



Guía 21

CICLOS DE CRIOPRESERVACIÓN Y VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES: INDICACIONES Y TRANSFERENCIA DIFERIDA

Autores: Lattes K^{1,3}, Prat M^{2,3}, Robles A^{2,3}, Carreras R², Brassesco M¹, Checa MA^{1,2,3}.

Centro:

¹Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH-Eugin). Barcelona


²Sección de Reproducción Humana. Hospital del Mar. Barcelona.

³Grup de Recerca en Infertilitat Barcelona. (GRI-BCN). Institut Hospital del Mar de Investigacions mèdiques (IMIM). Barcelona.

Actualmente, la transferencia embrionaria en fresco constituye la forma más común de transferencia en los ciclos de fecundación in vitro (FIV). Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la incertidumbre sobre los posibles efectos adversos de la hiperestimulación ovárica controlada (HOC), no sólo en relación al riesgo aumentado de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), sino también sobre sus posibles efectos deletéreos sobre el endometrio y sus posibles implicaciones en los resultados obstétricos y perinatales.

Los recientes avances en criopreservación de ovocitos y embriones han permitido una mejoría sustancial en los resultados de la FIV. A nivel mundial, esto se ha traducido en un aumento significativo en el número de ciclos de transferencia de embriones congelados (TEC), lo que a su vez ha derivado en aumentos importantes en las tasas de recién nacidos vivos (RNV) por esta técnica, hasta el punto de que, en la actualidad, los RNV por TEC representan cerca del 30% de todos los niños nacidos de ciclos autólogos de FIV.

Los recientes avances en criopreservación de ovocitos y embriones han permitido una mejoría sustancial en los resultados de la FIV, evitando, no sólo, los posibles riesgos de un SHO sino también, los cada vez más demostrados, efectos adversos de la propia HOC sobre el endometrio.



Este aumento en la utilización y éxito de la TEC deriva de múltiples causas:

1. Criopreservación embrionaria.

El desarrollo de la vitrificación ha reducido significativamente el efecto deletéreo de la criopreservación sobre los embriones, lo que permite una supervivencia y desarrollo embrionarios similar a la del cultivo en fresco, aumentando las tasas de éxito y la confianza -tanto del personal sanitario como de los pacientes- en la viabilidad de la técnica. A su vez, esto ha fomentado la vitrificación de toda la cohorte embrionaria, reservando los embriones morfológicamente mejores para ser transferidos en mejores condiciones.

2. Efecto deletéreo sobre el endometrio.

Uno de los objetivos principales de los ciclos de FIV es el desarrollo multifolicular y la obtención de múltiples ovocitos en un mismo ciclo de estimulación. Esto se consigue a través de la HOC con gonadotropinas exógenas y va acompañado de la producción de niveles suprafisiológicos de estrógenos (E_2), progesterona (Pg) y otras hormonas.

Estos patrones hormonales alterados se reflejan tanto en la aparición de endometrios histológicamente avanzados durante los ciclos estimulados y en una disminución de los receptores de progesterona en las células endometriales. Estas alteraciones morfológicas y bioquímicas en el endometrio se correlacionan con elevaciones prematuras de Pg y llevan a un desplazamiento de la ventana de implantación que determina fallos de implantación a través de la alteración de la sincronía entre embrión y endometrio.

Los niveles hormonales suprafisiológicos observados durante la HOC (tanto en ciclos de agonistas como de antagonistas) generarían un patrón alterado de receptividad endometrial al afectar la expresión de más de 200 genes que tienen que ver con la implantación (TGF- β , cascada de coagulación, complemento, migración leucocitaria transendotelial, etc.) y el control del ciclo celular (ciclina). Sin embargo todavía no existe un consenso sobre cuál es el umbral hormonal que se considera suprafisiológico, a partir del cual se alteraría la receptividad endometrial.

Todos estos cambios iatrogénicos producidos por la HOC a nivel endometrial parecen no afectar a la calidad ovocitaria ni embrionaria. En estudios con ciclos de HOC en donantes de ovocitos se ha evidenciado que los niveles suprafisiológicos de progesterona en las donantes no

tenían efectos adversos en la calidad ovocitaria ni en las tasas de implantación en las receptoras.

3. Contractibilidad uterina.

Se sabe también que las contracciones uterinas durante la transferencia embrionaria tienen un efecto adverso en los procesos de implantación, afectando a los resultados de los ciclos de FIV.

Existen estudios que encuentran un aumento de la contractibilidad uterina en los ciclos de HOC comparado con los ciclos naturales. Se cree que los niveles suprafisiológicos de estradiol durante la HOC provocarían un aumento de la contractibilidad uterina disminuyendo las tasas de implantación. Este efecto sería especialmente importante para la transferencia de embriones en día +2 y +3 ya que se sabe que la contractibilidad uterina disminuye progresivamente, siendo mínima en el momento de la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto. Sin embargo, no hay estudios que comparen la contractibilidad uterina en los ciclos de HOC con los ciclos de transferencia embrionaria diferida.

4. Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.

No debemos olvidar que la HOC con transferencia en fresco se asocia a un riesgo no despreciable de SHO (1-14%). Se trata de una complicación iatrogénica que en algunos casos puede poner en peligro la vida de las pacientes. El principal desencadenante del SHO es la administración de hCG, que produce un aumento suprafisiológico de los niveles de VEGF y su receptor, el VEGFR-2 produciendo una gran vasodilatación. La utilización de agonistas de GnRH en la descarga ovulatoria conduce a la producción de un pico de LH y FSH que no sólo induce la maduración ovocitaria final, sino que además genera una fase lútea deficiente que evita la producción de sustancias vasoactivas (VEGF) por parte del cuerpo lúteo, lo cual reduce el riesgo de SHO.

Pese a esto, entre 2014 y 2015 se han reportado 5 casos anecdóticos de SHO severo luego de utilización de ciclos de HOC con antagonistas y posterior descarga ovulatoria con análogos de la GnRH (en lugar de la hCG), asociado a criopreservación de la cohorte embrionaria. Por lo tanto, los clínicos deben tener en cuenta que la transferencia en diferido disminuye significativamente el riesgo de desarrollo de SHO, pero no lo elimina por completo.

La evidencia científica disponible en la actualidad parece sugerir que la HOC produciría una disminución de la receptividad endometrial, con la obtención de peores resultados en las tasas de embarazo cuando la transferencia embrionaria se realiza en fresco en pacientes que presentan una respuesta normal o alta a la HOC. Sin embargo, son necesarios más estudios aleatorizados que incluyan un mayor número de pacientes para llegar a conclusiones definitivas y poder establecer con precisión qué grupo de

pacientes serán las más beneficiadas por una transferencia diferida de embriones.

El aumento en la utilización y éxito de la TEC es fruto de una mejoría en los programas de vitrificación de ovocitos y embriones junto con la demostración de que la HOC puede producir una disminución de la receptividad endometrial, mayor contractibilidad uterina y, en algunos casos, riesgo de SHO.

Son necesarios más estudios aleatorizados para llegar a conclusiones definitivas y poder establecer, con precisión, qué grupo de pacientes serán las más beneficiadas por una transferencia diferida de embriones.

Transferencia diferida de embriones.

Se conoce como transferencia diferida de embriones (TDE) a la cancelación de la transferencia en el mismo ciclo de la hiperestimulación ovárica controlada (HOC), congelando los embriones durante la etapa de clivaje embrionario (día +2 ó +3) o estadio de blastocisto (día +5 ó +6), para realizar la transferencia de éstos en un ciclo posterior previa preparación del endometrio.

Según la evidencia científica existente, deberíamos diferir las transferencias embrionarias en las siguientes situaciones:

- I. Endometrio desfavorable/ inadecuado para la implantación embrionaria.

Endometrio fino: inferiores a 7 mm. de grosor. Se asocian con menores tasas de embarazo, en parte porque los embriones están más próximos a las arterias espirales donde la tensión superficial de oxígeno es más alta, favoreciendo los procesos de oxidación. Otra posible explicación es el efecto deletéreo de la transferencia embrionaria, siendo ésta más traumática cuando el endometrio es más fino. Debe investigarse en estos casos la posible asociación con sinequias uterinas o Síndrome de Asherman.

Patrón de ecogenicidad endometrial anómalo: Se considera que puede ser debido a una elevación sérica de los niveles de progesterona secundarios a la HOC que provocan un patrón secretor de forma prematura, asincronía endometrio-embrión y por tanto fallos de implantación. Se considera que niveles de progesterona superiores a 0,9-1,5 ng/mL pueden ser indicativos de luteinización prematura. Algunos autores encuentran que con niveles de progesterona superiores a 1 ng/ml los resultados son mejores, en tasa de implantación y gestación evolutiva, en transferencia de blastocitos en un ciclo diferido. También se ha descrito que niveles de Estradiol > 2500 pg/ml pueden alterar el desarrollo endometrial y la implantación.

Patología uterina o endocavitaria: presencia de pólipos, miomas, hidrosálpinx, etc.

- II. Ciclos con hiperrespuesta en la HOC con niveles altos de estradiol, donantes de ovocitos o en ciclos de HOC para preservación de la fertilidad ya que son pacientes con riesgo aumentado de SHO.

Deberíamos diferir las transferencias embrionarias en pacientes con endometriosis finas (inferiores a 7 mm), con patrones ecográficos anómalos, con niveles de progesterona superiores a 0,9-1,5 ng/mL o con la existencia de patología uterina o endocavitaria y en pacientes con riesgo aumentado de SHO.

Seguridad de la técnica y resultados perinatales.

El primer niño vivo después de una transferencia de embriones congelados fue reportado en el año 1984. En las últimas décadas la proporción de ciclos realizados con embriones congelados ha aumentado hasta alcanzar una proporción de tasa de gestación similar o mayor a la tasa de gestación de embriones transferidos en fresco. A pesar de ser conocido que los resultados perinatales son peores cuando comparamos los niños procedentes de ciclos de FIV/ICSI respecto a los niños de concepciones espontáneas, varios estudios observacionales recientes muestran que los resultados perinatales en niños procedentes de embriones congelados son, al menos, similares a los de niños procedentes de embriones transferidos en fresco.

Un estudio reciente muestra una reducción de la incidencia de bajo peso al nacer y parto pre término en niños procedentes de embriones congelados.

En una revisión sistemática que valoró diferentes resultados perinatales de un total de 11 estudios observacionales encontró, al comparar los resultados perinatales de niños procedentes de embriones congelados respecto a niños de embriones transferidos en fresco, que los niños procedentes de embriones congelados presentaban menor riesgo de mortalidad perinatal, de ser pequeños para la edad gestacional, parto pretérmino, bajo peso al nacer y hemorragia anteparto, pero presentaban más riesgo de nacer por cesárea.

Una de las hipótesis que explicaría estos resultados serían los menores niveles de estrógenos circulantes en las transferencias de embriones congelados. Estos estrógenos podrían actuar a nivel del endometrio produciendo una alteración en la angiogénesis y de la implantación de los embriones en pacientes sometidas a transferencias en fresco.

No existe evidencia suficiente en la literatura para valorar comparativamente los resultados de transferencias en fresco y diferidas en términos de incidencia de embarazo ectópico, síndromes hipertensivos del embarazo, necesidad de ingreso a UCI neonatal y anomalías congénitas.

Las últimas revisiones demuestran que los niños procedentes de embriones congelados presentan menor riesgo de mortalidad perinatal, de ser pequeños para la edad gestacional, parto pretérmino, bajo peso al nacer y hemorragia anteparto, pero presentan más riesgo de nacer por cesárea.

No existe evidencia suficiente para valorar la incidencia de embarazo ectópico, síndromes hipertensivos del embarazo, ingreso en UCI neonatal y anomalías congénitas.

Transferencia embrionaria: Protocolos de preparación endometrial.

La transferencia de un embrión congelado requiere una sincronización perfecta entre el desarrollo del embrión y el momento óptimo de receptividad del endometrio; este período se conoce como período ventana endometrial. Para producir un endometrio receptivo es necesario una primera fase con actividad estrogénica que conducirá a la proliferación endometrial, seguido de un período con presencia y acción de progesterona para alcanzar la transformación secretora del endometrio. Esto se puede alcanzar tanto en un ciclo natural, en el que se aprovecha la producción endógena ovárica de estas hormonas, como en un ciclo medicado.

La evidencia científica disponible en la actualidad no parece mostrar diferencias significativas en tasa de embarazo y recién nacido vivo entre el ciclo natural y medicado, por lo que la elección de tratamiento debe basarse las características de cada paciente, sus patologías concomitantes y preferencias personales de las pacientes.

a. Ciclo medicado

Utiliza hormonas exógenas, estrógenos y progesterona, de forma secuencial para conseguir un endometrio receptivo. Los distintos tratamientos dependen de tipo y dosis de estrógenos y progesterona utilizados, la duración y la vía de administración.

- Vía Oral: Valerianato de estradiol (VE) (2-6 mg/día), 17β-estradiol micronizado y estrógenos conjugados por vía oral (3.75 mg/día). Se han comunicado buenas tasas de embarazo con pauta secuencial (2 mg/día del día 1 al 5-8 del ciclo, luego 4 mg/día del día 6-9 al 11 y finalmente 6 mg/día a partir del día 12). También existe la opción de una pauta fija, con un régimen de 4-6 mg /día.

- Vía transdérmica: Estradiol hemihidratotransdérmico (4,8 mg/día). No presenta metabolismo de primer paso hepático evitando la conjugación del estradiol a formas no biodisponibles para el endometrio y se evita la inducción de enzimas hepáticas que pueden estimular la producción de moléculas tipo antitrombina III, SHBG, etc. Se puede administrar en días alternos (1 parche el día 2 ó 3 de ciclo, y luego dos parches cada dos días a partir del día 4-5) lo que facilita el cumplimiento del tratamiento por parte de la paciente, aunque a veces las pacientes refieren eritema relativo a la zona de los parches.
- Vía vaginal: Se ha descrito una pauta de tratamiento con estradiol micronizado. Se ha observado una buena preparación endometrial aunque no existen estudios en ciclos de transferencia de embriones. Se iniciaría con 6 mg/día de estradiol durante 14 días, seguido de estradiol asociado a progesterona. Su uso no está muy extendido en España.
- Vía subcutánea: Consiste en la aplicación de implantes de 17β -estradiol, cuyo efecto duraría durante 1 año. Si no se consigue gestación se suspende el tratamiento con progesterona, el endometrio de depriva y a los 8-10 días ya está otra vez preparado.

La mayoría de autores coinciden en que la pauta de preparación con estrógenos debe durar al menos 10 días antes de agregar la progesterona. También parece aceptado que puede prolongarse más allá de 12-14 días. Distintos autores han valorado la prolongación de la administración de estrógenos entre 3 y 15 semanas. No obstante, parece no ser recomendable prolongar más allá de 9 semanas de tratamiento por riesgo de disrupción endometrial.

El tratamiento con estrógenos después de la transferencia embrionaria se mantiene hasta el día de la β -hCG y si ésta es positiva, se mantiene hasta semana 8-12 de gestación.

El grosor endometrial y los niveles de estradiol en sangre son los parámetros que habitualmente utilizamos para valorar la correcta preparación endometrial. Realizamos el primer control ecográfico entre los días 8-12 de tratamiento con estrógenos.

No existe un valor concreto de grosor a partir del cual se observen un aumento de la tasa de gestación. De todas maneras varios autores coinciden que un valor de grosor endometrial de 7-8 mm y morfología trilaminar se considera adecuado para la transferencia.

Una vez conseguidos el grosor y aspecto endometrial deseados, se agrega progesterona a la preparación endometrial. Al igual que con los estrógenos, existen distintas formas de administración de la progesterona, todos los cuales alcanzan niveles plasmáticos similares:

- Progesterona micronizada vía vaginal (preferentemente) u oral a dosis de 600-800 mg/día, en 3 a 4 tomas diarias.

- Progesterona oleosa intramuscular 50-100 mg/día (no disponible en España).
- Progesterona gel vaginal 90 mg/día, en monodosis.
- Progesterona subcutánea 25 mg/día, en monodosis.

Se realiza la transferencia de los embriones cuando la paciente ha recibido tantos días de progesterona como días de evolución tiene el embrión congelado.

b. Ciclo natural.

En esta modalidad aprovechamos las hormonas producidas por el folículo ovulatorio de la paciente para lograr un grosor endometrial apropiado, por lo que es indispensable que las pacientes tengan una función ovárica conservada y dentro de la normalidad. Se realiza un control del desarrollo folicular con ecografía vaginal y estradiol sérico (opcional), hasta que el folículo alcanza 18-20 mm de diámetro. En ese momento se administra hCG recombinante (250 µg por vía subcutánea) y al día subsiguiente se comienza la administración de progesterona. Al igual que en el ciclo medicado, la transferencia de los embriones se realiza cuando la paciente ha recibido tantos días de progesterona como días de evolución tiene el embrión congelado.

La evidencia científica disponible en la actualidad no parece mostrar diferencias significativas en tasa de embarazo y recién nacido vivo entre el ciclo natural y medicado.

En los ciclos medicados, la mayoría de autores coinciden en que la pauta de preparación con estrógenos debe durar al menos 10 días antes de agregar la progesterona. También parece aceptado que puede prolongarse más allá de 12-14 días aunque no debería ser superior a 9 semanas.

Varios autores coinciden que un valor de grosor endometrial de 7-8 mm y morfología trilaminar se considera adecuado para la transferencia.

Se realiza la transferencia de los embriones cuando la paciente ha recibido tantos días de progesterona como días de evolución tiene el embrión congelado.

En el ciclo natural aprovechamos las hormonas producidas por el folículo ovulatorio de la paciente para lograr un grosor endometrial apropiado, por lo que es indispensable que las pacientes tengan una función ovárica conservada y dentro de la normalidad.

Estrategias en respuesta endometrial inadecuada.

Ante la dificultad a la hora de conseguir un endometrio de aspecto y grosor adecuado para la transferencia embrionaria, se han intentado diversas estrategias coadyuvantes al tratamiento tradicional.

Una alternativa es aumentar la dosis de estrógenos, administrando conjuntamente estrógenos por distintas vías. Esta estrategia ha demostrado aumentar el grosor endometrial pero sin diferencias significativas en la tasa de implantación.

Se puede utilizar supresión hipofisaria con agonistas de la GnRH para impedir la ovulación prematura, permitir la neutralización de la función ovárica y evitar la interferencia en los ciclos medicados de transferencia. El-Toukhy reportó un aumento de la tasa de gestación, aunque otros estudios no encontraron diferencias significativas.

Otra opción es la administración de β -hCG durante la fase secretora y también en la fase folicular como terapia coadyuvante. Existen estudios que mostraron aumento en el grosor endometrial y tasa de embarazo, pero una revisión Cochrane de 2010 no confirmó estos resultados.

El tratamiento con inhibidores de la fosfodiesterasa-5, de forma coadyuvante, parece aumentar la perfusión uterina y, con eso, el grosor endometrial. Dehghani Firouzabadi, en un estudio con pocos pacientes, no encontró diferencias significativas en tasas de implantación.

La lesión endometrial (scratching) en el ciclo previo a la transferencia permitiría un aumento del reclutamiento de macrófagos y citoquinas pro-inflamatorias que podrían facilitar el desarrollo de un endometrio receptivo, sobretodo en pacientes con fallos de implantación.

También se puede utilizar la inducción a la ovulación con distintos fármacos (citrato de clomifeno, gonadotrofinas exógenas, letrozol). Ninguno de ellos parece ser mejor al compararlos con un ciclo natural, pero Wright reportó un aumento del grosor endometrial en las pacientes en que se utilizó gonadotrofinas exógenas, con similares tasas de implantación y embarazo.

Ante la dificultad a la hora de conseguir un endometrio de aspecto y grosor adecuado para la transferencia embrionaria, se han intentado diversas estrategias coadyuvantes al tratamiento tradicional como: aumentar la dosis de estrógenos, usar agonistas de la GnRH, administrar β -hCG, inhibidores de la fosfodiesterasa-5, letrozol, gonadotrofinas exógenas, citrato de clomifeno, realizar scratch endometrial... la mayoría consiguiendo similares tasas de implantación y embarazo.

CONCLUSIONES

La realización de transferencia diferida parece asociarse a mejores tasas de embarazo y RNV, junto con algunos mejores resultados obstétricos y perinatales y una menor incidencia de la principal complicación de la HOC: el síndrome de hiperestimulación ovárica. Estas afirmaciones son particularmente ciertas en el caso de pacientes que presentan una hiperrespuesta a la HOC o bien un endometrio desfavorable al momento de programar la recuperación ovocitaria, pero no existe evidencia suficiente para poder aplicar estos resultados a toda la población. Por otro lado, parece evidente que diferir la transferencia conlleva un aumento en el coste de los procedimientos relacionados en comparación con la transferencia en fresco, a pesar de que no hay estudios que hayan valorado este impacto a nivel económico, dado que esto dependerá de la forma en la que cada centro valora económicamente sus servicios.

Es por esto que en el momento de plantear la segmentación de los ciclos de FIV y la realización de transferencia en diferido se deben tener en cuenta factores que afectan los resultados de esta decisión, a saber: la probabilidad de éxito a priori para cada paciente/pareja (edad, causa de esterilidad, historial médico, etc.), la calidad embrionaria, el rendimiento del proceso de criopreservación embrionaria en nuestro laboratorio de FIV y la posibilidad de conseguir una preparación endometrial y soporte de fase lútea efectivos. Todo esto lleva a la necesidad de individualizar las estrategias terapéuticas, buscando maximizar las probabilidades de éxito para cada caso en particular.

Las Guías de Práctica Clínica de la SEF y de la SEGO pretenden contribuir al buen quehacer profesional de todos los ginecólogos, especialmente de los más alejados de los grandes hospitales y clínicas universitarias. Presentan métodos y técnicas de atención clínica aceptadas, contrastadas y utilizadas por especialistas en cada tema. Estas guías no deben interpretarse de forma rígida ni excluyente, sino que deben servir para la atención individualizada a las pacientes. No agotan todas las posibilidades, ni pretenden sustituir a los protocolos ya existentes en los Departamentos y Servicios Hospitalarios.

BIBLIOGRAFIA

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.

Zhu D, Zhang J, Cao S, Zhang J, Heng BC, Huang M, Ling X, Duan T, Tong GQ. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and

implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles--time for a new embryo transfer strategy? *Fertil Steril* 2011; 95:1691-5.

Haouzi D1, 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; 24:1436-45.

De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2010; 25:1851–62.

Roque M, Lattes K, Serra S, Sola 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.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Embryo cryopreservation rescues cycles with premature luteinization. *Fertil Steril* 2010; 93:537-64.

Zhu D, Zhang J, Cao S, Zhang J, Heng BC, Huang M, et al. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles—time for a new embryo transfer strategy? *Fertil Steril* 2011; 95:1691–5.

Wada I, Macnamee MC, Wick K, Bradfield JM, Brinsden PR. Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 1994; 9:543–6.

Wikland M, Hardarson T, Hillensjo T, Westin C, Westlander G, Wood M, et al. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010; 25:1699–707.

Aflatoonian A, MansooriMoghaddam F, Mashayekhy M, Mohamadian F. Comparison of early pregnancy and neonatal outcomes after frozen and fresh embryo transfer in ART cycles. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27:695–700.

Helmerhorst FM, Perquin DAM, Donker D, Keirse MJNC. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ* 2004; 328:261.

Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simon C, Remohi J, Jenkins J and Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod* 2010; 25: 2092-2100.

Humaidan P, Kol S, Papaliniolaou EG, GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice?. *Hum Reprod Update* 2011;17:510–524.

Labarta E, Martinez- Conejero JA, Alama P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C, Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod* 2011;26:1813-1825.

Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Humaidan P, Kol S, Banker M, Devroey P, García-Velasco JA. Severe ovarian hyperstimulation syndrome after gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist trigger and "freeze-all" approach in GnRH antagonist protocol. *Fertil Steril* 2014;101:1008-11.

Gurbuz AS, Gode F, Ozcimen N, Isik AZ. Gonadotrophin-releasing hormone agonist trigger and freeze-all strategy does not prevent severe ovarian hyperstimulation syndrome: a report of three cases. *Reprod Biomed Online* 2014; 29:541-4.

Fatemi HM, Garcia-Velasco J. Avoiding ovarian hyperstimulation syndrome with the use of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger. *Fertil Steril* 2015; 103:870-3.

Maheswari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattcharya 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.

El-Toukhy T, Taylor A, Khalaf Y, et al. Pituitary suppression in ultrasound-monitored frozen embryo replacement cycles. A randomised study. *Hum Reprod* 2004; 19:874–879.

DehghaniFirouzabadi R, Davar R, Hojjat F, Mahdavi M. Effect of sildenafil citrate on endometrial preparation and outcome of frozen-thawed embryo transfer cycles: a randomized clinical trial. *Iran J Reprod Med* 2013; 11:151–158.

Nakagawa K, Ojiro Y, Jyuen H, et al. Prostaglandin therapy during the proliferative phase improves pregnancy rates following frozen embryo transfer in a hormone replacement cycle. *J Obstet Gynaecol Res* 2014; 40:1331–1337.