

Embriología

Vitrificación de preembriones. Experiencia de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario La Fe

Embryo vitrification. The experience of the Human Assisted Reproduction Unit of La Fe University Hospital

Molina I, Monzó A, Martínez JV, Duque C, Romeu M, Romeu A.

Servicio de Ginecología (Reproducción Humana). Hospital Universitario La Fe. Valencia

Resumen

Objetivos: *Analizar los resultados preliminares de un programa de vitrificación de ovocitos en el Servicio de Reproducción Humana Asistida de un Hospital Universitario de referencia, en el ámbito del Sistema Nacional de Salud.*

Material y Métodos: *Fueron vitrificados 112 embriones de 36 parejas que realizaron tratamientos de fecundación in vitro (FIV clásica o ICSI). De ellos, fueron desvitrificados 86 embriones en 42 intentos de criotransferencia. Fueron transferidos 61 embriones en 36 ciclos. Para la transferencia se utilizó ciclos sustituidos de preparación endometrial con estradiol transdérmico y progesterona natural por vía vaginal.*

Resultados: *Tasa de supervivencia de 70,9%. Ciclos sin transferencia: 16,6%. Tras la desvitrificación, el 93,4% de los embriones transferidos conservaron intactas todas las blastómeras. La tasa de gestación fue de 21,9% por ciclo iniciado y de 25% por transferencia. La tasa de implantación por embrión transferido fue de 16,4%.*

Conclusión: *La vitrificación de los embriones no transferidos en el ciclo original se muestra como una opción efectiva en un programa de reproducción asistida y puede ser útil para la prevención de la gestación múltiple tras FIV.*

Palabras clave: FIV. ICSI. Criopreservación. Vitrificación de embriones. Transferencia. Resultados. Tasa de gestación. Tasa de implantación.

Summary

Objectives: *To analyze the preliminary results observed in a oocyte vitrification program at the Assisted Human Reproduction Unit of a reference university hospital from the National Health System.*

Correspondencia: Dr. Alberto Romeu
Jefe de Servicio de Ginecología (Reproducción Humana)
Hospital Universitario La Fe. Hospital Maternal
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia
e-mail: aromeu2000@hotmail.com

Material and methods: A total of 112 embryos from 36 infertile couples treated by in vitro fertilization (classic IVF or ICSI) were vitrified. Eighty six of them were warmed in 42 attempts of transfer and 61 embryos were finally transferred in 36 cycles. In order to carry out the transfer substituted cycles the endometrium was prepared with transdermal estradiol and vaginal natural progesterone.

Results: The survival embryo rate after warming was 70.9%. After warming 93.4% of embryos conserved intact all the blastomeres. Nevertheless, in 16.6% of cycles the transfer was not possible because the embryos did not survive. Pregnancy rates were 21.9% by initiated cycle and 25% by transfer. Implantation rate by transferred embryo was 16.4%.

Conclusion: Embryo vitrification seems to be a very effective option in a program of assisted reproduction when embryos of good quality are not transferred in the fresh cycle and could help to prevent multiple pregnancies after IVF.

Key words: IVF. ICSI. Cryopreservation. Embryo vitrification. Transfer. Results. Pregnancy rate. Implantation rate.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones, sea en estadio de células o en estadio de blastocisto, es un complemento necesario en los programas de reproducción asistida, con el fin de conservar los preembriones no transferidos en el ciclo original. El objetivo primordial de cualquier procedimiento de crioconservación es obtener elevadas tasas de supervivencia de las células tras la descongelación. Los dos parámetros más importantes para determinar el éxito en un protocolo de criopreservación son: la forma en que las células recuperan su equilibrio en respuesta al enfriamiento y la velocidad de congelación.

Los protocolos de congelación lenta dan lugar a la formación de cristales de hielo durante la congelación y descongelación. La vitrificación supone una congelación muy rápida combinada con elevadas concentraciones de crioprotectores, de manera que se reduce de forma muy significativa la formación de cristales en el citoplasma de las células. Aunque la supervivencia tras descongelación depende de las especies, el estadio de desarrollo y la calidad de los embriones, está bastante aceptado que la vitrificación ha aumentado significativamente el éxito de la congelación y parece ser un método mejor que la congelación lenta en el campo de la criopreservación (1).

La vitrificación es relativamente simple y no requiere los costosos equipos de congeladores programables. Además, permite almacenar los embriones en un volumen muy pequeño de medio de vitrificación (2). Estas características, unidas a sus buenos resultados, han motivado que investigadores se pregunten si los congeladores programables son todavía necesarios en los centros de reproducción asistida (3).

En los últimos años se han publicado tasas de supervivencia tras desvitrificación superiores al 80% y tasas de embarazo cercanas al 30% después de transferir embriones vitrificados en estadio de cigoto, células, mórulas o blastocistos (4). También han sido publicadas tasas de nacimientos de niños sanos en numerosas ocasiones (5).

El presente estudio muestra los resultados obtenidos tras la desvitrificación y transferencia de los preembriones vitrificados en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario La Fe.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio recoge la experiencia adquirida después de la vitrificación de 112 embriones y la desvitrificación de 86 de ellos, procedentes de 36 parejas tratadas mediante FIV o ICSI (o ambos procedimientos). Estas vitrificaciones se llevaron a cabo entre octubre de 2007 y junio de 2008. Han sido realizados 42 intentos de transferencia. Veintiocho parejas realizaron un solo ciclo de criotransferencia y cuatro pacientes realizaron 2 ciclos de criotransferencia cada una.

En seis casos, la transferencia no pudo ser practicada por lisis de los 14 embriones desvitrificados; otros 11 embriones se lisaron tras desvitrificación pero la transferencia tuvo lugar con los restantes. Así pues, los datos presentados en cuanto a implantación y gestación corresponden a 36 ciclos de criotransferencia con 61 embriones transferidos en total (Tabla 1).

En 33 de los casos en que fueron vitrificados preembriones se trató de mujeres que no habían gestado después de la transferencia de preembriones en fresco y en los 3 restantes de mujeres que habían gestado y

Tabla 1
Resumen de los ciclos realizados

Ciclos con Vitri ficación	Desvitrificaciones	Transferencias de desvitrificados	Ciclos de desvitrificación sin transferencia
36	42	36	6

abortado después de la misma. No fueron considerados en este estudio los embriones vitri ficados procedentes de ciclos de diagnóstico genético preimplantacional.

Fueron estudiadas las características de la cohorte de ovocitos y preembriones obtenidos en el ciclo en el que se realizó la vitri ficación. Fueron vitri ficados 106 preembriones de buena calidad en día 2 ó 3 post FIV o ICSI: 4 u 8 células con blastómeras de forma y tamaño uniforme y con una fragmentación inferior al 20%. Los 6 embriones restantes presentaban una fragmentación de 20 a 25%, tres tenían 4 células en día 2, y tres fueron vitri ficados en día 3 cuando contaban con 8 células. En estos 6 casos, además se vitri ficó otros embriones con una fragmentación inferior al 20%.

Se estudiaron las características morfológicas de los embriones antes y después de la desvitrificación y se constató también la calidad morfológica de los embriones en el momento de la transferencia.

Sólo se transfirió los embriones que mostraron al menos una división tras 18 horas de cultivo in vitro o embriones con buena calidad morfológica tras 2-4 horas de cultivo.

Procedimiento de vitri ficación

Se utilizó el protocolo descrito por Kuwayama y cols (6), comercializado por Irvine Scientific (Izasa, Irvine Scientific Vitrification Freeze Kit) con el contenedor Cryotip (90133S). Todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente y se cargó un máximo de 2 preembriones por contenedor. Los preembriones fueron incubados hasta que recuperaron su tamaño original y se realizaron cuatro pases sucesivos en gotas de 20 (1 de la solución de vitri ficación (VS); 5 segundos en VS1, 5 segundos en VS2, 10 segundos en VS3 y un máximo de 90 segundos en VS4, solución con la que se introdujo los embriones en el CryoTip. Se selló durante 0,2 y 0,5 segundos los extremos fino y ancho del CryoTip y se sumergió éste rápidamente en nitrógeno líquido.

Procedimiento de desvitrificación

La desvitrificación de los embriones se realizó si-

guiendo el protocolo antes citado (6) (Irvine Scientific Vitrification Thaw Kit - 90137S). Todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente. Se sumergió el CryoTip en un baño de agua a 37°C durante 3 segundos, se secó con una gasa estéril, se cortaron los extremos y se depositó el volumen del CryoTip (1µl) justo al lado de una gota atemperada de solución de descongelación (TS) del mismo volumen; ambas gotas se juntaron con la ayuda del Cryo Tip y se dejó los embriones en la mezcla durante 1 minuto. Los embriones fueron transferidos a una gota de 20 µl de TS, se dejaron 1 minuto y, a continuación, se realizaron dos pases por dos gotas de 20 µl de solución de dilución (DS), dejándolos 2 minutos en cada gota. A continuación, se trasladaron a tres gotas de 20 µl de solución de lavado (WS), dejándolos 3 minutos en cada gota. Finalmente, los embriones se incubaron en el medio secuencial adecuado al estadio embrionario durante 2-4 horas antes de la transferencia.

En dos casos se realizó eclosión asistida de los embriones veinte minutos después de la vitri ficación, realizando la perforación asistida total de la zona pelúcida mediante 2-3 pulsos (13 µm) con el Laser Diode Saturn®.

Preparación del endometrio

Todas las transferencias fueron llevadas a cabo durante un ciclo sustituido de preparación endometrial con 17 β estradiol transdérmico a dosis progresivamente crecientes desde 200 µg/día hasta 400 µg/día, durante un periodo mínimo de 12 días.

Una vez comprobado que el aspecto ecográfico del endometrio (espesor y textura trilaminar) era adecuado, se redujo la dosis diaria de estradiol a 200 µg/día y se asoció la administración de progesterona natural micronizada, a dosis de 600 mg/día. En caso de que la determinación de βhCG fuera superior a 20 UI/L, se citó a la paciente para confirmar la gestación mediante la visualización de al menos un saco embrionario con latido cardiaco, momento en el que se estableció el diagnóstico de gestación y se mantuvo el tratamiento hasta la semana 10 de gestación.

RESULTADOS

Las principales características de las pacientes y de los ciclos de estimulación ovárica que dieron lugar a los embriones vitrificados se muestran en la tabla 2.

Se realizó FIV o ICSI en función de los parámetros seminales según los protocolos habituales del centro. En 17 parejas se realizó ICSI, en tres casos se realizó FIV convencional y en las 16 restantes se realizó una técnica mixta, microinyectando al menos 4 ovocitos metafase II e inseminando el resto de ovocitos.

Tabla 2

Características de las pacientes y de los ciclos de estimulación ovárica que dieron lugar a embriones vitrificados

Variable	Media±DT	Rango
Edad mujer (años)	32,5±5	21-39
IMC	24,4±4,9	17,6-34,9
Días estimulación	8,8±1,6	7-14
Total FSH (UI)	2220±926	1050-4050
Estradiol día hCG (pg/mL)	2049±691	990-3303
Nº folículos ≥ 16 mm	8,9±3,9	4-20
Grosor endometrial día hCG (mm)	11,3±1,9	7-15
Nº ovocitos recuperados	14,4±5,6	6-26
Nº ovocitos metafase II	9,8±3,7	6-20
Nº total de embriones	8,4±3,3	3-24
Nº embriones transferidos frescos	1,79±0,41	1-2

La tasa de fecundación en FIV fue de 85,9% y en ICSI de 77,9%. De los 89 embriones obtenidos mediante FIV hubo 5 embriones procedentes de 4 casos con fecundación anómala y de los 162 obtenidos tras ICSI hubo dos embriones en dos casos con fecundación anómala.

En todos los casos fueron transferidos en fresco los dos mejores embriones de la cohorte, excepto en un caso en que se transfirió un solo embrión a petición de la paciente. Tres pacientes gestaron pero abortaron en el primer trimestre.

Todos los embriones no transferidos que presentaban al menos 4 células en día 2 ó 6 células en día 3 y que presentaban menos de un 20% de fragmentación citoplasmática fueron vitrificados. En total, fueron vitrificados 112 pre-embriones.

Todos los embriones fueron vitrificados al segundo día de la FIV o ICSI, excepto cinco casos que fueron vitrificados al tercer día.

La transferencia de los embriones desvitrificados se realizó al menos 2 meses después de la estimulación ovárica.

Las pacientes fueron tratadas con estradiol transdérmico una media de 13,3±2,9 días. El grosor endometrial el día que se inició la administración de progesterona vaginal fue de 10,3±2,7 mm y los niveles de estradiol el día de la transferencia de los embriones fueron de 224±107 pg/mL.

Las características de los embriones vitrificados y desvitrificados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Número de embriones vitrificados, desvitrificados y transferidos por ciclo

Variable	Media±DT	Rango
Nº embriones vitrificados/ciclo	3,3±1,7	1-8
Nº embriones desvitrificados/ciclo	2,6±1,2	1-6
Nº embriones desvitrificados transferidos/ciclo	1,9±0,8	1-3

Fueron desvitrificados un total de 86 embriones, de los cuales 25 procedentes de 12 ciclos degeneraron tras la desvitrificación. En seis de estos 12 ciclos todos los embriones vitrificados degeneraron, por lo que no se realizó la transferencia de ningún embrión. En total, fueron transferidos 61 embriones desvitrificados en 36 pacientes. La tasa global de supervivencia fue, por tanto, de 70,9%.

El número de células en que fueron vitrificados los 61 embriones transferidos y el grado de fragmentación de los mismos antes de la vitrificación, tras el proceso de desvitrificación y en el momento de la transferencia se muestran en las figuras 1,2 y 3 respectivamente. El test de Chi² mostró diferencias significativas entre el número de células en que fueron vitrificados y las que presentaban en el momento de la transferencia (Chi² 0,006) y entre el número de células tras desvitrificación y en el momento de la transferencia (Chi² 0,000). El número de células en que fueron vitrificados los embriones y el número de células tras desvitrificación no mostró diferencias significativas (Chi² 0,088).

El grado de fragmentación (%) de los embriones antes de la vitrificación fue significativamente menor que

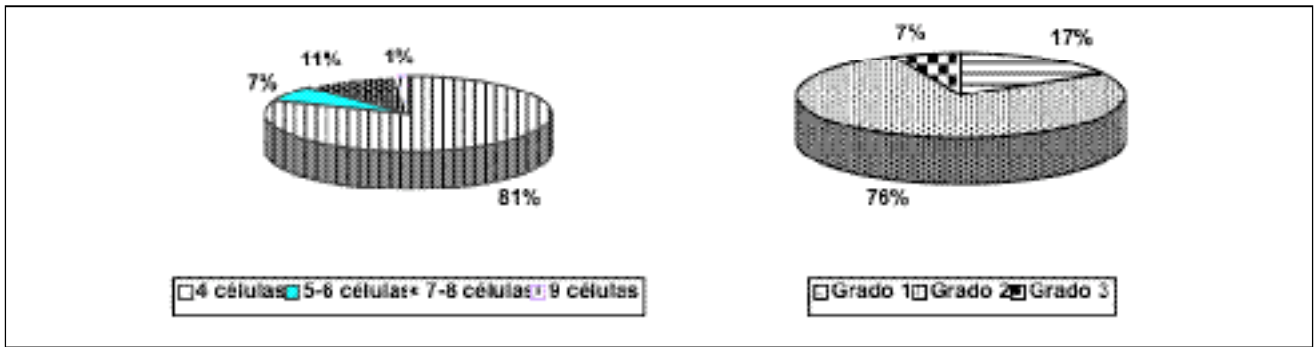


Figura 1

Número de células y grado de fragmentación de los embriones antes de la vitrificación

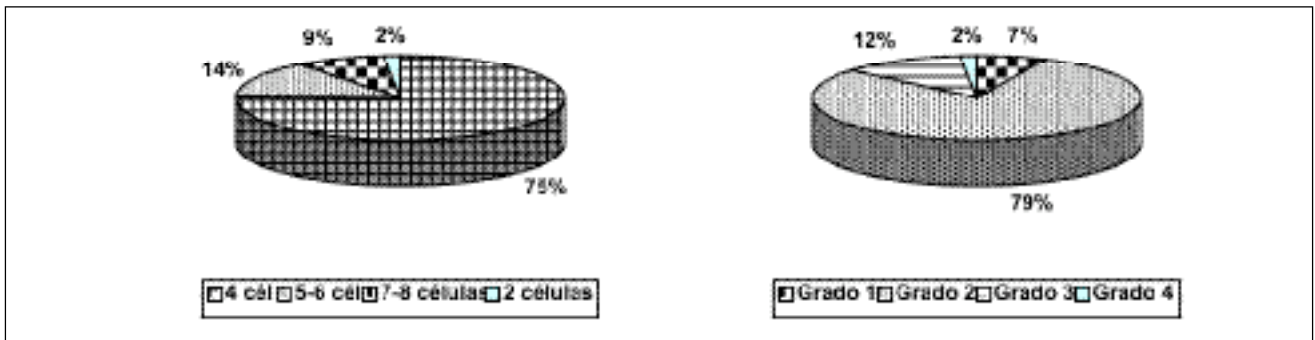


Figura 2

Número de células y grado de fragmentación de los embriones después de la vitrificación

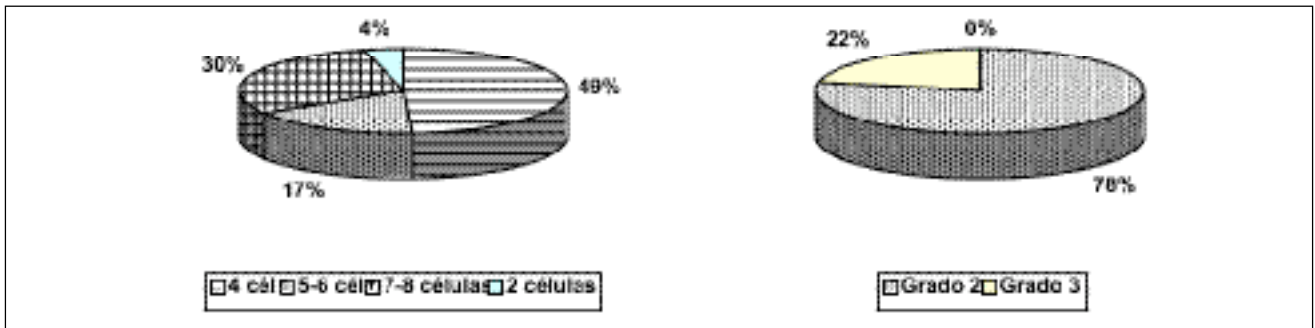


Figura 3

Número de células y grado de fragmentación de los embriones en el momento de la transferencia

tras la desvitrificación (Chi^2 0,038). Sin embargo, en los embriones transferidos, la fragmentación no mostró diferencias significativas antes de la desvitrificación y en el momento de la transferencia (Chi^2 0,826).

De los embriones transferidos, 57 (93,4%) conservaron intactas todas las células tras la desvitrificación. De ellos, 38 no siguieron dividiéndose en las horas que permanecieron en cultivo y los 19 embriones res-

tantes, que conservaron intactas todas las blastómeras tras la desvitrificación, siguieron dividiéndose y en el momento de la transferencia presentaron entre 1 y 4 células más. Cuatro embriones de 8 células lisaron dos de sus blastómeras tras la desvitrificación y no siguieron dividiéndose en el tiempo de cultivo.

Cuando fue evaluado el grado de fragmentación tras la desvitrificación, en todos los casos fue similar

a la situación previa, excepto en 6 casos, que pasaron de grado 1 a grado 2 (3 casos) de grado 2 a grado 3 (2 casos) y de grado 1 a grado 4 (1 caso). Cuando se evaluó el grado de fragmentación en el momento previo a la transferencia, ésta no se modificó respecto a la que presentaron tras la desvitrificación excepto en 9 casos en que los embriones pasaron de grado 1 a grado 2 (2 casos) o de grado 2 a grado 3 (7 casos). Figuras 1 a 3.

Todas las transferencias excepto una fueron consideradas fáciles o muy fáciles según el score de transferencia empleado en el centro (7).

Nueve pacientes gestaron, lo que supone una tasa de gestación por ciclo iniciado de 21,9% y de 25% por transferencia. Todas las gestaciones fueron de feto único excepto una que fue gemelar, lo cual supone una tasa de implantación de 16,4%. En todos los casos en que se produjo una gestación, los embriones conservaron todas sus blastómeras intactas tras la desvitrificación y no se modificó el grado de fragmentación. Además, en 4 casos, los dos embriones transferidos reanudaron la división en el tiempo en que permanecieron en cultivo hasta su transferencia. En dos ciclos se realizó eclosión asistida de los preembriones antes de la transferencia, de los cuales, en un caso se produjo una gestación.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en estos ciclos evidencian buenas tasas de supervivencia (70,9%), con muy aceptables tasas de gestación y de implantación de los embriones tras vitrificación. Estos resultados son similares a los comunicados por Desai y cols, autores que llevaron a cabo la vitrificación en día 3 (estadio de 6-8 células) en cryoloops. Tras la desvitrificación cultivaron hasta día 5. Obtuvieron excelentes tasas de supervivencia, gestación e implantación: 85, 44 y 20%, respectivamente (8).

Loutradi y cols revisaron los resultados de 8.824 congelaciones de preembriones (7.482 vitrificaciones y 1.342 congelaciones convencionales). La tasa de supervivencia tras la descongelación fue más alta tanto para preembriones en células como para blastocistos que habían sido vitrificados, lo que les llevó a concluir que la vitrificación se asocia a mayor tasa de supervivencia y que se debería evaluar (cosa que no hicieron) en términos de gestación a término (9).

Este aspecto ha sido evaluado recientemente por Rama Raju y cols (10), quienes observaron una tasa de gestación y de implantación de 36,8% y de 18,1% respectivamente, con una tasa de aborto de 7,7% y de

recién nacidos vivos de 24,2%. Compararon el índice de Apgar y la tasa de defectos congénitos de los 91 nacidos tras transferencias de embriones vitrificados con un grupo de pacientes a las que se realizó transferencia de embriones frescos, no observando diferencias significativas entre los dos grupos. La tasa de malformaciones fue de 1,18 en los recién nacidos de embriones desvitrificados. En los dos grupos la transferencia se realizó en día 3.

Al Hasani y cols, después de la transferencia de 302 cigotos (2.2 transferidos/TRF): obtuvieron tasas de gestación significativamente más altas con la transferencia de cigotos vitrificados que con la transferencia de congelación lenta (4).

Estos resultados han sido corroborados recientemente en un estudio randomizado que comparaba la congelación lenta con la vitrificación de embriones en día 3. Para los autores, la vitrificación se asoció a tasas más elevadas de supervivencia y de formación de blastocistos que la congelación lenta (11).

Estos mismos resultados han sido observados en una revisión sistemática y metaanálisis que ha incluido cuatro estudios que comparan la supervivencia tras descongelación de embriones en estadio de células y de blastocistos (9).

En un estudio prospectivo y randomizado, Ge y cols evidenciaron que reducir el espesor de la ZP mediante Laser antes de la transferencia incrementa significativamente las tasas de gestación (25 vs 14 %) e implantación (16,7 vs 7,3%) en los ciclos de transferencia de preembriones descongelados y no lo hace en las transferencias de preembriones frescos (12). Sin embargo, los resultados previamente obtenidos por Petersen y cols fueron discordantes (13).

Ghobara y col revisaron la literatura y concluyeron que no existen datos concluyentes que permitan decantarse por el ciclo natural, el ciclo sustituido o el ciclo estimulado para la transferencia de embriones congelados y descongelados (14). Conclusiones similares habían sido obtenidas por Wright y cols (15), aunque estos autores señalaron que la incidencia de endometrio de bajo espesor es mayor en el ciclo estimulado.

Otros aspectos han sido analizados en torno a la transferencia de preembriones descongelados. Así, Isachenko y cols comprobaron que una elevada tasa de integridad de los pronucleos es predictiva del desarrollo embrionario ulterior y de la implantación después de la criopreservación de cigotos en estadio pronuclear (16). Lee y cols no encontraron diferencias en los resultados de transferencia de descongelados al comparar ciclos previos tratados con agonista con tratados con antagonista (17). Liu y cols comprobaron

que los resultados (tasa de implantación y gestación mejoran cuando la transferencia de embriones descongelados parcialmente dañados se hace después de extraer de los mismos las blastómeras necróticas (18). Jun y cols valoraron la prevalencia de gestaciones ectópicas tras la transferencia de preembriones descongelados, comprobando que no se incrementa respecto a la transferencia de preembriones frescos (19).

La casuística analizada es demasiado escasa para analizar aspectos puntuales tales como resultados en función de que se practique FIV clásica o ICSI, se utilice o no la eclosión asistida o hayan sido administrados agonistas o antagonistas, por ejemplo.

No obstante, de esta experiencia se puede concluir que la vitrificación de embriones no transferidos en fresco es una técnica que se muestra eficaz en términos de tasa de gestación y que, en consecuencia, puede contribuir a mejorar los resultados globales (parejas que han conseguido la gestación pretendida) y, además, facilitando la transferencia selectiva, contribuir a disminuir la tasa de gestaciones múltiples.

BIBLIOGRAFÍA

- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker M.:** Recent development in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*. 2003; 7: 623-33.
- Kattera S, Chen C.:** Cryopreservation of embryos by vitrification: current development. *Int Surg*. 2006; 91 (Suppl 5): S55-62.
- Vajta G, Nagy Z.:** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12: 779-96.
- Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A.:** Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online*. 2007; 14: 288-93.
- Vanderzwalmen P, Zech N, Greindl A, Ectors F, Lejeune B.:** Cryopreservation of human embryos by vitrification. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006; 34: 760-9.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O.:** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11: 608-14.
- Herrero G, Peinado I, de la Orden M, Pérez-Bermejo G, Monzó A, Romeu A.:** Evaluación mediante un baremo de las dificultades y complicaciones de la transferencia embrionaria. *Rev Iberoam Fert*. 2005; 22: 163-70.
- Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J.:** Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14: 208-13.
- Loutradi K, Kolibianakis E, Venetis C, Papanikolaou E, 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: 186-93.
- Rama Raju G, Jaya Prakash G, Murali Krishna K, Madan K.:** Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril*. 2008(PMID-18692781).
- Balaban B, Urmann B, Ata B, Isiklar A, Larman M, Hamilton R, et al.:** A randomized controlled of human day 3 embryo cryoconservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod*. 2008; 23: 1976-82.
- Ge HS ZW, Zhang W, Lin JJ.:** Impact of assisted hatching on fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16: 589-96.
- Petersen C, Mauri A, Baruffi R, Oliveira J, Felipe V, Massaro F, et al.:** Laser-assisted hatching of cryopreserved-thawed embryos by thinning one quarter of the zona. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13: 668-75.
- Ghobara T, Vandekerckhove P.:** Cycle regimens for frozen-thawed embryo transfer. *Cochrane Database Syst Rev* 2008 Jan 23; (1): CD003414. 2008; 23:(1): CD003414.
- Wright K, Guibert J, Weitzen S, Davy C, Fauque P, Olivennes F.:** Artificial versus stimulated cycles for endometrial preparation prior to frozen-thawed embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13: 321-5.
- Isachenko V, Todorov P, Dimitrov Y, Isachenko E.:** Integrity rate of pronuclei after cryopreservation of pronuclear-zygotes as a criteria for subsequent embryo development and pregnancy. The low integrity rate of pronuclei after cryopreservation had low developmental potential. *Hum Reprod*. 2008; 23: 819-26.
- Lee J, Choi Y, Jee B, Ku S, Suh C, Kim K, et al.:** Cryopreserved blastocyst transfer: impact of gonadotropin-releasing hormone agonist versus antagonist in the previous oocyte retrieval cycles. *Fertil Steril*. 2007; 88: 1344-9.
- Liu W, Luo M, Huang P, Wang L, Zhao C, Yue L, et al.:** Effects of removal of necrotic blastomeres from human cryopreserved embryos on pregnancy outcome. *Cryo Letters*. 2007; 28: 129-36.
- Jun S, Milki A.:** Ectopic pregnancy rates with frozen compared with fresh blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2007; 88: 629-31.