados reproductivos.....	85
5.2.3	Análisis multivariado de los resultados.....	86
6	DISCUSIÓN.....	91
6.1	Resultados reproductivos de la primera transferencia en fresco vs. ciclo segmentado.....	91
6.2	Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.....	94
6.3	Consideraciones finales.....	97
7	CONCLUSIONES.....	103
8	BIBLIOGRAFÍA.....	105

1. Introducción

1.1 Definición y Epidemiología

Desde el inicio de los estudios poblacionales, la fertilidad ha ocupado un lugar importante en este campo, dado su impacto en las tasas de crecimiento poblacional actual y futuro. Con respecto a esto, la demografía distingue dos conceptos relevantes: *fertilidad*, entendida como un evento repetible y opcional que se mide a través del número de hijos que tiene un individuo o pareja; y *fecundidad*, que se refiere a la capacidad de reproducirse y -por lo tanto- es mucho más difícil de medir que la fertilidad.

De esta última noción podemos extraer el concepto de fecundabilidad, acuñado por Corrado Gini ya durante la década de 1920, y que consiste en la probabilidad de concebir durante un ciclo menstrual normal, manteniendo relaciones sexuales regulares y sin protección (Gini, 1926).

Tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) y la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) definen la esterilidad como una patología caracterizada por la imposibilidad de conseguir un embarazo clínico tras doce meses de relaciones sexuales regulares, no protegidas o bien debida al compromiso de la capacidad reproductiva de una persona ya sea en forma individual o en conjunto con su pareja (Zegers-Hochschild et al, 2017).

Se estima que una de cada seis parejas experimentará alguna forma de infertilidad durante su vida, lo que corresponde a más de 80 millones de personas en edad reproductiva a nivel mundial, pero la incidencia varía entre el 5% y más del 30% en países en desarrollo donde la promoción de la salud reproductiva en global -y las técnicas de reproducción asistida (TRAs) en particular, no están disponibles. Sólo en la Unión Europea (UE), existirían aproximadamente 25 millones de ciudadanos aquejados de esterilidad.

Desde el punto de vista demográfico, la UE en conjunto se encuentra en una fase de contracción de la población, con tasas de fertilidad total (TFT), definida como número de hijos por mujer, que en promedio se encuentra en 1.58 pero que fluctúan ampliamente entre los diversos

países, siendo de 2.01 en Francia, 1.88 en Suecia, 1.81 en el Reino Unido, 1.74 en Bélgica, 1.71 en Holanda, 1.69 en Dinamarca, 1.47 en Alemania, 1.37 en Italia y 1.23 en Portugal (Eurostat, 2014). Se calcula que se requiere de una TFT de al menos 2.1 hijos por mujer para mantener el equilibrio poblacional y controlar su envejecimiento.

En España, la TFT es de 1.32, la segunda más baja en Europa tras Portugal. La prevalencia de problemas de fertilidad se estima en el 15% de las parejas en edad reproductiva, lo que implicaría que cerca de ochocientas mil parejas demandarían asistencia reproductiva. No sólo estas cifras son preocupantes, también lo es el retraso de la maternidad que, de la mano con el aumento de la edad media de la mujer al primer parto, se ha constituido en el principal determinante del aumento de la incidencia de esterilidad a nivel global. Actualmente, la edad media al primer parto en España es de 31.8 años (Eurostat, 2014).

1.2 Causas de esterilidad

Existen múltiples factores que determinarán la probabilidad de éxito del proceso reproductivo, tales como la edad, la integridad del aparato genital, el estilo de vida y los hábitos nutricionales, la exposición a contaminantes, la reserva de gametos, la calidad embrionaria y la receptividad endometrial, entre otros.

Las causas de esterilidad afectan a los diferentes actores del proceso reproductivo y entre ellos se cuentan:

- Factor ovulatorio
 - Oligo / Anovulación
 - Insuficiencia ovárica primaria / Fallo ovárico precoz
- Factor uterino
 - Miomas
 - Pólipos endometriales
 - Malformaciones uterinas
 - Sinequias
- Factor tubo-peritoneal
 - Obstrucción tubárica
 - Alteraciones de la motilidad tubárica
 - Síndromes adherenciales
- Endometriosis
- Factor masculino
 - Anomalías genitourinarias congénitas o adquiridas
 - Aumento de temperatura escrotal
 - Endocrinopatías
 - Alteraciones genéticas
 - Causas idiopáticas
 - Factores ambientales

1.3 Fecundación in Vitro

Dependiendo del tiempo de evolución, la causa de esterilidad y los tratamientos previos realizados, la Fecundación in Vitro (FIV) es una

de las técnicas de reproducción asistida que ofrecen mejores tasas de éxito a los pacientes que la realizan.

La FIV se desarrolló para dar oportunidad de concebir a mujeres que sufrían esterilidad por factor tubo-peritoneal. Desde entonces, el desarrollo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y la hiperestimulación ovárica controlada (HOC), con la obtención de múltiples ovocitos, han expandido esta indicación a la presencia de factor masculino o la esterilidad de origen desconocido (EOD), respectivamente. Del mismo modo, la optimización de los protocolos de estimulación ovárica y de las técnicas de laboratorio han permitido un aumento sustancial y mantenido del rendimiento de las TRAs en las últimas décadas (Barnhart, 2014).

Consiste en la estimulación ovárica controlada mediante la administración de gonadotropinas exógenas para lograr un desarrollo multifolicular. Cuando se estima que los ovocitos son maduros, se administra un fármaco para realizar la descarga ovulatoria, tras lo cual se realiza una punción folicular ecoguiada que tiene como objetivo recolectar los ovocitos que se encuentran en el líquido folicular para poder posteriormente inseminarlos in vitro con espermatozoides procedentes de una muestra de semen capacitada, ya sea de la pareja o de un donante anónimo.

Si la fecundación ocurre correctamente, al cabo de dos a cinco días podremos transferir embriones dentro del útero. En el caso de que se realice un ciclo en fresco, el o los embriones se transfieren dentro del útero y, si hay embriones sobrantes, se procede a la criopreservación

de los mismos para una posterior transferencia de embriones criopreservados.

En el caso de que no sea deseable la realización de un ciclo en fresco, se procede a la criopreservación de toda la cohorte embrionaria, para realizar una posterior transferencia de embriones criopreservados, lo cual se conoce como ciclo segmentado o “freeze-all”.

1.3.1 Hiperestimulación ovárica controlada y receptividad endometrial

La HOC consiste en la administración de gonadotropinas exógenas, ya sean de origen urinario o recombinante, durante un ciclo ovárico para conseguir el desarrollo y posterior recuperación de más de un ovocito, lo cual ha permitido aumentar significativamente la eficiencia de los ciclos de FIV en la actualidad.

Sin embargo, este aumento en el rendimiento mediante la obtención de un desarrollo multifolicular se ha visto acompañado por un efecto deletéreo de la HOC en la receptividad endometrial, lo cual podría potencialmente explicar el menor rendimiento de en las transferencias en fresco reportado en algunos artículos (Shapiro et al, 2011). Este compromiso podría ser secundario al desplazamiento de la ventana de implantación que implicaría la ocurrencia de una asincronía entre el desarrollo del embrión y la receptividad endometrial (Ubaldi et al, 1997; Kolibianakis et al, 2002).

Esta asincronía podría estar explicada, el menos en parte, por los niveles suprafisiológicos de estradiol y elevaciones prematuras en los

niveles de progesterona observados durante la HOC, que afectan el patrón de expresión génica del endometrio normal y cíclico (Check et al, 1999; Horcajadas et al, 2005 and 2008; Simon et al, 2005; Haouzi et al, 2009; Venetis et al, 2015 y 2016; Roque et al, 2015a).

1.4 Criopreservación embrionaria

El aumento en el rendimiento observado por la ovulación múltiple sólo es útil en el contexto de la criopreservación de embriones, constituyéndose ésta en un componente esencial en los tratamientos de reproducción asistida en la actualidad, dado que permite la optimización del rendimiento de un ciclo de FIV al disponer de más embriones de los que se pueden utilizar en un primer intento, realizar más transferencias y aumentar así la tasa acumulada de gestación.

El principio fundamental detrás de la criopreservación se basa en preservación de la viabilidad celular mediante la detención del desarrollo embrionario, lo que se consigue a través de aumentar la viscosidad intra y extracelular a niveles en los que todos los procesos químicos y la difusión de moléculas se detienen. La congelación resulta en el cambio de estado de líquido a sólido alrededor de cierto punto focal, con la consiguiente formación de cristales de hielo que convierten el agua en hielo, mientras las sales se quedan confinadas al compartimento no congelado (Mazur P, 1963).

Sin embargo, son estos mismos fenómenos (formación de hielo intracelular y las altas concentraciones de sales), los cuales puede

eventualmente dañar al embrión incluso impidiendo su posterior desarrollo normal (Shaw et al, 2003; Loutradi et al, 2008; Kleinhans y Mazur, 2007). Para evitar este daño, en las últimas décadas hemos sido testigos de constante desarrollo en el ámbito tanto en la metodología de criopreservación como en la efectividad de las sustancias crioprotectoras usadas.

Los crioprotectores son sustancias que se agregan al medio de congelación para facilitar la deshidratación celular. Actúan como anticongelantes al interrumpir los enlaces de hidrógeno del agua y existen dos tipos:

- *Crioprotectores permeabilizantes*, que entran en la célula, desplazando el agua fuera de la misma (dimetil sulfóxido, etilenglicol, propanediol). Adicionalmente, estos crioprotectores son capaces de compensar el aumento intracelular de sales disminuyendo su efecto nocivo a altas concentraciones.
- *Crioprotectores no permeabilizantes*, que permanecen fuera de la célula y arrastran agua fuera de la misma por osmosis (sacarosa).

La velocidad óptima de enfriamiento (o disminución de la temperatura a lo largo del tiempo) es específica para cada tipo celular y depende de la relación entre su volumen y el área de superficie, como también de la permeabilidad de su membrana al agua y al crioprotector utilizado.

1.4.1. Congelación lenta vs. vitrificación.

Los métodos de criopreservación pueden ser categorizados en congelación lenta y vitrificación. El nacimiento del primer bebé producto de una transferencia de embriones criopreservados mediante congelación lenta se reportó en los Países Bajos en 1984 (Zeilmaker et al, 1984).

El primer embarazo exitoso a partir de embriones vitrificados ocurrió en 1990 (Gordts et al, 1990). Desde entonces se han descrito mejoras significativas en la supervivencia post-descongelación en ambas técnicas (Edgar y Gook, 2012).

La congelación lenta requiere cantidades relativamente bajas de crioprotectores, velocidades bajas de enfriamiento y altas de calentamiento; mientras que la vitrificación utiliza concentraciones altas de crioprotectores, y los procesos de enfriamiento y calentamiento son rápidos.

Durante la congelación lenta, la célula se deshidrata sin encogerse excesivamente mediante la exposición a crioprotectores permeabilizantes, con lo cual el tiempo que permanece en condiciones extracelulares hiperosmóticas es limitado.

La vitrificación persigue alcanzar un estado celular similar al del cristal, sin formación de cristales de hielo dañinos (Rall y Fahí, 1985; Shaw et al, 1992). Esto se consigue sometiendo a la célula a un proceso de deshidratación extremo mediante la exposición a concentraciones altas de crioprotectores permeabilizantes y no permeabilizantes en el contexto de una velocidad de enfriamiento ultra rápida a través de

permitir el contacto directo del medio en el que se encuentra el embrión con nitrógeno líquido (Vajta et al, 1998 y 2006).

Aunque la congelación lenta sigue siendo el método predominante de criopreservación, en la última década se ha observado una creciente tendencia a la utilización de la vitrificación (Wong et al, 2014). Esto se debe principalmente a que, en la actualidad, la vitrificación se asocia con mayores tasas de supervivencia, metabolismo y formación de blastocitos que la congelación lenta (Balaban et al, 2008) independientemente del método de vitrificación utilizado (Fasano et al, 2014). Es más, de acuerdo con los datos publicados por Li, la vitrificación se asocia con un porcentaje mayor de ciclos en los cuales es posible realizar transferencia embrionaria, mayores tasas de embarazo clínico y de recién nacido vivo que la congelación lenta (Li et al, 2014).

Estos resultados implican que, según los estándares de calidad vigentes, la vitrificación permite tasas de supervivencia y desarrollo embrionarios comparables a los del cultivo embrionario en fresco (Debrock et al, 2015), lo que ha permitido -desde el punto de vista técnico- el desarrollo del concepto de “freeze-all” o la segmentación de ciclo de FIV, con vitrificación electiva de todos los embriones de la cohorte. Actualmente podemos reservar los mejores embriones para una transferencia diferida, sin exponernos a comprometer la tasa de éxito al transferirlos a un ambiente endometrial subóptimo producto del eventual efecto deletéreo de la HOC observado en los ciclos en fresco.

1.5. Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una complicación iatrogénica poco frecuente pero potencialmente letal de la HOC. Ocurre característicamente durante la fase lútea temprana y/o durante el inicio de la gestación tras la hiperestimulación ovárica y, en su forma moderada o severa, afecta entre el 1% y 5% de los ciclos de FIV, aunque sus formas más leves pueden estar presentes en el 20%-30% de los mismos (Steward et al, 2014).

La presentación clínica habitual incluye un espectro de síntomas y signos, tales como aumento del tamaño ovárico, presencia de ascitis, hemoconcentración, hipercoagulabilidad y desbalance electrolítico. La gravedad de la sintomatología permite clasificarlo en leve, moderado, severo o crítico, mientras que el momento de presentación lo divide en precoz o tardío. En sus variantes más severas puede llevar a complicaciones graves como derrame pleural, insuficiencia renal aguda y tromboembolismo venoso.

El desencadenante final del SHO es acción de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Esta hormona, que tiene actividad de hormona luteinizante (LH) pero con potencia biológica cinco veces mayor y una vida media más prolongada, puede afectar durante su administración exógena para la maduración ovocitaria final o bien a través de su producción endógena si se consigue la gestación tras la transferencia embrionaria en los ciclos en fresco.

El SHO suele ser una condición autolimitada, que típicamente se resuelve con la llegada de la siguiente menstruación. Sin embargo, en las pacientes que se embarazan, los niveles crecientes de hCG continúan estimulando a los ovarios, y los síntomas pueden extenderse hasta el final del primer trimestre de la gestación.

Fisiopatológicamente, se caracteriza por vasodilatación arteriolar y aumento de la permeabilidad capilar, lo que facilita un movimiento de fluidos entre el compartimiento intra y extravascular y desencadena hiponatremia hipovolémica y hemoconcentración. Estos cambios están mediados por la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG), el cual también participa en el crecimiento folicular, la función del cuerpo lúteo, angiogénesis y estimulación del endotelio vascular (Soares et al, 2008).

El SHO precoz se inicia típicamente entre 3-7 días después de la administración de la hCG por la acción directa de ésta sobre los ovarios previamente estimulados.

La forma tardía se inicia a partir de dos semanas tras la administración de hCG exógena, en las pacientes que han conseguido gestación y se debe a la producción endógena de hCG por parte del trofoblasto. Si ya existe SHO precoz, éste persiste o empeora clínicamente al mantenerse el efecto de la hCG.

Con respecto a la gravedad, podemos clasificarlo en (Fiedler y Ezcurra, 2012):

- *Leve*: Distensión abdominal, náuseas y vómitos leves, diarrea, aumento del tamaño ovárico (habitualmente menor a 8 cm). No se encuentran alteraciones importantes de laboratorio.

- *Moderado*: Los hallazgos de la forma leve, con evidencia ecográfica de ascitis. Suele cursar con hemoconcentración leve (hematocrito > 41%) y leucocitosis (> 15000).
- *Severo*: Los hallazgos de las formas leve y moderada con evidencia clínica de ascitis, hidrotórax, disnea, oligoanuria, náuseas y vómitos importantes. Suele encontrarse importante hemoconcentración (hematocrito > 55%), leucocitosis por encima de 25000 cél/mL, aclaramiento de creatinina por debajo de 50 ml/min, creatinina > 1.6 mg/dL, hiponatremia, hiperkalemia, elevación de las transaminasas.
- *Crítico*: hipotensión periférica y central, derrame pleural, aumento de peso rápido (> 1 kg/día), síncope, dolor abdominal severo, trombosis venosa, fallo renal agudo/anuria, arritmias, tromboembolismo, derrame pericárdico, trombosis arterial, hidrotórax masivo, síndrome de distrés respiratorio del adulto, sepsis. Los parámetros de laboratorio están francamente alterados.

El equilibrio entre optimizar los resultados reproductivos y la seguridad de las pacientes es, sin duda, la principal prioridad en reproducción asistida. Afortunadamente, contamos con herramientas que nos permiten virtualmente eliminar el riesgo de ocurrencia de esta potencialmente letal complicación, herramientas que fueron

inicialmente recogidas bajo el concepto de “Clínica libre de SHO” (Devroey et al, 2011).

Esta estrategia incluye la segmentación del ciclo de FIV y consiste en la optimización de la estimulación ovárica mediante la utilización de antagonistas de la GnRH para la desensibilización hipofisiaria y prevención de luteinización prematura durante la HOC, evitar la descarga ovulatoria con hCG sustituyéndola por agonistas de la GnRH (segmento A), la vitrificación de embriones u ovocitos según sea necesario (segmento B) y posteriormente la transferencia diferida de embriones a un endometrio receptivo, no estimulado mediante un ciclo natural o artificial de preparación endometrial (segmento C).

1.6. Resultados obstétricos y perinatales

Los primeros datos respecto de los resultados obstétricos y perinatales de las transferencias embrionarias de embriones frescos o criopreservados hablan de una menor incidencia de bajo peso al nacer y parto de pretérmino (Shih et al, 2008) en las criotransferencias. Del mismo modo, el riesgo de complicaciones maternas tales como placenta previa (Healy et al, 2010) o gestación extrauterina (Londra et al, 2015) parece ser inferior en las criotransferencias comparadas con los ciclos en fresco.

Un primer meta-análisis por Maheshwari en 2012 apuntaba en la misma dirección y, más aún, la los estudios poblacionales publicados hasta la fecha no han reportado diferencias significativas en anomalías

congénitas entre los niños nacidos de embriones frescos y vitrificados, ni tampoco en la salud general de los mismos tras tres años de seguimiento pediátrico en dos estudios retrospectivos en Finlandia (Pelkonen et al, 2014 y 2015).

Con respecto a la experiencia local, un estudio reciente publicado por la Unidad de Medicina Reproductiva del Hospital del Mar, en Barcelona, constató al analizar más de 14000 ciclos del registro catalán, que las transferencias de embriones en fresco de ciclos autólogos se asociaban con mayor riesgo de ser pequeños para la edad gestacional y menor peso al nacer (Vidal et al, 2017) sin embargo, este riesgo no existía en los ciclos de donación de ovocitos, apuntando a que estos resultados perinatales se ven negativamente afectados, al menos en parte, por la hiperestimulación ovárica controlada, variable que no existe en los ciclos de ovodonación (Vidal et al, 2017).

El mismo grupo que publicó el meta-análisis en 2012 (Maheshwari et al, 2012) ha publicado una actualización del mismo en 2018, incluyendo 26 estudios, del cual se desprende que los embarazos únicos provenientes de embriones criopreservados tienen menor riesgo de parto de pretérmino, bajo peso al nacer y de ser pequeños para la edad gestacional, pero sufren mayor riesgo de síndromes hipertensivos del embarazo (RR 1.29; IC 95% 1.07–1.56) y de ser grandes para la edad gestacional, sin diferencias en la mortalidad perinatal, anomalías congénitas, necesidad de ingreso a unidades de cuidados intensivos neonatales o hemorragia anteparto (Maheshwari et al, 2018).

De especial importancia es la asociación entre las transferencias de embriones criopreservados y la ocurrencia de síndromes hipertensivos

del embarazo, específicamente preeclampsia (RR 3.13; IC 95% 1.06–9.3) (Wei et al, 2019) por su gran impacto en la morbilidad perinatal. Sin embargo, la evidencia disponible apunta a que este aumento en la probabilidad de sufrir preeclampsia, en comparación con los ciclos en fresco, estaría determinada por la preparación endometrial más que por el efecto de la HOC, siendo este riesgo significativamente mayor en los ciclos artificiales en los que no existe presencia de cuerpo lúteo (Von Versen-Hoynck et al, 2019).

Las gestaciones provenientes de embriones criopreservados tienen mejores resultados obstétricos y perinatales cuando la preparación endometrial se realiza mediante ciclos naturales o estimulados, en comparación con los ciclos artificiales (Ginström Ernstad et al, 2019).

Por lo tanto, en términos generales, la transferencia de embriones procedentes de criopreservación es una técnica que puede considerarse segura en relación con las complicaciones obstétricas y perinatales.

1.7 Resultados reproductivos

El número de ciclos de criotransferencias embrionarias autólogas ha aumentado a gran velocidad en los últimos diez años. De acuerdo con los registros europeos, la proporción general de criotransferencias en relación con los ciclos en fresco fue del 32.3% (28% en 2010), pero en otros países -como Suiza- esta proporción supera el 80% de acuerdo con datos del registro de la ESHRE (Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología) (De Geyter et al, 2018), mientras que la

proporción de ciclos en los que se realiza transferencia en fresco ha alcanzado un plateau o, en algunos países, incluso ha disminuido de acuerdo a algunos reportes (Shapiro et al, 2014). Este incremento ha traído consigo un aumento de las tasas de recién nacido vivo por criotransferencia, especialmente en mujeres de 35 años o menos, hasta valores que son comparables o en algunos casos superiores que los ciclos en fresco (Shapiro et al, 2011 y 2014).

Aunque la evidencia publicada parecía mostrar una tendencia beneficiosa a la segmentación electiva de los ciclos de FIV, durante bastante tiempo la idea de aplicar esta estrategia en forma universal ha sido controversial, dado que evidencia de calidad, proveniente de estudios aleatorizados y controlados (RCTs) no ha estado disponible sino hasta muy recientemente y ha habido preocupación en el mundo científico por la forma de reportar los datos y los resultados (Doody, 2014) y sobre la relación coste-efectividad de la estrategia en sí misma (Shapiro et al, 2014; Roque M, 2015b).

El primer meta-análisis publicado sobre el tema mostraba mayor tasa de embarazo clínico tras una estrategia de freeze-all (Roque et al, 2013) ha sido revisado críticamente y, desde entonces, se han publicado una serie de artículos sobre el tema.

Una revisión Cochrane (Wong et al, 2017), que incluyó 4 ensayos clínicos aleatorizados y controlados, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la tasa acumulada de recién nacido vivo (cRNV) entre pacientes que recibieron transferencia en fresco y quienes segmentaron sus ciclos aunque, en un análisis suplementario, la tasa de nacido vivo (RNV) tras la primera transferencia fue

significativamente más alta en el grupo de freeze-all, independientemente del estadio de desarrollo embrionario al momento de la transferencia (OR 1.34; CI 95% 1.12-1.61).

Tras este estudio, dos RCTs han mostrado que -en mujeres ovulatorias, de buen pronóstico- la segmentación electiva del ciclo de FIV es como mínimo igual de eficaz que realizar una transferencia en fresco, pero más segura (Shi et al, 2018 y Vuong et al, 2018). Sin embargo, la media de edad de estas pacientes era de 28.5 ± 3 y 32 ± 4 años, respectivamente.

Finalmente, en los últimos meses se han publicado dos nuevos meta-análisis comparando resultados reproductivos de ciclos en fresco y segmentados.

En el primer trabajo, de Roque et al., en el que se incluyeron once estudios aleatorizados y controlados, la tasa de nacido vivo fue significativamente más alta en el grupo segmentado en pacientes hiperrespondedoras, sin diferencias en normorrespondedoras ni en la tasa acumulada de nacido vivo en la población en general (Roque et al, 2019). Sin embargo el riesgo de SHO era inferior en el grupo segmentado.

En el meta-análisis de Bosdou et al, que incluyó 8 estudios aleatorizados y controlados, se concluye que la probabilidad de un nacido vivo era estadísticamente superior durante la primera transferencia de embriones en los ciclos segmentados en pacientes con hiperrespuesta, pero este indicador no experimentaba diferencias significativas en normorrespondedoras (Bosdou et al, 2019). El riesgo de SHO era significativamente inferior en el grupo segmentado independientemente de la respuesta ovocitaria.

2. Justificación del estudio

De todo lo anteriormente expuesto se desprende que, en la actualidad, si bien los resultados de los estudios recientemente publicados han dado muchas luces respecto de la población que se beneficiaría de una estrategia de segmentación de ciclos de FIV, sólo parece indiscutible la indicación para las siguientes situaciones clínicas:

- Prevención del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.
- Presencia o sospecha de anomalías endometriales al momento de la recuperación ovocitaria.

- Necesidad de otras intervenciones tales como la realización de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT) o estudios de receptividad endometrial.

Por lo tanto, la extrapolación de estas indicaciones a la población universal no está suficientemente respaldada por la evidencia científica disponible.

Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados y en curso se han centrado en la cantidad de ovocitos recuperados (Polyzos et al, 2018) como forma de estratificar a las pacientes y valorar la efectividad de la segmentación como estrategia para mejorar los resultados reproductivos, no teniendo en cuenta la edad de las pacientes.

En este respecto, reportes preliminares han sugerido que una estrategia de freeze-all podría mejorar las tasas de éxito en mujeres de edad avanzada (Lopez et al, 2016; Santiestevan et al, 2016). Por lo tanto, el primer objetivo de esta tesis doctoral es responder a la siguiente pregunta:

¿Podría tener la estrategia de segmentación del ciclo de FIV, conocida como Freeze-all, algún impacto en los resultados reproductivos de mujeres de distintos grupos de edad?

Además, si estamos suponiendo que la superovulación podría tener un efecto deletéreo sobre los resultados reproductivos, no quedaba claro en la literatura disponible cuánto tiempo tarda el endometrio en recuperar su patrón de receptividad funcional tras la HOC.

Tradicionalmente, las criotransferencias de embriones se realizan entre uno y dos meses después de la recuperación ovocitaria (Shapiro et al, 2015) y retrasar electivamente la transferencia de los embriones podría aumentar los niveles de estrés y ansiedad que ya sufren los pacientes durante la realización de un ciclo de FIV estándar.

Datos sobre cuál es el mejor momento para realizar la criotransferencia embrionaria en un ciclo segmentado no estuvieron disponibles hasta la publicación en Human Reproduction del segundo estudio incluido en esta tesis (Lattes et al, 2017), en el cual la pregunta a responder fue:

¿Cuál es el mejor momento para realizar la primera criotransferencia embrionaria de un ciclo segmentado para optimizar la tasa de nacido vivo?

3. Materiales y métodos

3.1. Resultados reproductivos de la primera transferencia embrionaria en fresco vs. ciclo segmentado.

Corresponde a un estudio retrospectivo de 1882 pacientes que realizaron su primer ciclo autólogo de FIV entre enero de 2013 y enero de 2016. Analizamos los resultados de la primera transferencia embrionaria de estos ciclos, comparando entre los que realizaron una transferencia en fresco (grupo FRESCO, 1412 pacientes) y aquellos que

fueron sometidos a un ciclo segmentado (Freeze-all) en el cual no se realizó transferencia en fresco y toda la cohorte embrionaria fue vitrificada, por lo tanto, su primera transferencia fue de embriones congelados (grupo CONGELADO, 470 pacientes).

3.1.1 Población de estudio.

Se incluyeron mujeres premenopáusicas entre 20 y 44 años de edad que fueran a realizar su primer ciclo autólogo de FIV, utilizando semen de su pareja o de un donante anónimo.

Criterios de exclusión:

- Índice de masa corporal de más de 30 kg/m²
- Presencia de patologías endocrinas no compensadas en la mujer
- Presencia de anomalías uterinas en la mujer
- Presencia de enfermedades autoinmunes o metabólicas en cualquier miembro de la pareja
- Cariotipo alterado en cualquier miembro de la pareja
- Evidencia de alteraciones meióticas o cromosomas en los espermatozoides (diagnosticadas a través de estudio de meiosis en biopsia testicular o FISH en espermatozoides)
- Necesidad de utilizar espermatozoides de origen testicular
- Ciclos con diagnóstico genético preimplantacional
- Participación, dentro de los seis meses previos, en algún ensayo clínico con medicamentos

La posibilidad de segmentar el ciclo se planteó en las siguientes situaciones:

- Prevención de SHO (más de 15 folículos al momento de la descarga ovulatoria, estradiol \geq 5000 pg/ml)
- Endometrio desfavorable al momento de la recuperación ovocitaria
 - Grosor endometrial inferior a 7 mm.
 - Patrón endometrial a la ecografía compatible con fase secretora, según descripción de Grunfeld (Grunfeld et al, 1991).
 - Presencia de patología endocavitaria (pólipo endometrial, mioma submucoso, etc.)
 - Progesterona sérica $>$ 1.5 ng/ml al momento de la descarga ovulatoria
- Deseo de optimizar resultados o preferencia de los pacientes

3.1.2 Protocolos de estimulación ovárica controlada

La estimulación ovárica se llevó a cabo mediante gonadotropinas exógenas utilizando dos protocolos posibles:

- Protocolo corto con antagonistas de la GnRH en pauta flexible, con inicio de las gonadotropinas el segundo día de ciclo y agregando el antagonista cuando el folículo mayor alcanzó los 14 mm. de diámetro mayor.

- Protocolo largo con agonistas de la GnRH, con inicio del agonista en fase mesolútea del ciclo menstrual previo, y agregando gonadotropinas a partir del segundo día de ciclo.

El criterio para descarga ovulatoria fue la presencia de folículos de más de 17 mm de diámetro, y se realizó mediante la administración de 250 µg de hCG recombinante (Ovitrelle®, Merck Serono, Italia) o 0.3 mg de Triptorelina (Decapeptyl®, Ipsen Pharma Biotech, Francia), dependiendo del protocolo de estimulación ovárica utilizado.

La recuperación ovocitaria se realizó 36 horas después de la descarga ovulatoria, mediante aspiración folicular vaginal ecoguiada. Los ovocitos obtenidos se incubaron durante 4 horas antes de ser inseminados mediante fecundación in vitro convencional o decumulados para la realización de microinyección espermática (ICSI). Las muestras de semen fueron capacitadas utilizando gradientes de densidad (PureSperm®, Nidacon Internacional AB, Suecia).

Los embriones se cultivaron en gotas individuales de medio Lifeglobal®, suplementado con proteínas. Se realizó una categorización de los embriones siguiendo las guías de valoración morfológica de ovocitos, embriones y blastocitos de la Sociedad Española de Biología de la Reproducción (ASEBIR, III cuadernos de embriología clínica, tercera edición, 2015). Esta clasificación divide los embriones en estadio de clivaje en 4 categorías (A, B, C, D) de acuerdo con el número y simetría de los blastómeros, y el grado de fragmentación, considerando A y B como embriones de calidad alta. Para blastocitos, la clasificación

tiene en cuenta el grado de expansión y las características de la masa celular interna y del trofotodermo (Gardner et al, 2000).

En el grupo FRESCO, se realizó transferencia de 1, 2 ó 3 embriones en días 2, 3 ó 5 de desarrollo embrionario. En los ciclos del grupo CONGELADO se congelaron todos los embriones de la cohorte en día 2, 3 ó 5 de desarrollo, en un sistema de vitrificación cerrado (CryoTip®, Irvine Scientific, EEUU). La criotransferencia de 1, 2 ó 3 embriones se realizó un día después de la descongelación en el caso de embriones en estadio de clivaje (día 3/4) o tras dos horas en el caso de blastocitos.

La preparación endometrial para las transferencias de embriones congelados se realizó mediante un ciclo artificial con estrógenos transdérmicos (Estradiol hemihidrato 150 mg cada 48 horas; Evopad® Janssen, España) u orales (Estradiol valeriato 6mg/día; Meriembra® Novartis Farmacéutica, España).

El soporte de fase lútea fue común para ambos grupos y consistió en la administración de progesterona micronizada vaginal en dosis de 600 mg/día (Utrogestan®, SEID, España). Este soporte se mantuvo durante todo el primer trimestre del embarazo hasta abril del 2015, limitándose hasta las 9-10 semanas de gestación con posterioridad a esa fecha (Giorlandino et al, 2015).

3.1.3 Análisis estadístico

Los objetivos de este estudio fueron:

- Principal: tasa de recién nacido vivo (RNV).

- Secundarios: tasa de embarazo, tasa de embarazo clínico, tasa de aborto.

Embarazo se define como una prueba de embarazo positiva en sangre, realizada 15 días después de la punción folicular en los ciclos en fresco, o en el día 15 de desarrollo embrionario en las criotransferencias. Embarazo clínico se define como la presencia de saco gestacional intrauterino en el que se visualiza embrión con actividad cardíaca presente, evaluado mediante ecografía a las 7 semanas de gestación. Aborto se refiere a la pérdida reproductiva que ocurre antes de las 20 semanas de gestación y la tasa de recién nacido vivo se refiere al número de partos por transferencia embrionaria realizada.

El cálculo del tamaño muestral se llevó a cabo teniendo como referencia una tasa de nacido vivo poblacional del 25% y buscando detectar una diferencia del 30% en dicha tasa (8 puntos porcentuales, 33%). En este contexto, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 1412 ciclos en fresco y 423 ciclos segmentados para detectar una diferencia significativa en el riesgo relativo. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%. Se ha utilizado la aproximación de POISSON.

El análisis de los datos se realizó tanto en la población general como luego de estratificar a las pacientes en tres categorías de edad para estudiar el impacto de ésta en los resultados reproductivos:

- Mujeres menores de 35 años
- Mujeres entre 35 y 38 años de edad

- Mujeres de más de 38 años

Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., EEUU) para realizar una comparativa de variables cuantitativas a través de la prueba t de Student, mientras que las variables categóricas se compararon mediante un análisis de X^2 . Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si el valor de p era inferior a 0.05.

También se llevó a cabo un análisis multivariado de regresión logística para determinar aquellas variables que podrían asociarse independientemente con los objetivos del estudio y afectar a los resultados. Se incluyeron en este análisis las siguientes variables:

- Número de ovocitos recuperados
- Número de embriones transferidos (2-3 vs 1)
- Día de desarrollo embrionario al momento de la transferencia
- Fármaco utilizado durante la descarga ovulatoria
- Tipo de ciclo (FRESCO vs CONGELADO)

3.2 Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.

Para este estudio retrospectivo se incluyeron pacientes que realizaron su primer ciclo de FIV autólogo en el que se realizó una estrategia de

Freeze-all y se vitrificaron todos los embriones de la cohorte para una futura criotransferencia de embriones.

3.2.1 Población de estudio

Se incluyeron 512 mujeres premenopáusicas entre 20 y 45 años de edad, con cariotipo normal, que utilizaran semen de su pareja o de un donante anónimo. Los grupos de estudio incluyeron a las pacientes que realizaron la transferencia en el ciclo inmediatamente posterior a la punción folicular (CICLO₁) y aquellas en las que la transferencia se realizó a partir del segundo ciclo menstrual (CICLO_{≥2}).

Criterios de exclusión:

- Índice de masa corporal de más de 30 kg/m².
- Presencia de patologías endocrinas no compensadas en la mujer.
- Presencia de anomalías uterinas en la mujer.
- Presencia de enfermedades autoinmunes o metabólicas en cualquier miembro de la pareja.
- Cariotipo alterado cualquier miembro de la pareja.
- Evidencia de alteraciones meióticas o cromosomas en los espermatozoides (diagnosticadas a través de estudio de meiosis en biopsia testicular o FISH en espermatozoides).
- Necesidad de utilizar espermatozoides de origen testicular.
- Ciclos con diagnóstico genético preimplantacional.
- Participación, dentro de los seis meses previos, en algún ensayo clínico con medicamentos.

La posibilidad de segmentar el ciclo se planteó en las siguientes situaciones:

- Prevención de SHO (más de 15 folículos al momento de la descarga ovulatoria, estradiol \geq 4500 pg/ml)
- Endometrio desfavorable al momento de la recuperación ovocitaria
 - Grosor endometrial inferior a 7 mm.
 - Patrón endometrial a la ecografía compatible con fase secretora, según descripción de Grunfeld (Grunfeld et al, 1991).
 - Presencia de patología endocavitaria (pólipo endometrial, mioma submucoso, etc.)
 - Progesterona sérica $>$ 1.5 ng/ml al momento de la descarga ovulatoria
- Deseo de optimizar resultados o preferencia de los pacientes

3.2.2 Protocolos de estimulación ovárica y preparación endometrial

La estimulación ovárica se llevó a cabo mediante gonadotropinas exógenas utilizando dos protocolos posibles:

- Protocolo corto con antagonistas de la GnRH en pauta flexible, con inicio de las gonadotropinas el segundo día de ciclo y agregando el antagonista cuando el folículo mayor alcanzó los 14 mm. de diámetro mayor.

- Protocolo largo con agonistas de la GnRH, con inicio del agonista en fase mesolútea del ciclo menstrual previo, y agregando gonadotropinas a partir del segundo día de ciclo.

La descarga ovulatoria se realizó cuando se constatará la presencia de folículos de más de 17 mm de diámetro, mediante la administración de 250 µg de hCG recombinante (Ovitrelle®, Merck Serono, Italia) o de 0.3 mg de Triptorelina (Decapeptyl®, Ipsen Pharma Biotech, Francia), dependiendo del protocolo de estimulación ovárica utilizado.

Se realizó la punción folicular 36 horas después de la descarga ovulatoria, mediante aspiración folicular vaginal ecoguiada. Los ovocitos obtenidos se incubaron durante 4 horas antes de ser inseminados mediante fecundación in vitro convencional o decumulados para ICSI. Las muestras de semen se capacitaron mediante gradientes de densidad (PureSperm®, Nidacon Internacional AB, Suecia).

El cultivo embrionario se realizó en gotas individuales de medio Lifeglobal®, suplementado con albúmina. Se categorizaron los embriones siguiendo las guías de evaluación morfológica de ovocitos, embriones y blastocitos de la Sociedad Española de Biología de la Reproducción (ASEBIR, III cuadernos de embriología clínica, tercera edición, 2015), la cual clasifica los embriones en células en 4 categorías (A, B, C, D) de acuerdo con el número y simetría de los blastómeros y el grado de fragmentación. Se consideraron las categorías A y B como embriones de calidad óptima.

En ambos grupos de estudio, se congelaron todos los embriones de la cohorte en día 2 ó 3 de desarrollo, en un sistema de vitrificación cerrado (CryoTip®, Irvine Scientific, EEUU). La transferencia de 1, 2 ó 3 embriones se realizó un día después de la descongelación (día 3/4).

La preparación endometrial para las transferencias de embriones congelados se realizó mediante un ciclo artificial con estrógenos transdérmicos (Estradiol hemihidrato 150 mg cada 48 horas; Estradot® Novartis Pharma, Alemania) u orales (Estradiol valeriato 6mg/día; Meriestra® Novartis Farmacéutica, España).

El soporte de fase lútea consistió en la administración de progesterona micronizada vaginal en dosis de 600 mg/día (Utrogestan®, SEID, España). Este soporte se mantuvo durante todo el primer trimestre del embarazo hasta abril del 2015, limitándose hasta las 9-10 semanas de gestación con posterioridad a esa fecha (Giorlandino et al, 2015).

3.2.3 Análisis estadístico

Los objetivos de este estudio y se calcularon por transferencia realizada. Éstos fueron:

- Principal: tasa de recién nacido vivo (RNV).
- Secundarios: tasa de implantación (dicotomizada en > 50% vs. <50%), tasa de embarazo, tasa de embarazo clínico, tasa de aborto.

Implantación se define como la razón entre el número de embriones transferidos y el número de sacos gestacionales documentados por

ecografía. Embarazo se define como una prueba de embarazo positiva en sangre, realizada en el día 15 de desarrollo embrionario en las criotransferencias. Embarazo clínico se define como la presencia de saco gestacional intrauterino en el que se visualiza embrión con actividad cardíaca presente, evaluado mediante ecografía a las 7 semanas de gestación. Aborto se refiere a la pérdida reproductiva que ocurre antes de las 20 semanas de gestación y la tasa de recién nacido vivo se refiere al número de partos por transferencia embrionaria realizada.

Para el cálculo del tamaño muestral, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral, se precisan 234 pacientes en cada grupo de estudio para detectar una diferencia del 15% riesgo relativo mínimo asumiendo una tasa de nacido vivo promedio poblacional del 25%. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10% y se ha utilizado la aproximación de POISSON.

El análisis de datos se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc., EEUU). Las variables cuantitativas se compararon a través de la prueba t de Student, mientras que las variables categóricas se compararon mediante un análisis de X^2 . Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si el valor de p era inferior a 0.05.

Además, se llevó a cabo un análisis multivariado de regresión logística para determinar aquellas variables que podrían asociarse independientemente con la probabilidad de embarazo, aborto y RNV y, por lo tanto, afectar a los resultados. Se incluyeron en este análisis las siguientes variables:

- Edad materna (categorizada en < 35 años, 35-40 años, > 40 años, para tener en cuenta relaciones no lineales)
- Número de ovocitos recuperados
- Número de embriones transferidos (2-3 vs 1)
- Día de desarrollo embrionario al momento de la transferencia (+4 vs +3)
- Fármaco utilizado durante la descarga ovulatoria (agonista vs. hCG)
- Indicación de Freeze-all (riesgo SHO, endometrio subóptimo, electivo)
- Tipo de preparación endometrial utilizada (estrógenos transdérmicos vs orales)
- Ciclo en el que se realizó la transferencia tras la punción folicular (CICLO 1 vs CICLO \geq 2)

4. Objetivos y finalidad del estudio

4.1 Resultados reproductivos de la primera transferencia embrionaria en fresco vs. ciclo segmentado.

4.1.1 Hipótesis

Las pacientes de edad reproductiva avanzada habitualmente tienen una reserva ovárica disminuida y una calidad ovocitaria subóptima. Habitualmente realizan transferencia de sus mejores embriones en

fresco, lo que les expone a la ocurrencia de asincronía entre el embrión y endometrio. Debido a esto, la primera hipótesis de trabajo de esta tesis es:

“Segmentar el ciclo de FIV en pacientes de edad avanzada permitiría evitar una potencial asincronía embrión-endometrio y, por lo tanto, dar mejores tasas de nacido vivo que la transferencia en fresco.”

4.1.2 Objetivos

- a) ¿Es la edad es un factor determinante e independiente sobre la tasa de nacido vivo, a tener a considerar en la toma de decisión de la segmentación de un ciclo?
- b) ¿Es la edad un factor determinante e independiente sobre la tasa de embarazo clínico, a tener a considerar en la toma de decisión de la segmentación de un ciclo?
- c) ¿Es la edad un factor determinante e independiente sobre la tasa de aborto, a tener a considerar en la toma de decisión de la segmentación de un ciclo?

4.2 Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all

4.2.1 Hipótesis

La evidencia científica disponible sobre el tiempo que tarda el endometrio en volver a su estado receptivo normal previo a la HOC es escasa, por lo que no hay consenso en cuál es el mejor momento para realizar la primera criotransferencia en un ciclo de FIV segmentado, a pesar de lo cual la mayoría de las veces se espera más de un ciclo menstrual para realizarla. Por lo tanto, la segunda hipótesis de trabajo de esta tesis es:

“Realizar la primera criotransferencia en un ciclo menstrual posterior al primer ciclo tras la recuperación ovocitaria da más probabilidades de conseguir un recién nacido vivo ya que permite tener más tiempo para que se recupere el estado basal receptivo del endometrio alterado por la HOC.”

4.2.2 Objetivos

- a) ¿El tiempo entre la HOC y la primera criotransferencia embrionaria en un ciclo segmentado tiene influencia en la tasa de nacido vivo?

- b) ¿El tiempo entre la HOC y la primera criotransferencia embrionaria en un ciclo segmentado tiene influencia en la tasa de embarazo clínico?
- c) ¿El tiempo entre la HOC y la primera criotransferencia embrionaria en un ciclo segmentado tiene influencia en la tasa de aborto?

5. Resultados

5.1 Resultados reproductivos de la primera transferencia embrionaria en fresco vs. ciclo segmentado.

5. 1. 1 Población global del estudio.

Con respecto a la población global del estudio (antes de estratificar por edad), la edad de las participantes fue de 36.8 ± 4.1 años (media \pm desviación estándar).

La descarga ovulatoria se llevó a cabo con agonistas de la GnRH en el 14.6% de los ciclos (214 pacientes, todas ellas en el grupo

CONGELADO), utilizándose hCGr en el 85.4% restante (1608 ciclos). Todas las pacientes que recibieron una transferencia en fresco fueron descargadas con hCGr.

Se recuperaron una media de 9.95 ± 6.7 ovocitos en global. Se utilizó semen de donante en 10% de los ciclos (188 ciclos), proporción que se mantuvo constante en ambos grupos de estudio.

La media de embriones útiles para este grupo fue de 6.32 ± 4.65 embriones por ciclo, de los cuales se transfirieron un total de 3167 embriones en la primera transferencia. El 64% de los embriones transferidos (2033 embriones) correspondían a embriones de calidad “top”.

Para las pacientes del grupo CONGELADO, la preparación endometrial se llevó a cabo mediante un ciclo natural modificado en el 17.7% de los casos. El 82.3% restante (387 ciclos) realizaron un ciclo artificial con estrógenos. La mayoría de las pacientes utilizó estrógenos transdérmicos (58.7%, 227 ciclos), mientras que el 41.3% restante (160 ciclos) utilizó estrógenos orales.

Las pacientes del grupo CONGELADO realizaron la transferencia embrionaria una media de 50.5 ± 36.5 días después de la recuperación ovocitaria. En cambio, las pacientes del grupo FRESCO se transfirieron tras una media de 2.7 ± 0.6 días.

La media de embriones transferidos fue de 1.69 ± 0.54 en global, siendo predominantes las transferencias de dos embriones (61.1%, 1150 ciclos), seguidas de las transferencias de embrión único (35.1%, 660 ciclos). Se transfirieron tres embriones en 72 ciclos (3.8%).

La mayoría de las transferencias embrionarias se llevaron a cabo en día +3 (941 ciclos, 49.9%), se transfirieron embriones de día +2 en el 28.4% de los casos (534 ciclos) y de día +4 en el 19.3% (363 ciclos). Las transferencias en estadio de blastocito fueron minoritarias, alcanzando al 2.3% de los ciclos (44 pacientes).

Las características demográficas y los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada de la población no estratificada, para los distintos grupos de estudio están recogidos en la Tabla I.

Con respecto al análisis univariado de los resultados reproductivos en la población sin estratificar, éstos están recogidos en la tabla II.

De la población global, 833 pacientes presentaron niveles positivos de BhCG, lo que corresponde a una tasa de embarazo bioquímico del 44.3% por transferencia. Esta tasa fue significativamente mayor en el grupo CONGELADO que en el grupo FRESCO.

Tabla I. Población total	FRESCO (n=1412)	CONGELADO (n= 470)	p
Edad, media (DS)	37.31 (4.02)	35.32 (3.92)	<0.001
Nº ovocitos, media (DS)	7.85 (4.43)	16.26 (8.16)	<0.001
Nº embriones, media (DS)	4.97 (3.28)	10.36 (5.71)	<0.001
Fármaco descarga, n (%)			<0.001
hCG	1412 (100%)	196 (41.7%)	
Agonista GnRH	0 (0.0%)	274 (58.3%)	
Procedencia semen, n (%)			0.716
Pareja	1273 (90.2%)	421 (89.6%)	
Donante	139 (9.8%)	49 (10.4%)	
Embriones calidad top, n (%)	1500/2440 (61.5%)	533/736 (72.4%)	<0.001
Embriones transferidos, media (DS)	1.73 (0.54)	1.57 (0.51)	<0.001
1, n (%)	453 (32.1%)	207 (44.0%)	
2, n (%)	890 (63.0%)	260 (55.3%)	
3, n (%)	69 (4.9%)	3 (0.6%)	
Día de transferencia, media (DS)	2.65 (0.55)	3.90 (0.46)	<0.001
2, n (%)	534 (37.8%)	0 (0.0%)	
3, n (%)	861 (61%)	80 (17.0%)	
4, n (%)	0 (0.0%)	363 (77.2%)	
5, n (%)	17 (1.2%)	27 (5.7%)	

La tasa de embarazo clínico global fue del 37.1% en la población global, siendo significativamente más alta en el grupo CONGELADO. Para el objetivo principal del estudio, la tasa de nacido vivo, se mantiene la tendencia, siendo ésta de 23.9% en global, de 33.4% en el grupo

CONGELADO y 20.8% en el grupo FRESCO. No se observaron diferencias significativas en la tasa de aborto entre los grupos, la cual alcanzó el 16.4% en la población general.

Tabla II. Población total	CONGELADO (n=470)	FRESCO (n=1412)	p	OR (CI 95%)
Beta positiva, n (%)	229 (48.7%)	604 (42.8%)	0.025	1.27 (1.03, 1.56)
Embarazo clínico, n (%)	196 (71.7%)	502 (35.6%)	0.017	1.30 (1.05, 1.61)
Nacido vivo, n (%)	157 (33.4%)	293 (20.8%)	<0.001	1.92 (1.52, 2.41)
Aborto, n (%)	72 (15.3%)	237 (16.8%)	0.45	0.90 (0.67, 1.20)

Sin embargo, al realizar un análisis multivariado, corrigiendo por factores confusores tales como edad de la mujer, fármaco utilizado para la descarga ovulatoria, número de ovocitos recuperados, estadio de desarrollo embrionario al momento de la transferencia y número de embriones transferidos, no corroboramos esta tendencia favorable al grupo CONGELADO.

En el caso del objetivo primario, el OR para lograr un recién nacido vivo, al comparar el grupo CONGELADO con el grupo FRESCO, fue de 1.28 (IC 95% 0.89-1.84; p = 0.18), sin alcanzar significancia estadística. Tampoco tuvieron importancia significativa el fármaco de descarga ovulatoria (OR agonista GnRH vs. hCGr de 1.33; IC 95% 0.88-2.02; p = 0.17), el mayor número de ovocitos recuperados (log; OR 1.21; IC 95% 0.99-1.47; p = 0.06) ni el estadio de desarrollo embrionario durante la transferencia (OR día +4/+5 vs día +2/+3 de 1.87; IC 95% 0.97-3.59; p =

0.06). El único factor con impacto sobre la probabilidad de conseguir un RNV en la población general fue el número de embriones transferidos (1 vs 2-3; OR 0.53; IC 95% 0.41-0.68; $p < 0.001$).

El detalle de este análisis puede encontrarse en la Tabla III.

Tabla III. Población total		CI 95%			
		OR	Inferior	Superior	<i>p</i>
Beta positiva	CONGELADO vs FRESCO	0.84	0.61	1.17	0.30
	Agonista GnRh vs hCGr	1.48	1.00	2.18	0.049
	Ovocitos (log)	1.16	0.99	1.37	0.071
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.74	1.41	5.31	0.003
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.50	0.41	0.62	<0.001
Embarazo clínico	CONGELADO vs FRESCO	0.86	0.62	1.20	0.38
	Agonista GnRh vs hCGr	1.32	0.89	1.95	0.17
	Ovocitos (log)	1.26	1.06	1.49	0.008
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.35	1.24	4.43	0.008
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.56	0.45	0.69	<0.001
Nacido vivo	CONGELADO vs FRESCO	1.28	0.89	1.84	0.18
	Agonista GnRh vs hCGr	1.33	0.88	2.02	0.17
	Ovocitos (log)	1.21	0.99	1.47	0.064
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	1.87	0.97	3.59	0.062
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.53	0.41	0.68	<0.001

5.1.2 Pacientes menores de 35 años.

Al estratificar por edad, el primer grupo de estudio incluyó a las pacientes menores de 35 años, que correspondían al 27.8% de la población total (524 ciclos). La media de edad de este grupo fue de 31.7 ± 2.45 años.

La descarga ovulatoria se llevó a cabo con agonistas de la GnRH en el 24.8% de los ciclos (130 pacientes, todas ellas en el grupo CONGELADO), utilizándose hCGr en el 75.2% restante (394 ciclos).

Se recuperaron una media de 12.2 ± 7.3 ovocitos por ciclo en este grupo. La utilización de semen de donante fue del 6.3% de los ciclos (33 casos), proporción que se mantuvo constante en ambos grupos de estudio. La media de embriones útiles para este grupo fue de 7.61 ± 4.97 embriones por ciclo, de los cuales se transfirieron un total de 863 embriones en la primera transferencia. El 69.8% de los embriones transferidos (602 embriones) correspondían a embriones de calidad “top”.

Para las pacientes del grupo CONGELADO, la preparación endometrial se llevó a cabo mediante un ciclo natural modificado en el 14.2% de los casos. El 85.8% restante (157 ciclos) realizaron un ciclo artificial con estrógenos, siendo mayoritario el uso de estrógenos transdérmicos (59.9%, 94 ciclos), mientras que el 40.1% restante (63 ciclos) utilizó estrógenos orales.

Las pacientes del grupo CONGELADO realizaron la transferencia embrionaria una media de 44.5 ± 31 días después de la recuperación ovocitaria. En cambio, las pacientes del grupo FRESCO se transfirieron tras una media de 2.72 ± 0.55 días.

La media de embriones transferidos fue de 1.65 ± 0.51 en este grupo, siendo predominantes las transferencias de dos embriones (61.3%, 321 ciclos), seguidas de las transferencias de embrión único (37%, 194 ciclos). Se transfirieron tres embriones en 9 ciclos (1.7%).

La mayoría de las transferencias embrionarias se llevaron a cabo en día +3 (262 ciclos, 50%), seguidas de las de embriones de día +4 en el 27.5% (144 ciclos) y de día +2 en el 19.8% de los casos (104 ciclos). Las transferencias en estadio de blastocito fueron minoritarias, alcanzando al 2.7% de los ciclos (14 pacientes).

Las características demográficas y los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada de la población menor de 35 años, para los distintos grupos de estudio, están recogidos en la Tabla IV.

La tasa de beta positiva por transferencia fue del 45.8% en el global de las pacientes, siendo ésta significativamente superior en el grupo CONGELADO. Lo mismo ocurre con la tasa de embarazo clínico, que en la población global de menores de 35 años fue de 38.2%.

Para el objetivo principal del estudio, la tasa de nacido vivo observada fue de 30.9% en global, de 43.7% en el grupo CONGELADO y 24% en el grupo FRESCO ($p < 0.001$; OR 2.45, IC 95% 1.67-3.6). La tasa de aborto fue similar en ambos grupos, alcanzando al 14.9% de la población total de menores de 35 años.

El detalle de los resultados del análisis univariado de resultados reproductivos pueden observarse en la tabla V.

Tabla IV. Edad < 35 años	FRESCO (n=341)	CONGELADO (n=183)	p
Edad, media (DS)	31.90 (2.42)	31.39 (2.49)	0.022
Nº ovocitos, media (DS)	9.40 (4.88)	17.46 (8.09)	<0.001
Nº embriones, media (DS)	5.89 (3.69)	10.80 (5.46)	<0.001
Fármaco descarga, n (%)			<0.001
hCG	341 (100%)	53 (29.0%)	
Agonista GnRH	0 (0.0%)	130 (71.0%)	
Procedencia semen, n (%)			0.58
Pareja	321 (94.1%)	170 (92.9%)	
Donante	20 (5.9%)	13 (7.1)	
Embriones calidad top, n (%)	384/574 (66.9%)	218/289 (75.4%)	0.01
Embriones transferidos, media (DS)	1.68 (0.51)	1.58 (0.51)	0.027
1, n (%)	116 (34.0)	78 (42.6%)	
2, n (%)	217 (63.6%)	104 (56.8%)	
3, n (%)	8 (2.3%)	1 (0.5%)	
Día de transferencia, media (DS)	2.72 (0.55)	3.90 (0.45)	<0.001
2, n (%)	104 (30.5%)	0 (0.0%)	
3, n (%)	233 (68.3%)	29 (15.8%)	
4, n (%)	0 (0.0%)	144 (78.7%)	
5, n (%)	4 (12%)	10 (5.5%)	

Tabla V. Edad < 35 años	CONGELADO (n=183)	FRESCO (n=341)	p	OR (CI 95%)
Beta positiva, n (%)	106 (57.9%)	134 (39.9%)	<0.001	2.13 (1.48, 3.06)
Embarazo clínico, n (%)	93 (50.8%)	107 (31.4%)	<0.001	2.26 (1.56, 3.27)
Nacido vivo, n (%)	80 (43.7%)	82 (24.0%)	<0.001	2.45 (1.67, 3.60)
Aborto, n (%)	26 (14.2%)	52 (15.2%)	0.749	0.92 (0.55, 1.53)

Estos resultados favorables al grupo CONGELADO persisten tras realizar un análisis multivariado, corrigiendo por los factores confusores antes mencionados.

En el caso del objetivo primario, el OR para lograr un nacido vivo, al comparar el grupo CONGELADO con el grupo FRESCO, fue de 2.43 (IC 95% 1.32-4.51; $p = 0.005$). También tiene impacto estadísticamente significativo el número de embriones transferidos (OR 0.53; IC 95% 0.35-0.80; $p = 0.003$). No tuvieron importancia significativa el fármaco de descarga ovulatoria (OR agonista GnRH vs. hCGr de 0.91; IC 95% 0.46-1.81; $p = 0.79$), el mayor número de ovocitos recuperados (log; OR 1.23; IC 95% 0.85-1.79; $p = 0.27$) ni el estadio de desarrollo embrionario durante la transferencia (OR día +4/+5 vs día +2/+3 de 1.31; IC 95% 0.43-4.06; $p = 0.64$).

El detalle de este análisis para cada uno de los objetivos del estudio, puede encontrarse en la Tabla VI.

Tabla VI. Edad < 35 años		CI 95%			p
		OR	Inferior	Superior	
Beta positiva	CONGELADO vs FRESCO	2.23	1.21	4.08	0.01
	Agonista GnRh vs hCGr	0.85	0.43	1.68	0.64
	Ovocitos (log)	1.19	0.85	1.67	0.31
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.63	0.78	8.86	0.12
	Nº embriones transferidos	0.52	0.36	0.76	0.001
Embarazo clínico	CONGELADO vs FRESCO	2.24	1.23	4.10	0.009
	Agonista GnRh vs hCGr	0.85	0.43	1.67	0.63
	Ovocitos (log)	1.31	0.92	1.86	0.14
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	1.75	0.57	5.36	0.33
	Nº embriones transferidos	0.56	0.38	0.83	0.004
Nacido vivo	CONGELADO vs FRESCO	2.43	1.32	4.51	0.005
	Agonista GnRh vs hCGr	0.91	0.46	1.81	0.79
	Ovocitos (log)	1.23	0.85	1.79	0.27
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	1.31	0.43	4.06	0.64
	Nº embriones transferidos	0.53	0.35	0.80	0.003

5.1.3 Pacientes entre 35 y 38 años de edad.

Un tercio de las pacientes de la población general del estudio (33.5%, 631 pacientes) tenían entre 35 y 38 años al momento de realizar su primer ciclo de FIV. De éstas, 450 (71.3%) pertenecían al grupo FRESCO y las restantes 181 pertenecían al grupo CONGELADO (28.7%). La edad media de este grupo fue muy homogénea, siendo de 36.4 ± 1.12 años.

La descarga ovulatoria se llevó a cabo con agonistas de la GnRH en el 16.2% de los ciclos (102 pacientes, todas ellas en el grupo CONGELADO), utilizándose mayoritariamente hCGr en el 83.8% restante (529 ciclos). Todas las pacientes que recibieron una transferencia en fresco fueron descargadas con hCGr.

Se recuperó una media de 10.3 ± 6.9 ovocitos en global. La utilización de semen de donante fue del 10.6% de los ciclos (67 ciclos), sin diferencias significativas entre los grupos de estudio. La media de embriones útiles para este grupo fue de 6.78 ± 4.86 embriones por ciclo, de los cuales se transfirieron un total de 1093 embriones en la primera transferencia. El 64.9% de los embriones transferidos (709 embriones) correspondían a embriones de calidad “top”.

Para las pacientes del grupo CONGELADO, la preparación endometrial se llevó a cabo mediante un ciclo natural modificado en el 19.3% de los casos. El 80.7% restante (146 ciclos) realizaron un ciclo artificial con estrógenos. La mayoría de las pacientes utilizó estrógenos transdérmicos (56.8%, 83 ciclos), mientras que el 43.6% restante (63 ciclos) utilizó estrógenos orales.

Las pacientes del grupo CONGELADO realizaron la transferencia embrionaria una media de 54.7 ± 41.1 días después de la recuperación ovocitaria. En cambio, las pacientes del grupo FRESCO se transfirieron tras una media de 2.71 ± 0.55 días.

La media de embriones transferidos fue de 1.73 ± 0.51 en global, siendo predominantes las transferencias de dos embriones (66.6%, 420 ciclos), seguidas de las transferencias de embrión único (30.1%, 190 ciclos). Se transfirieron tres embriones en 21 ciclos (3.3%).

La mayoría de las transferencias embrionarias se llevaron a cabo en día +3 (323 ciclos, 51.2%). La proporción de transferencias en día +2 y día +4 fue la misma, siendo de 23.1% de los casos (146 ciclos). Las transferencias en estadio de blastocito fueron minoritarias, alcanzando al 2.7% de los ciclos (17 pacientes).

Las características demográficas y los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada de la población entre 35 y 38 años de edad, para los distintos grupos de estudio, están recogidos en la Tabla VII.

Tabla VII. Entre 35 y 38 años	FRESCO (n=450)	CONGELADO (n=181)	p
Edad, media (DS)	36.46 (1.11)	36.38 (1.6)	0.45
Nº ovocitos, media (DS)	8.04 (4.14)	16.07 (8.70)	<0.001
Nº embriones, media (DS)	5.24 (3.14)	10.61 (6.10)	<0.001
Fármaco descarga, n (%)			<0.001
hCG	450 (100%)	79 (43.6%)	
Agonista GnRH	0 (0.0%)	102 (56.4%)	
Procedencia semen, n (%)			
Pareja	406 (90.2%)	158 (87.3%)	0.28
Donante	44 (9.8%)	23 (12.7%)	
Embriones calidad top, n (%)	505/810 (62.3%)	204/283 (72.1%)	0.003
Embriones transferidos, media (DS)	1.80 (0.50)	1.56 (0.52)	<0.001
1, n (%)	109 (24.2%)	81 (44.8%)	
2, n (%)	322 (71.6%)	98 (54.1%)	
3, n (%)	19 (4.2%)	2 (1.1%)	
Día de transferencia, media (DS)	2.71 (0.55)	3.91 (0.44)	<0.001
2, n (%)	146 (32.4%)	0 (0.0%)	
3, n (%)	297 (66%)	26 (14.4%)	
4, n (%)	0 (0.0%)	145 (80.1%)	
5, n (%)	7 (1.6%)	10 (5.5%)	

Los resultados del análisis univariado de resultados reproductivos pueden observarse en la tabla VIII.

La tasa de embarazo bioquímico por transferencia fue del 56.3% en el global de las pacientes de este grupo, siendo ésta significativamente superior en el grupo FRESCO. Lo mismo ocurre con la tasa de embarazo clínico, que en la población global entre 35 y 38 años fue de 48.7%.

Para el objetivo principal del estudio, la tasa de nacido vivo observada fue de 29.8% en global, no observándose diferencias significativas entre los grupos de estudio. La tasa de aborto fue del 26.5% en la población global, siendo significativamente más alta en el grupo FRESCO.

Tabla VIII. Entre 35 y 38 años	CONGELADO (n=181)	FRESCO (n=450)	<i>p</i>	OR (CI 95%)
Beta positiva, n (%)	77 (42.5%)	278 (61.8%)	<0.001	0.46 (0.32, 0.65)
Embarazo clínico, n (%)	66 (36.5%)	241 (53.6%)	<0.001	0.50 (0.35, 0.71)
Nacido vivo, n (%)	56 (30.9%)	132 (29.3%)	0.701	1.08 (0.74, 1.57)
Aborto, n (%)	21 (11.6%)	146 (32.4%)	<0.001	0.27 (0.17, 0.45)

La no diferencia en la probabilidad de conseguir un nacido vivo persiste tras realizar un análisis multivariado, corrigiendo por los factores confusores identificados. Al comparar el grupo CONGELADO con el grupo FRESCO, el OR fue de 0.91 (IC 95% 0.51-1.63; *p* = 0.74). Tampoco se observó importancia significativa del fármaco de descarga ovulatoria

(OR agonista GnRH vs. hCGr de 1.48; IC 95% 0.77-2.86; p = 0.24), del número de ovocitos recuperados (log; OR 1.09; IC 95% 0.8-1.48; p = 0.6) ni el estadio de desarrollo embrionario durante la transferencia (OR día +4/+5 vs día +2/+3 de 2.06; IC 95% 0.75-5.71; p = 0.16). Solo tiene impacto estadísticamente significativo el número de embriones transferidos (OR 0.50; IC 95% 0.32-0.76; p = 0.001).

El detalle de este análisis para cada uno de los objetivos del estudio, puede encontrarse en la Tabla IX.

Tabla IX. Entre 35 y 38 años		CI 95%			
		OR	Inferior	Superior	p
Beta positiva	CONGELADO vs FRESCO	0.32	0.18	0.55	<0.001
	Agonista GnRh vs hCGr	1.91	1.03	3.55	0.040
	Ovocitos (log)	1.12	0.84	1.48	0.44
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.40	0.82	7.01	0.11
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.52	0.36	0.75	<0.001
Embarazo clínico	CONGELADO vs FRESCO	0.38	0.22	0.65	0.001
	Agonista GnRh vs hCGr	1.46	0.78	2.74	0.24
	Ovocitos (log)	1.21	0.92	1.61	0.18
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.34	0.83	6.58	0.11
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.55	0.38	0.79	0.001
Nacido vivo	CONGELADO vs FRESCO	0.91	0.51	1.63	0.74
	Agonista GnRh vs hCGr	1.48	0.77	2.86	0.24
	Ovocitos (log)	1.09	0.80	1.48	0.60
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.06	0.75	5.71	0.16
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.50	0.32	0.76	0.001

5.1.4 Pacientes de más de 38 años de edad.

El grupo de pacientes de edad reproductiva avanzada lo componen un total de 727 pacientes, que corresponden al 38.6% de la población total del estudio. De éstas, 621 (85.4%) pertenecían al grupo FRESCO y las restantes 106 pertenecían al grupo CONGELADO (14.6%). La edad media de este grupo fue de 40.8 ± 1.7 años.

La descarga ovulatoria se llevó a cabo con agonistas de la GnRH en apenas el 5.8% de los ciclos (42 pacientes, todas ellas en el grupo CONGELADO), utilizándose mayoritariamente hCGr en el 94.2% restante (685 ciclos).

Se obtuvo una media de 8 ± 5.4 ovocitos en global. La utilización de semen de donante fue del 12.1% de los ciclos (88 ciclos), sin diferencias significativas entre los grupos de estudio.

La media de embriones útiles para este grupo fue de 4.99 ± 3.83 embriones por ciclo, de los cuales se transfirieron un total de 1220 embriones en la primera transferencia. El 59.2% de los embriones transferidos (722 embriones) correspondían a embriones de calidad “top”.

Para las pacientes del grupo CONGELADO, la preparación endometrial se llevó a cabo mediante un ciclo natural modificado en el 20.8% de los casos. El 79.2% restante (84 ciclos) realizaron un ciclo artificial con estrógenos. La mayoría de las pacientes utilizó estrógenos transdérmicos (59.5%, 50 ciclos), mientras que el 40.5% restante (34 ciclos) utilizó estrógenos orales.

Las pacientes del grupo CONGELADO realizaron la transferencia embrionaria una media de 53.7 ± 35.7 días después de la recuperación ovocitaria. En cambio, las pacientes del grupo FRESCO se transfirieron tras una media de 2.75 ± 0.71 días.

La media de embriones transferidos fue de 1.68 ± 0.58 en global, siendo predominantes las transferencias de dos embriones (56.5%, 409 ciclos), seguidas de las transferencias de embrión único (38%, 276 ciclos). Se transfirieron tres embriones en 42 ciclos (5.8%).

La mayoría de las transferencias embrionarias se llevaron a cabo en día +3 (356 ciclos, 48.9%), seguidas de las de embriones de día +2 en el 39.1% (284 ciclos). La proporción de transferencias en día +4 fue de 10.2% de los casos (74 ciclos), mientras que las en estadio de blastocito alcanzaron al 1.8% de los ciclos (13 pacientes).

Las características demográficas y los resultados de la hiperestimulación ovárica controlada de la población de más de 38 años de edad, para los distintos grupos de estudio, están recogidos en la Tabla X.

Tabla X. Mayores de 38 años	FRESCO (n=621)	CONGELADO (n=106)	p
Edad, media (DS)	40.91 (1.77)	40.30 (1.33)	0.001
Nº ovocitos, media (DS)	6.86 (4.11)	14.53 (6.96)	<0.001
Nº embriones, media (DS)	4.28 (2.97)	9.18 (5.34)	<0.001
Fármaco descarga, n (%)			<0.001
hCG	621 (100%)	64 (60.4%)	
Agonista GnRH	0 (0.0%)	42 (39.6%)	
Procedencia semen, n (%)			0.28
Pareja	546 (87.9%)	93 (87.7%)	
Donante	75 (12.1%)	13 (12.3%)	
Embriones calidad top, n (%)	611/1056 (57.9%)	111/164 (67.7%)	0.017
Embriones transferidos, media (DS)	1.7 (0.59)	1.55 (0.50)	0.012
1, n (%)	228 (36.7%)	48 (45.3%)	
2, n (%)	351 (56.5%)	58 (54.7%)	
3, n (%)	42 (6.8%)	0 (0.0%)	
Día de transferencia, media (DS)	2.56 (0.56)	3.83 (0.53)	<0.001
2, n (%)	284 (45.7%)	0 (0.0%)	
3, n (%)	331 (53.3%)	25 (23.6%)	
4, n (%)	0 (0.0%)	74 (69.8%)	
5, n (%)	6 (1.0%)	7 (6.6%)	

Los resultados del análisis univariado de resultados reproductivos pueden observarse en la tabla XI.

La tasa de embarazo bioquímico por transferencia fue del 32.7% en total de las pacientes, siendo ésta significativamente superior en el grupo CONGELADO. Lo mismo ocurre con la tasa de embarazo clínico, que para las pacientes de más de 38 años fue de 26.3%.

Para el objetivo principal del estudio, la tasa de nacido vivo observada fue de 13.8% en global, de 19.8% en el grupo CONGELADO y 12.7% en el grupo FRESCO (p 0.05; OR 1.7, IC 95% 1.00-2.89). La tasa de aborto fue del 19% en la población global, sin diferencias significativas entre la población de estudio.

Tabla XI. Mayores de 38 años	CONGELADO (n=106)	FRESCO (n=621)	<i>p</i>	OR (CI 95%)
Beta positiva, n (%)	46 (43.4%)	192 (30.9%)	0.014	1.71 (1.13, 2.61)
Embarazo clínico, n (%)	37 (34.9%)	154 (24.8%)	0.025	1.62 (1.05, 2.52)
Nacido vivo, n (%)	21 (19.8%)	79 (12.7%)	0.050	1.70 (1.00, 2.89)
Aborto, n (%)	25 (23.6%)	113 (18.2%)	0.191	1.39 (0.85, 2.27)

En el análisis multivariado, el OR para lograr un recién nacido vivo, al comparar el grupo CONGELADO con el grupo FRESCO, fue de 1 (IC 95% 0.47-2.13; $p = 0.99$), por lo que no se observa un efecto positivo de realizar Freeze-all en estas pacientes. Tampoco tuvo importancia significativa el fármaco de descarga ovulatoria (OR agonista GnRH vs. hCGr de 1.67; IC 95% 0.62-4.51; $p = 0.31$), ni el mayor número de ovocitos recuperados (log; OR 1.45; IC 95% 1-2.1; $p = 0.05$), ni el estadio de desarrollo embrionario durante la transferencia (OR día +4/+5 vs día +2/+3 de 2.43; IC 95% 0.68-8.71; $p = 0.17$). Tampoco se observó efecto significativo del número de embriones transferidos en este resultado reproductivo (OR 0.61; IC 95% 0.37-1.01; $p = 0.05$).

El detalle del análisis de regresión logística para los distintos objetivos del estudio se resume en la tabla XII.

Tabla XII. Mayores de 38 años		CI 95%			
		OR	Inferior	Superior	p
Beta positiva	CONGELADO vs FRESCO	1.17	0.66	2.07	0.59
	Agonista GnRh vs hCGr	1.73	0.76	3.93	0.19
	Ovocitos (log)	1.24	0.95	1.61	0.11
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	3.31	1.01	10.83	0.05
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.50	0.35	0.72	<0.001
Embarazo clínico	CONGELADO vs FRESCO	1.044	0.57	1.90	0.89
	Agonista GnRh vs hCGr	1.56	0.67	3.62	0.30
	Ovocitos (log)	1.36	1.03	1.81	0.03
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	3.00	0.94	9.56	0.06
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.61	0.41	0.89	0.11
Nacido vivo	CONGELADO vs FRESCO	1.00	0.47	2.13	0.99
	Agonista GnRh vs hCGr	1.67	0.62	4.51	0.31
	Ovocitos (log)	1.45	1.00	2.10	0.05
	TE en día 4-5 vs. día 2-3	2.43	0.68	8.71	0.17
	Nº embriones TE (1 vs 2-3)	0.61	0.37	1.01	0.05

5.2 Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.

Se reclutaron un total de 512 pacientes que llevaban a cabo su primer ciclo autólogo de FIV. Las pacientes se dividieron en dos grupos:

aquellas que realizaron la criotransferencia embrionaria durante el primer ciclo menstrual tras la punción folicular (CICLO₁, 263 pacientes) y aquellas que la realizaron a partir del segundo ciclo menstrual (CICLO_{≥2}, 249 pacientes).

5.2.1 Datos demográficos y resultado de la estimulación ovárica

La edad media del total de las participantes fue estadísticamente similar, siendo en promedio de 35 ± 4.1 años en la población general.

La estimulación ovárica se llevó a cabo mayoritariamente a través de protocolo corto con antagonistas, siendo éste utilizado en el 77.5% de la población general, versus el 22.5% restante que utilizó un protocolo largo con agonistas. Esta proporción se mantuvo estable en los grupos de estudio.

Con respecto a las razones que llevaron al clínico a segmentar el ciclo, la prevención de SHO fue la causa en el 54.1% de los casos en la población general, seguido de la segmentación electiva (Freeze-all, 174 ciclos) en el 34% y de causas endometriales en el 11.9% (61 ciclos). Las razones no difirieron significativamente entre los grupos de estudio.

La descarga ovulatoria se llevó a cabo con agonistas de la GnRH en el 50.4% de los casos en la población general (258 ciclos), utilizándose hCGr en el 49.6% restante (254 ciclos). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

La utilización de semen de donante fue del 10.2% en promedio en la población general (52 casos), proporción que se mantuvo estable en ambos grupos de estudio.

Se recuperaron una media de 16.7 ± 7.7 ovocitos en global, de los cuales, la media de ovocitos MII fue de 12.1 ± 6 ovocitos, no observándose diferencias significativas entre los grupos de estudio.

La media de embriones útiles por paciente reclutada fue de 10.5 ± 5.6 embriones por ciclo en la población general. En la primera transferencia se transfirieron un total de 834 embriones, 588 de los cuales (70.5%) correspondieron a embriones considerados de calidad “top”. Esta variable estuvo homogéneamente distribuida en ambos grupos de estudio.

La media de embriones transferidos fue de 1.63 ± 0.5 en el global de la población del estudio, siendo más frecuente la transferencia de dos embriones en el 61.7% de los ciclos (316 pacientes), y seguida de las transferencias de embrión único (193 ciclos, 37.7%). Las transferencias de tres embriones fueron minoritarias, alcanzando al 0,6% de los ciclos (3 pacientes). No se observaron diferencias entre los grupos de estudio.

La mayoría de los embriones fueron vitrificados en día +3 y transferidos en día +4, no habiendo diferencias entre las proporciones en ambos grupos de estudio. Se realizaron 122 ciclos de transferencias en día +3 (23.8%) y en los 390 ciclos restantes (76.2%) se transfirió en día +4.

Con respecto a la preparación endometrial, sí observamos diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se utilizaron estrógenos orales en el 46.1% de los casos la población total, utilizándose estrógenos transdérmicos en el 53.5% restante (274 casos).

La latencia, o tiempo transcurrido entre la punción folicular y la transferencia embrionaria fue significativamente mayor en el grupo CICLO \geq 2, como era de esperarse. El tiempo de espera de la población global fue de 49.9 ± 36.9 días.

El detalle de las características demográficas y los resultados de los ciclos de HOC, para los dos grupos de estudio, está recogido en la Tabla XIII.

Tabla XIII.	Ciclo1 (N=263)	Ciclo≥2 (N=249)	p
Edad materna (años)	34.7 ± 4.13	35.3 ± 3.98	0.077
Oocitos recuperados (n ± DS)	17.2 ± 7.44	16.2 ± 7.99	0.17
MII totales (n ± DS)	12.6 ± 5.89	11.7 ± 6.03	0.092
Semen donante (n, %)	26 (9.9%)	26 (10.4%)	0.835
Latencia (días)	24.8 ± 3.99	76.5 ± 37.6	<0.001
N Total embriones (n ± DS)	10.7 ± 5.2	10.3 ± 6.07	0.505
Embriones Top	317/437 (72.5%)	271/397 (68.3%)	0.177
Embriones transferidos (n, %)	1.66 ± 0.498	1.59 ± 0.492	0.125
- 1	92 (35%)	101 (40.6%)	
- 2	168 (63.9%)	148 (59.4%)	0.116
- 3	3 (1.1%)	0	
Protocolo HOC (n, %)			
- Agonista largo	61 (23.2%)	54 (21.7%)	0.683
- Antagonista corto	202 (76.8%)	195 (78.3%)	
Tipo estrógenos (n, %)			
- Oral	137 (52.1%)	101 (40.6%)	0.009
- Transdérmico	126 (47.9%)	148 (59.4%)	
Día de CT (n, %)			
- +3	63 (24%)	59 (23.7%)	0.945
- +4	200 (76%)	190 (76.3%)	
Causa segmentación			
- Prevención SHO	153 (58.2%)	124 (49.8%)	0.07
- Endometrio	24 (9.1%)	37 (35.3%)	
- Freezeall	86 (32.7%)	88 (35.3%)	
Descarga ovulatoria			
- hCGr	122 (46.4%)	132 (53%)	0.134
- Agonista GnRH	141 (53.6%)	117 (47%)	

5.2.2 Análisis univariado de resultados reproductivos

La tasa de embarazo bioquímico por transferencia fue del 46.9% en la población general, siendo similar en ambos grupos de estudio. Con respecto a la tasa de embarazo clínico, ésta fue de 40.2% en general, siendo menor en el grupo CICLO \geq 2 aunque sin alcanzar significancia estadística.

No se observaron diferencias significativas en la tasa de aborto entre los grupos, siendo ésta de 13.9% en la población total. Tampoco las observamos para la tasa de implantación que fue de 39.6%.

Para el objetivo principal del estudio, la tasa de nacido vivo, ésta alcanzó valores de 32.6% en población global, observándose resultados significativamente más altos en el grupo CICLO₁.

El detalle de los resultados del análisis univariado comparando las CT realizadas durante el primer ciclo menstrual tras la punción folicular (Ciclo₁) or posteriormente (Ciclo \geq 2) tras utilizar una estrategia freeze-all se puede consultar en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Univariado	Ciclo1 (N=263)	Ciclo \geq 2 (N=249)	p	OR (CI 95%)
Beta positiva; n (%)	131 (49.8%)	109 (43.8%)	0.171	0.78 (0.55-1.11)
Embarazo clínico; n (%)	116 (44.1%)	90 (36.1%)	0.066	0.72 (0.5-1.02)
Aborto; n (%)	31 (11.8%)	40 (16.1%)	0.161	1.43 (0.86-2.37)
Nacido vivo; n (%)	99 (37.6%)	68 (27.3%)	0.013	0.62 (0.43-0.9)
Implantación \geq 50%; n (%)	113 (43%)	90 (36.1%)	0.12	0.75 (0.53-1.07)

5.2.3 Análisis multivariado de los resultados

Con la finalidad de corregir por factores confusores tales como edad de la mujer, fármaco utilizado para la descarga ovulatoria, tipo de preparación endometrial utilizada, número de ovocitos recuperados, estadio de desarrollo embrionario al momento de la transferencia y el número de embriones transferidos, se llevó a cabo un análisis multivariado de regresión logística, incluyendo estas variables en el análisis.

Tras este análisis observamos que las tendencias significativas observadas en el análisis univariado no se confirmaban.

En el caso del objetivo primario, el OR para lograr un nacido vivo al comparar el grupo CICLO \geq 2 con el grupo CICLO₁, fue de 0.73 (IC 95% 0.49-1.08; p = 0.12), sin alcanzar significancia estadística. Tampoco tuvieron importancia significativa el fármaco de descarga ovulatoria (OR agonista GnRH vs. hCGr de 1.12; IC 95% 0.74-1.67; p = 0.6) o el número de ovocitos recuperados (OR 1.02; IC 95% 0.99-1.06; p = 0.2).

Los factores que sí tuvieron impacto sobre la probabilidad de conseguir un nacido vivo fueron, como era esperable, la edad materna al comparar tanto pacientes de entre 35 y 40 años con las menores de 35 años (OR 0.63; IC 95% 0.42-0.95; $p = 0.03$) y sobre todo al comparar mayores de 40 años versus menores de 35 años (OR 0.34; IC 95% 0.17-0.67; $p = 0.002$), el número de embriones transferidos (2-3 embriones versus 1; OR 2.17; IC 95% 1.42-3.33; $p < 0.001$), el estadio de desarrollo embrionario durante la transferencia (OR día +4 vs día +3 de 1.73; IC 95% 1.07-2.82; $p = 0.03$) y el tipo de estrógenos usados durante la preparación endometrial (transdérmicos vs. orales; OR 0.62; IC 95% 0.42-0.92; $p = 0.02$).

El detalle del análisis multivariado está recogido en la Tabla XV.

Tabla XV. Multivariado		Odds Ratio	95% CI		p
			Inferior	Superior	
Beta positiva	Ciclo de CT (ciclo ≥ 2 vs. 1)	0.9	0.62	1.3	0.58
	Edad (35-40 vs. <35)	0.72	0.49	1.06	0.09
	Edad (≥ 40 vs <35)	0.54	0.30	0.95	0.03
	Ovocitos recuperados (n)	1.01	0.98	1.05	0.47
	Embriones transferidos (2-3 vs.1)	2.28	1.55	3.35	<0.001
	Día de transferencia (+4 vs. +3)	1.39	0.9	2.14	0.14
	Descarga ovulatoria (agonista vs. hCG)	1.32	0.9	1.92	0.16
	Causa segmentación (SHO vs. otras)	0.94	0.57	1.56	0.81
	Causa segmentación (endometrio vs. otras)	0.67	0.35	1.26	0.21
	Tipo estrógeno (transdérmico vs. oral)	0.83	0.57	1.2	0.32
Embarazo clínico	Ciclo de CT (ciclo ≥ 2 vs. 1)	0.81	.56	1.18	0.27
	Edad (35-40 vs. <35)	0.74	0.5	1.11	0.14
	Edad (≥ 40 vs <35)	0.51	0.28	0.93	0.03
	Ovocitos recuperados (n)	1.01	0.98	1.05	0.43
	Embriones transferidos (2-3 vs.1)	2.21	1.49	3.29	<0.001
	Día de transferencia (+4 vs. +3)	1.57	1.004	2.46	0.048
	Descarga ovulatoria (agonista vs. hCG)	1.18	1.8	1.73	0.4
	Causa segmentación (SHO vs. otras)	0.88	0.53	1.47	0.62
	Causa segmentación (endometrio vs. otras)	0.74	0.39	1.43	0.37
	Tipo estrógeno (transdérmico vs. oral)	0.76	0.52	1.11	0.15

Nacido vivo	Ciclo de CT (ciclo ≥ 2 vs. 1)	0.73	0.49	1.08	0.12
	Edad (35-40 vs. <35)	0.63	0.42	0.95	0.03
	Edad (≥ 40 vs <35)	0.34	0.17	0.67	0.002
	Ovocitos recuperados (n)	1.02	0.99	1.06	0.19
	Embriones transferidos (2-3 vs.1)	2.17	1.42	3.33	<0.001
	Día de transferencia (+4 vs. +3)	1.73	1.07	2.82	0.03
	Descarga ovulatoria (agonista vs. hCG)	1.12	0.74	1.67	0.6
	Causa segmentación (SHO vs. otras)	0.93	0.54	1.6	0.79
	Causa segmentación (endometrio vs. otras)	0.84	0.41	1.71	0.63
Tipo estrógeno (transdérmico vs. oral)	0.62	0.42	0.92	0.02	
Aborto	Ciclo de CT (ciclo ≥ 2 vs. 1)	1.81	0.99	3.29	0.05
	Edad (35-40 vs. <35)	1.49	0.79	2.8	0.22
	Edad (≥ 40 vs <35)	3.27	1.24	8.63	0.02
	Ovocitos recuperados (n)	0.95	0.9	1.01	0.09
	Embriones transferidos (2-3 vs.1)	0.77	0.4	1.5	0.44
	Día de transferencia (+4 vs. +3)	0.5	0.24	1.04	0.06
	Descarga ovulatoria (agonista vs. hCG)	1.37	0.72	2.61	0.34
	Causa segmentación (SHO vs. otras)	1.26	0.57	2.8	0.57
	Causa segmentación (endometrio vs. otras)	0.67	0.21	2.17	0.51
Tipo estrógeno (transdérmico vs. oral)	2.1	1.13	3.93	0.02	

6. Discusión

6.1. Resultados reproductivos de la primera transferencia embrionaria en fresco vs. ciclo segmentado.

De acuerdo con los resultados de este estudio, no encontramos diferencias significativas en la tasa de nacido vivo en mujeres de más de 35 años.

Observamos tasas más altas de embarazo bioquímico y clínico en las pacientes de más de 38 años que fueron sometidas a un ciclo segmentado. Sin embargo, la tasa de recién nacido -antes de ajustar por

factores confusores- sólo fue significativamente más alta en las pacientes más jóvenes (43.7% vs 24.5%), diferencia que mantuvo significancia estadística tras el análisis de regresión logística (OR 2.43; 95% CI 1.32-4.51; $p=0.003$). En este grupo de mujeres jóvenes también observamos una tasa significativamente menor de aborto en el grupo CONGELADO, en concordancia con la evidencia actualmente disponible (Bosdou et al, 2019).

Una observación interesante que se desprende de nuestros datos es que, en mujeres de hasta 35 años y tras ajustar por factores de confusión, el único factor que tuvo una influencia significativa sobre la tasa de nacido vivo aparte de la edad, fue el número de embriones transferidos.

Hasta ahora se ha propuesto que el potencial beneficio de aplicar una estrategia de freeze-all disminuye en relación con la disminución en la respuesta ovárica (Bosdou et al, 2019; Roque et al, 2017 y 2019) y diferentes métodos de estratificación se han propuesto para usar la respuesta ovárica como un mejor predictor de resultados en ciclos de FIV (Polyzos and Sunkara, 2015; Drakopoulos et al, 2016). En nuestro estudio, las pacientes que realizaron un ciclo segmentado obtuvieron un número significativamente mayor de ovocitos en todos los grupos de edad (Tabla I) y, dado esto, se podría considerar que tienen un pronóstico más favorable.

Sin embargo, en pacientes mayores de 35 años, no observamos diferencias en la tasa de nacido vivo a pesar del mayor número de ovocitos obtenidos. Más aún, en el análisis multivariado y tras ajustar

por estas diferencias, el número de ovocitos recuperados no tuvo un impacto significativo en ningún grupo de edad.

En nuestra opinión, estos resultados demuestran que a pesar de el impacto negativo de la HOC sobre la receptividad endometrial y el sistema inmunológico están bien documentadas, el peso de este efecto deletéreo sobre los resultados reproductivos disminuye con la edad, por el efecto negativo de ésta sobre la calidad embrionaria. Este fenómeno es independientemente del número de ovocitos recuperados.

Según nuestros datos, en pacientes de mayor edad reproductiva, el potencial efecto beneficioso de segmentar el ciclo de FIV sobre las modificaciones inducidas por la HOC a nivel endometrial y sobre la sincronía endometrio-embrión no es suficiente para compensar por la pérdida de calidad que ocurre en forma fisiológica con el aumento en la edad.

La principal limitación de este estudio es que es retrospectivo, lo cual introduce una serie de sesgos potenciales que son difíciles de controlar. Por otro lado, su fortaleza radica en ser el primer estudio en realizar un análisis crítico de los resultados de aplicar una estrategia de segmentación en pacientes estratificadas por edad. Como es evidente, estos resultados deben ser contrastados con estudios prospectivos, aleatorizados para confirmar la validez de los mismos.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta que, de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio, no obtenemos unas mejores tasas de nacido vivo tras aplicar una estrategia de freeze-all en pacientes de

edad reproductiva avanzada, podemos rechazar nuestra hipótesis de trabajo inicial.

6.2. Determinación del momento óptimo para realizar la primera transferencia embrionaria en pacientes sometidas a la estrategia Freeze-all.

De acuerdo a los resultados del estudio, no encontramos diferencias en la tasa de nacido vivo entre las pacientes de FIV segmentada que realizaron la primera criotransferencia durante el primer ciclo menstrual después de la punción folicular y las que la realizaron posteriormente.

Los resultados publicados en la literatura hasta hoy, que sugieren mejores resultados reproductivos tras la realización de un ciclo segmentado de FIV, han llevado a un aumento en la proporción de ciclos en los que se realiza la criopreservación de toda la cohorte embrionaria (Shapiro et al., 2014).

Al parecer, estas diferencias podrían ser explicadas -al menos en parte- por el efecto de la HOC sobre la expresión génica y el estatus inmunológico del endometrio (Mirkin et al., 2004; Horcajadas et al. 2005; Simon et al., 2005; Horcajadas et al. 2008; Haouzi et al. 2009; Chaouat, 2013; Junovich et al., 2011), que acaban reduciendo la

receptividad endometrial y la sincronía entre endometrio y embrión (Weinerman y Mainigi, 2014).

A pesar de esto, hasta la publicación de este estudio, el clínico no contaba con herramientas que le permitieran recomendar cuánto era recomendable esperar, después de la punción folicular, para realizar la criotransferencia electiva en un ciclo segmentado. Esto llevaba a demorar innecesariamente el procedimiento, lo cual podría tener un efecto negativo desde el punto de vista psicológico en los pacientes, el cual se sumaba al estrés normal ya asociado con un diagnóstico de esterilidad y la necesidad de realizar tratamientos de reproducción asistida.

En este estudio pudimos comprobar que los resultados reproductivos eran comparables entre pacientes que realizaban la criotransferencia inmediatamente y quienes la realizaban con posterioridad, observando además que estos resultados eran comparables con los publicados en la literatura (Roque et al., 2015a).

Tampoco observamos impacto significativo del protocolo de estimulación ovárica controlada o del fármaco para desencadenar la ovulación en los resultados. En nuestra opinión, estos resultados muestran que el potencial efecto deletéreo de la HOC sobre la receptividad endometrial termina, clínicamente, tras el sangrado por privación después de la punción folicular, independientemente del protocolo de estimulación, fármaco de descarga ovulatoria o preparación endometrial utilizados.

Estos resultados muestran que la criotransferencia de los mejores embriones en un ambiente endometrial más fisiológico puede ser

realizada tan pronto como después de la primera menstruación tras la punción folicular, optimizando los resultados reproductivos y sin incurrir en demoras innecesarias. Esta nueva información permite al clínico tener en cuenta las preferencias de los pacientes al momento de decidir cuándo es el mejor momento para transferir. Esta práctica orientada al paciente debería ser parte integral en la práctica clínica moderna, al igual que en la investigación clínica (Dancet et al., 2010, 2011 y 2014).

La limitación principal de este estudio es el sesgo potencial e incontrolable propio de los estudios retrospectivos. A pesar de que no encontramos diferencias significativas en los resultados entre los grupos estudiados, sí observamos cierta heterogeneidad entre nuestros pacientes respecto de la preparación endometrial para la criotransferencia, aunque dada la evidencia disponible (Ferrer-Molina et al., 2018), es poco probable que este hecho haya tenido un impacto significativo en los resultados observados.

Con respecto a la potencia estadística del análisis, se podría argumentar que la falta de significancia en las diferencias observadas para la tasa de nacido vivo entre grupos podría estar explicada por una baja potencia estadística. Sin embargo, el escaso margen observado en los intervalos de confianza para el OR obtenido (0.48-1.06) indica que el análisis es suficientemente potente para detectar efectos de tamaño medio o grande.

Finalmente, este ha sido el primer estudio en sugerir que la receptividad endometrial se recupera tras el primer sangrado por privación posterior a la punción folicular y que realizar la

criotransferencia embrionaria durante este primer ciclo no se asocia con un impacto negativo en la tasa de nacido vivo tras un ciclo segmentado. Estos resultados han sido confirmados posteriormente por otros autores (Ozgur et al., 2018; Bourdon et al., 2018) y existen estudios prospectivos, aleatorizados y controlados en curso que buscan acabar de confirmar estos resultados (NCT03201783).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio podemos, entonces, rechazar la hipótesis de trabajo inicial, dado que no observamos superioridad en términos de la probabilidad de conseguir un recién nacido vivo tras diferir la transferencia más allá del primer ciclo menstrual después de la recuperación ovocitaria.

6.3. Consideraciones finales

Durante la estimulación ovárica para FIV, el desarrollo de múltiples folículos implica la exposición a niveles elevados de estradiol y progesterona. Este ambiente endocrino periconcepcional alterado podría afectar negativamente la posibilidad de un embrión de implantar (Venetis et al, 2016), aunque no parece que se pueda relacionar esta afectación con un efecto deletéreo de la HOC sobre la calidad embrionaria (Check et al, 1999; Venetis et al, 2013). Sin embargo, sí se ha demostrado un desarrollo sub-óptimo del endometrio en la fase lútea inicial generado por el uso de gonadotropinas (Ubaldi et al, 1997) y una alteración en el patrón de

expresión génica endometrial en comparación con un ciclo natural (Mirkin et al., 2004; Horcajadas et al. 2005; Simon et al., 2005; Horcajadas et al. 2008; Haouzi et al. 2009), lo que permite atribuir esta disminución en la probabilidad de implantación a una disminución en la receptividad endometrial más que a un efecto deletéreo sobre la calidad embrionaria.

La estrategia de freeze-all, o segmentación electiva del ciclo de FIV, estrategia sustentada por las importantes mejoras en las técnicas de criopreservación embrionaria e inicialmente desarrollada para reducir el riesgo de SHO moderado/severo e incrementar la seguridad de las técnicas de reproducción asistida (Devroey et al, 2011), permite que los embriones de buena calidad disponibles sean criopreservados y transferidos al útero en un ciclo posterior, tras una preparación endometrial natural o artificial (Roque et al, 2015b). De esta forma, los embriones serían transferidos a un endometrio más receptivo.

En presencia de un número elevado de folículos es esperable la consiguiente obtención de un número elevado de embriones. En este escenario, la probabilidad de encontrarnos con un endometrio más deteriorado es mayor, y también existe una mejor posibilidad de seleccionar un buen embrión para transferir, luego, en un endometrio normal tras un ciclo segmentado, lo que haría esperable que los ciclos segmentados ofrezcan superioridad frente a los ciclos en fresco en términos de resultados reproductivos.

Sin embargo, este potencial beneficio podría no estar presente en aquellos ciclos en los cuales la respuesta folicular, y por lo tanto el número de ovocitos y embriones útiles disponibles, sea menor. En

estos casos sería también esperable que los niveles de esteroides sean menores y que el endometrio se encuentre menos deteriorado, lo cual hace más difícil poder observar alguna superioridad del ciclo segmentado en estas pacientes.

En los últimos dos años hemos sido testigos de la publicación de un interesante número de nuevos estudios prospectivos que intentan aportar luces acerca de qué grupo de pacientes se benefician de una estrategia de freeze-all. Esto, a su vez, ha propiciado la aparición de nuevos meta-análisis que han arrojado conclusiones importantes, tales como que la tasa de nacido acumulada parece ser mayor a favor de los ciclos segmentados en pacientes hiper-respondedoras, pero al analizar a la población general o en normo-respondedoras esta diferencia no parece ser significativa (Wong et al, 2017; Zhang et al, 2018; Roque et al, 2019). Esta conclusión no parece sorprendente si pensamos que en donde se puede manifestar una teórica superioridad de una estrategia sobre otra es en la primera transferencia embrionaria. Los resultados reproductivos de las siguientes criotransferencias no deberían diferir significativamente, dado que la receptividad endometrial no estaría comprometida en ninguna de las estrategias.

Sin embargo, al analizar los resultados de la primera transferencia, sólo se ha evidenciado superioridad de la estrategia de freeze-all en hiperrespondedoras (Bosdou et al, 2019).

Si consideramos que la principal diferencia sería el resultado de la primera transferencia embrionaria, consideraciones acerca del tiempo al embarazo cobran mayor importancia y se podría argumentar que diferir la transferencia embrionaria tras un ciclo segmentado podría

aumentar el tiempo que tardamos en conseguir el embarazo e inclinar la balanza en favor de realizar ciclos en fresco. Nuestros resultados permiten plantear que no es necesario demorar innecesariamente la primera transferencia en un ciclo segmentado y que ésta puede llevarse a cabo con excelentes resultados tras una media de 24.8 ± 3.99 días, tiempo que podría ser considerado de poca relevancia clínica (Lattes et al, 2017).

Por lo tanto, a la luz de la evidencia disponible en la actualidad, y excluyendo a aquellas pacientes que deban hacer procedimientos especiales tales como diagnóstico genético preimplantacional (Coates et al, 2017) o estudios de receptividad endometrial, podemos recomendar -al menos en términos de eficacia- la segmentación electiva de los ciclos de FIV en pacientes hiper-respondedoras o con antecedentes de Síndrome de Ovarios Poliquísticos. No se han publicado hasta ahora estudios prospectivos y aleatorizados, que valoren esta interrogante en pacientes con baja respuesta ovárica, pero nuestros resultados sugieren que los resultados serían comparables entre ambas estrategias.

Sin embargo, cuando se toman decisiones basadas en la evidencia, el denominador sobre el que se debieran sustentar estas decisiones debe incluir no solo medidas de eficacia sino tener en cuenta, como uno de los criterios principales, la seguridad de los pacientes (Martins et al, 2018). Y ante valores comparables en términos de eficacia (es decir, tasas de éxito), es nuestra obligación contemplar la opción más segura para nuestras pacientes. Si consideramos que el principal riesgo de la estimulación ovárica controlada durante la realización de un ciclo de fecundación in vitro es la ocurrencia del síndrome de

hiperestimulación ovárica, y tenemos en cuenta que la mejor herramienta de la que disponemos para evitar su aparición es la utilización de protocolos con antagonistas de la GnRH y realizar la descarga ovulatoria con agonistas de la GnRH, asociado a una estrategia de freeze-all, podemos concluir que aunque en estos momentos la segmentación de los ciclos de FIV no pueda ser planteada como una estrategia universal, se erige como una herramienta que le permite al clínico contar con excelentes tasas de éxito, a la vez que ofrece el mayor nivel de seguridad posible.

7. Conclusiones

- a. Las pacientes de menos de 35 años de edad se beneficiarían de la segmentación del ciclo de FIV para optimizar su tasa de nacido vivo.

- b. Las pacientes de menos de 35 años de edad se beneficiarían de la segmentación del ciclo de FIV para optimizar su tasa de embarazo clínico.

- c. Las pacientes entre 35 y 38 años de edad se beneficiarían de la segmentación del ciclo de FIV para disminuir su tasa de aborto

- d. El tiempo transcurrido entre la estimulación ovárica controlada y la primera criotransferencia de embriones en la estrategia freeze-all, no influye en las tasas de nacido vivo.

- e. El tiempo transcurrido entre la estimulación ovárica controlada y la primera criotransferencia de embriones en la estrategia freeze-all, no influye en las tasas de embarazo clínico.

- f. El tiempo transcurrido entre la estimulación ovárica controlada y la primera criotransferencia de embriones en la estrategia freeze-all, no influye en las tasas de aborto.

8. Bibliografía

Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, Gardner DK. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival metabolism and blastocyst formation. Hum Reprod 2008;23:1976-1982.

Barnhart KT. Introduction: are we ready to eliminate the transfer of fresh embryos in in vitro fertilization? Fertil Steril 2014;102:1-2.

Bosdou JK, Venetis CA, Tarlatzis BC, Grimbizis GF, Kolibianakis EM. Higher probability of live-birth in high, but not normal, responders after first frozen-embryo transfer in a freeze-only cycle strategy compared to fresh-embryo transfer: a meta-analysis. *Hum Reprod* 2019;1:1-15.

Bourdon M, Santulli P, Maignien C, Pocate-Cheriet K, Alwohaibi A, Marcellin L, et al. (2018) The interval between oocyte retrieval and frozen-thawed blastocyst transfer does not affect the live birth rate and obstetrical outcomes. *PLoS One* 2018; 13(10): e0206067.

Chaouat G. Inflammation, NK cells and implantation: friend and foe (the good, the bad and the ugly?): replacing placental viviparity in an evolutionary perspective. *J Reprod Immunol* 2013;97:2-13.

Check JH, Choe JK, Katsoff D, Summers-Chase D, Wilson C. Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:416-420.

Coates A, Kung A, Mounts E, Hesla J, Bankowski B, Barbieri E, Ata B, Cohen J, Munne S. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2017;107:723-730 e723.

Dancet EAF, Nelen WLDM, Sermeus W, De Leeuw L, Kremer JAM, D'Hooghe TM. The patients' perspective on fertility care: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010;16:467-487.

Dancet EAF, Van Empel IWH, Rober P, Nelen WLDM, Kremer JAM, D'Hooghe TM. Patient-centered infertility care: a qualitative study to listen to the patient's voice. *Hum Reprod* 2011;26:827-833.

Dancet EAF, D'Hooghe TM, van der Veen F, Bossuyt P, Sermeus W, Mol BW, Repping S. 'Patient-centered fertility treatment': what is required? *Fertil Steril* 2014;101:924-926.

De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Smeenk J, Vidakovic S, Goossens V; European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2018;33:1586-1601.

Debrock S, Peeraer K, Fernandez Gallardo E, De Neubourg D, Spiessens C, D'Hooghe TM. Vitrification of cleavage stage day 3

embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: a RCT. *Hum Reprod* 2015;30:1820-1830.

Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod* 2011;26:2593-2597.

Doody KJ. Cryopreservation and delayed embryo transfer-assisted reproductive technology registry and reporting implications. *Fertil Steril* 2014;102:27-31.

Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, de Vos M, Tournaye H et al. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximise cumulative live birth rates utilization of all fresh and frozen embryos?. *Hum Reprod* 2016;31:370-376.

Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2012;18:536-554.

Eurostat, 2014. LINK:http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Fertility_statistics

Fasano G, Fontenelle N, Vannin AS, Biramane J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. A randomized controlled trial comparing two vitrification methods versus slow-freezing for cryopreservation of human cleavage stage embryos. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:241-247.

Ferrer-Molina P, Calatayud-Lliso C, Carreras-Collado R, Muñoz-García M, Díaz-Bachiller M, Blanes-Espí J, Checa M. Oral versus transdermal oestrogen delivery for endometrial preparation before embryo transfer: a prospective, comparative, randomized clinical trial. *Reprod Biomed Online* 2018;37:693-702.

Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012; 24;10:32-42.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73:1155-1158.

Ginström Ernstad E, Wennerholm U-B, Khatibi A, Petzold M, Bergh C. Neonatal and maternal outcome after frozen embryo transfer: increased risks in programmed cycles. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.03.010>.

Giorlandino C, Cignini P, Padula F, Giannarelli D, d'Emidio L, Aloisi A, Plotti F, Angioli R. Effects of exogenous progesterone on fetal nuchal translucency: an observational prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 2015;212:335.e1-7.

Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 1990;53:469-472.

Grunfeld L, Walker B, Bergh PA, Sandler B, Hofmann G, Navot D. High resolution endovaginal ultrasonography of the endometrium: a noninvasive test for endometrial adequacy. *Obstet Gynecol* 1991;78:200-204.

Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Rème T, Hedon B, De Vos J, Hamamah S. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod* 2009;24:1436-1445.

Healy DL, Breheny S, Halliday J, Jaques A, Rushford D, Garrett C, Talbot JM, Baker HW. Prevalence and risk factors for obstetric haemorrhage in 6730 singleton births after assisted reproductive technology in Victoria Australia. *Hum Reprod* 2010;25:265-274.

Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005;11:195–205.

Horcajadas JA, Minguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Dominguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4500–4510.

Junovich G, Mayer Y, Azpiroz A, Daher S, Iglesias A, Zylverstein C, Gentile T, Pasqualini S, Markert UR, Gutiérrez G. Ovarian stimulation affects the levels of regulatory endometrial NK cells and angiogenic cytokine VEGF. *Am J Reprod Immunol* 2011;65:146–153.

Kleinhans FW, Mazur P. Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. *Cryobiology* 2007;54:212–222.

Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, Devroey P. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing

hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025-1029.

Lattes K, Checa MA, Vassena R, Brassesco M, Vernaev V. There is no evidence that the time from egg retrieval to embryo transfer affects live birth rates in a freeze-all strategy. *Hum Reprod* 2017;32:368-374.

Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod* 2014;29:2794-2801.

Londra L, Moreau C, Strobino D, Garcia J, Zacur H, Zhao Y. Ectopic pregnancy after in vitro fertilization: differences between fresh and frozen-thawed cycles. *Fertil Steril* 2015;104:110-118.

Lopez S, Lattes K, Vassena R, Brassesco M, Vernaev V. Freeze-all in older women: benefit or loss? *Hum Reprod* 2016;31:i5.

Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186-193.

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.

Maheshwari A, Pandey S, Amalraj Raja E, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? *Hum Reprod Update*. 2018 Jan 1;24(1):35-58.

Martins WP, Niederberger C, Nastri CO, Racowsky C. Making evidence-based decisions in reproductive medicine. *Fertil Steril* 2018;110:1227-1230.

Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347–369.

Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Díaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5742–5752.

Ozgur K, Bulut H, Berkkanoglu M, Humaidan P, Coetzee K. Frozen embryo transfer can be performed in the cycle immediately following the freeze-all cycle. *J Assist Reprod Genet* 2018;35:135-142.

Pelkonen S, Hartikainen AL, Ritvanen A, Koivunen R, Martikainen H, Gissler M, Tiitinen A. Major congenital anomalies in children born after frozen embryo transfer: a cohort study 1995-2006. *Hum Reprod* 2014;29:1552-1557.

Pelkonen S, Gissler M, Koivurova S, Lehtinen S, Martikainen H, Hartikainen AL, Tiitinen A. Physical health of singleton children born after frozen embryo transfer using slow freezing: a 3-year follow-up study. *Hum Reprod* 2015;30:2411-2418.

Polyzos NP and Sunkara SK. Sub-optimal responders following controlled ovarian stimulation: an overlooked group?. *Hum Reprod* 2015;30:2005-2008.

Polyzos NP, Drakopoulos P, Parra J, Pellicer A, Santos-Ribeiro S, Tournaye H, Bosch E, Garcia-Velasco J. Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved after first ovarian stimulation for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection:

a multicenter multinational analysis including 15000 women. *Fertil Steril* 2018;110:661-670.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at 196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.

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;99:156-62.

Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril* 2015a;103:1190-1193.

Roque M. Freeze-all policy: is it time for that? *J Assist Reprod Genet* 2015b;32:171-176.

Roque M, Valle M, Guimaraes F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all for all normal responders?. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:179-185.

Roque M, Haahr T, Geber S, Esteves SC, Humaidan P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic

review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update* 2019;25:2-14.

Santistevan A, Hunter Cohn K, Arredondo F, Miller B, Ory S, Leondires M. Multi-center study demonstrates freeze-all IVF protocols are correlated with higher ongoing pregnancy rates in women of advanced maternal age. *Hum Reprod* 2016;31:i102-i103.

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;96:344-348.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril* 2014;102:3-9.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Freeze-all at the blastocyst or bipronuclear stage: a randomized clinical trial. *Fertil Steril* 2015;104:1138-44.

Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev* 1992;33:210–214.

Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:583–605.

Shi Y, Sun Y, Hao C, Zhang H, Wei D, Zhang Y, Zhu Y, Deng X, Qi X, Li H, Ma X, Ren H, Wang Y, Zhang D, Wang B, Liu F, Wu Q, Wang Z, Bai H, Li Y, Zhou Y, Sun M, Liu H, Li J, Zhang L, Chen X, Zhang S, Sun X, Legro RS, Chen ZJ. Transfer of Fresh versus Frozen Embryos in Ovulatory Women. *N Engl J Med*. 2018;378:126-136.

Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, Baker HW. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod* 2008;23:1644-1653.

Simon C, Oberye J, Bellver J, Vidal C, Bosch E, Horcajadas JA, Murphy C, Adams S, Riesewijk A, Mannaerts B, Pellicer A. Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Hum Reprod* 2005;20:3318–3327.

Soares SR, Gomez R, Simon C, Garcia-Velasco JA, Pellicer A.
Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent
ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update*
2008;14:321-333.

Steward RG, Lan L, Shah AA, Yeh JS, Price TM, Goldfarb JM, et al.
Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome
and live birth: an analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles. *Fertil
Steril* 2014;101:967-973.

Ubaldi F, Bourgain C, Tournaye H, Smitz J, Van Steirteghem A,
Devroey P. Endometrial evaluation by aspiration biopsy on the day of
oocyte retrieval in the embryo transfer cycles in patients with serum
progesterone rise during the follicular phase. *Fertil Steril* 1997;67:521-
526.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al.
Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce
cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53-
58.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-796.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum Reprod Update* 2013;19:433-57.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Lainas GT, Sfontouris IA, Tarlatzis BC, Lainas TG. Estimating the net effect of progesterone elevation on the day of hCG on live birth rates after IVF: a cohort analysis of 3296 IVF cycles. *Hum Reprod* 2015;30:684-691.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Lainas GT, Sfontouris IA, Tarlatzis BC, Lainas TG. Basal serum progesterone and history of elevated progesterone on the day of hCG administration are significant predictors of late follicular progesterone elevation in GnRH antagonist IVF cycles. *Hum Reprod* 2016;31:1859-1865.

Vidal M, Vellvé K, González-Comadran M, Robles A, Prat M, Torné M, Carreras R, Checa MA. Perinatal outcomes in children born after fresh or frozen embryo transfer: a Catalan cohort study based on 14,262 newborns. *Fertil Steril* 2017;107:940-947.

Von Versen-Höynck F, Schaub AM, Chi YY, Chiu KH, Liu J, Lingis M, Stan Williams R, Rhoton-Vlasak A, Nichols WW, Fleischmann RR, Zhang W, Winn VD, Segal MS, Conrad KP, Baker VL. Increased Preeclampsia Risk and Reduced Aortic Compliance With In Vitro Fertilization Cycles in the Absence of a Corpus Luteum. *Hypertension* 2019;73:640-649.

Vuong LN, Dang VQ, Ho TM, Huynh BG, Ha DT, Pham TD, Nguyen LK, Norman RJ, Mol BW. IVF Transfer of Fresh or Frozen Embryos in Women without Polycystic Ovaries. *N Engl J Med* 2018;378:137-147.

Wei D, Liu JY, Sun Y, Shi Y, Zhang B, Liu JQ, Tan J, Liang X, Cao Y, Wang Z, Qin Y, Zhao H, Zhou Y, Ren H, Hao G, Ling X, Zhao J, Zhang Y, Qi X, Zhang L, Deng X, Chen X, Zhu Y, Wang X, Tian LF, Lv Q, Ma X, Zhang H, Legro RS, Chen ZJ. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 2019;393:1310-1318.

Weinerman R, Mainigi M. Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: the translational rationale. *Fertil Steril* 2014;102:10-18.

Wong KM, Mastenbroeck S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2014;102:19-26.

Wong KM, van Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, Issue 3. Art. No.: CD011184.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, Simpson JL, van der Poel S. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod* 2017;32(9):1786-1801.

Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42:293-296.

Zhang W, Xiao X, Zhang J, Wang W, Wu J, Peng L, Wang X. Clinical outcomes of frozen embryo versus fresh embryo transfer following in vitro fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Gynecol Obstet* 2018;298:259-272.