

## A síndrome do hiperestímulo ovariano não influencia os resultados clínicos após ciclos de descongelamento de embriões provenientes de ciclos de ICSI

The ovarian hyperstimulation syndrome does not influence clinical outcome post embryo thawing cycles originating from ICSI cycles.

Renata Cristina Ferreira<sup>1</sup>, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga<sup>2</sup>, Tsutomu Aoki<sup>3</sup>, Assumpto Iaconelli Jr.<sup>4</sup>, Edson Borges Jr<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Embriologista do Fertility - Centro de Fertilização Assistida. Mestre em Imunologia pela Universidade de São Paulo

<sup>2</sup>Coordenadora do Departamento de Pesquisa Científica do Fertility - Centro de Fertilização Assistida e Coordenadora da Disciplina de Laboratório em Reprodução Humana Assistida do Instituto Sapientiae - Pesquisa e Ensino em Reprodução Humana Assistida. Mestre em Reprodução Animal pela University of Queensland, Austrália

<sup>3</sup>Chefe de Clínica "step 01" - Diretor de Departamento de Ginecologia e Obstetria da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - Departamento de Obstetria e Ginecologia

<sup>4</sup>Diretor do Fertility - Centro de Fertilização Assistida. Especialista em Ginecologia e Obstetria pela Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetria

<sup>5</sup>Diretor do Fertility - Centro de Fertilização Assistida e Coordenador Geral do Instituto Sapientiae - Ensino e Pesquisa em Reprodução Assistida. Doutor em Urologia pela Universidade Estadual de São Paulo. Doutor em Ginecologia, Obstetria e Mastologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu

### RESUMO

**Objetivo:** o objetivo deste estudo foi avaliar se a criopreservação de embriões provenientes de ciclos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) de pacientes com SHO pode influenciar os resultados clínicos quando comparado às pacientes que receberam oócitos doados e, por não estarem com o endométrio preparado, tiveram seus embriões criopreservados.

**Métodos:** Cinquenta e oito casais foram submetidos a ciclos terapêuticos de ICSI sendo, 26 com manifestações clínicas de SHO (grupo SHO) e 32 casais que receberam oócitos de doadoras (grupo controle). Os embriões foram congelados no dia +2 ou dia +3 de desenvolvimento. Todas as pacientes inclusas neste estudo tiveram seus embriões criopreservados antes da transferência, e no momento do descongelamento, submetidas ao preparo endometrial. As taxas de embriões sobreviventes, implantação, gestação, e abortamento foram avaliadas nos ciclos de descongelamento embrionário.

**Resultados:** Não houve diferença entre os grupos em relação a taxa de fertilização (SHO: 71.89% ± 15.45, Controle: 79.75% ± 21.68, p= 0.234), taxa de embriões sobreviventes (SHO: 68.85 ± 21.10, Controle: 59.53 ± 36.79, p= 0.233), taxa de embriões de alta qualidade (SHO: 25.20 ± 23.90, Controle: 27.40 ± 30.30, p= 0.760), taxa de implantação (SHO: 17.9 ± 26.9, Controle: 12.5 ± 23.7, p= 0.435), taxa de gestação (SHO: 38.50, Controle: 28.60, p= 0.441) e taxa de abortamento (SHO: 40.00, Controle: 25.00, p= 0.332).

**Conclusão:** nossos dados sugerem que os resultados clínicos de ciclos de congelamento e descongelamento não são afetados pela presença de manifestações clínicas da síndrome do hiperestímulo ovariano após o estímulo ovariano controlado.

**Palavras-chave:** Síndrome de hiperestimulação ovariana, Injeções de esperma intracitoplasmáticas, Taxa de gravidez, Implantação do embrião

### ABSTRACT

**Objective:** The objective of this study was evaluate if the embryos cryopreservation from OHSS patients Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycles could be influen-

ce the clinical outcomes when compared to patients who receive oocytes from donors but the endometrium was not prepared and the embryos were cryopreserved.

**Methods:** Fifty eight couples submitted to ICSI cycles in which 26 with OHSS clinical manifestation (OHSS group) and 32 couples who have received oocytes from donors (control group). The embryos were frozen on day+2 or +3of development. All patients included in this study had embryos crypreserved before the transfer, and in the thawing cycle, only the endometrium preparation was performed. The embryo survival, implantation, pregnancy and miscarriage rates were evaluated in the embryo thawing cycle.

**Results:** There was no difference among the groups in relation to fertilization rate (OHSS: 71.89% ± 15.45, Control: 79.75% ± 21.68, p= 0.234), survival embryos rate (OHSS: 68.85 ± 21.10, Control: 59.53 ± 36.79, p= 0.233), high quality embryos rate (OHSS: 25.20 ± 23.90, Control: 27.40 ± 30.30, p= 0.760), implantation rate (OHSS: 17.9 ± 26.9, Control: 12.5 ± 23.7, p= 0.435), pregnancy rate (OHSS: 38.50, Control: 28.60, p= 0.441) and miscarriage rate (OHSS: 40.00, Control: 25.00, p= 0.332).

**Conclusion:** Our findings suggest that clinical outcomes in freeze and thawing cycles were not affected by the presence of ovarian hyperstimulation syndrome clinical manifestation after controlled ovarian stimulation.

**Key words:** Ovarian hyperstimulation syndrome; Sperm injections, intracytoplasmic; Pregnancy rate; Embryo implantation

### INTRODUÇÃO

A síndrome do hiperestímulo ovariano (SHO) foi definida pelo Comitê Prático da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva como "uma resposta exagerada a terapia de indução ovulatória". Esta síndrome, por complicação da estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, representa um risco à vida das pacientes (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006). A apresentação clínica pode ser dividida em três categorias: leve, moderada e grave (Elchalal, Schenker, 1997). A incidência de SHO é de 20 ± 33%

para a forma leve,  $3 \pm 6\%$  para a forma moderada, e de  $0.1 \pm 2\%$  para a forma grave da doença (Delvigne, Rozenberg 2002).

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de SHO são: idade (pacientes jovens), baixo peso corpóreo, síndrome dos ovários policísticos (SOP), altas doses de gonadotrofinas exógenas, nível sérico de estradiol ( $E_2$ ) elevado ou rapidamente aumentado, e episódios prévios de SHO (Practice Committee of the American Society for Reproduction Medicine, 2006). Os sinais clínicos podem incluir rápido ganho de peso, oligúria ou anúria, hemoconcentração, leucocitose, hipovolemia, desequilíbrio eletrolítico (tipicamente hiponatremia e hipercalemia), ascite, efusão pleural e pericárdica, síndrome do desconforto respiratório adulto e hipercoagulabilidade com sequelas tromboembólicas (Whelan <sup>3rd</sup>, Vlahos 2000, Chang, Ginsberg, 2006), entre outros, podendo estes retroceder espontaneamente após 10-14 dias (Whelan <sup>3rd</sup>, Vlahos, 2000).

Os efeitos da SHO na qualidade oocitária ou embrionária são controversos. Fábregues et al (2004) não encontraram qualquer diferença na taxa de fertilização, implantação, gestação ou abortamento entre pacientes que apresentam SHO e o grupo controle. Por outro lado, Aboulghar et al (1997) sugerem que tanto a qualidade oocitária como a taxa de fertilização são piores nestas pacientes.

A criopreservação de embriões tem sido usada como ferramenta na prevenção da SHO e para melhorar os resultados dos ciclos de reprodução humana assistida (RHA) em pacientes com risco de SHO (Chen et al 2003, Orvieto 2005). Entretanto, a criopreservação pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos embriões, principalmente quando estes apresentam defeitos citoplasmáticos (Balaban et al 2008). O principal problema durante a criopreservação dos embriões está na formação de cristais de gelo no ambiente intracelular, que pode levar ao dano celular e à parada de desenvolvimento embrionário (Liebermann et al, 2003). Edgar et al (2000) sugerem que o impacto negativo da criopreservação é limitado à perda de blastômeros, sendo a taxa de implantação de embriões descongelados e intactos similares aos embriões frescos. Entretanto, ainda foi pouco investigado se o possível dano causado aos embriões provenientes de pacientes com SHO, somado aos efeitos da criopreservação, pode ocasionar piores resultados clínicos do ciclo de descongelamento. O objetivo deste estudo foi avaliar se a criopreservação de embriões provenientes de ciclos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) de pacientes com SHO pode influenciar os resultados clínicos quando comparado à pacientes que receberam oócitos doados e por não estarem com o endométrio preparado, tiveram seus embriões criopreservados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Casística

Este estudo de caso controle foi realizado em 58 casos submetidos a estímulo ovariano controlado para ciclos de ICSI. Todos os pacientes concordaram com que os resultados de seus ciclos fossem utilizados para pesquisas científicas, e para isso assinaram o termo de consentimento informado. Além disso, as pacientes que receberam os oócitos de doadoras assinaram termo de consentimento Livre e Esclarecido referente ao recebimento e transferência dos embriões provenientes destes oócitos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local/ institucional.

Foram incluídos neste estudo 58 ciclos de descongelamento de embriões sendo estes divididos em dois grupos: 26 ciclos em que as pacientes apresentaram manifestação clínica de SHO, com o valor de estradiol acima de  $3000\text{pg/mL}$  e necessidade de parectese após a punção (grupo SHO); e 32 ciclos onde as pacientes receberam oócitos maduros doados, sendo submetidos à ICSI no dia da punção folicular da doadora, utilizando o sêmen do cônjuge da receptora (grupo controle). Neste estudo não incluímos doação de oócitos congelados.

A principal indicação para a realização de ciclo de ICSI nas pacientes do grupo SHO foi fator masculino, e nas pacientes do grupo controle foi o fator ovariano, devido a baixa reserva ovariana.

Os embriões das pacientes que receberam oócitos doados incluídos neste estudo foram criopreservados, pois estas não se encontravam com endométrio preparado para a transferência dos embriões. Em ambos os grupos um ciclo de descongelamento de embriões foi realizado posteriormente. Todas as pacientes foram submetidas a preparo endometrial para a realização da transferência dos embriões criopreservados. Os valores médios da idade materna e concentração de  $E_2$  descritos no grupo controle são referentes à doadora dos oócitos. As taxas de embriões sobreviventes, implantação, gestação, e abortamento foram avaliadas nos ciclos de descongelamento de embriões de ambos os grupos.

Foram considerados embriões sobreviventes e íntegros ao congelamento-descongelamento quando 50% ou mais dos blastômeros mostravam membranas morfológicamente normais e citoplasma claro. Quando 100% dos blastômeros mostravam membranas morfológicamente normais e citoplasma claro, os embriões foram considerados intactos. A taxa de implantação foi definida como o número de sacos gestacionais dividido pelo número de embriões transferidos para cada paciente. A gestação clínica foi definida como a presença de saco gestacional, visibilizado por ultra-sonografia (USG) e presença de batimento cardíaco, de 4 a 6 semanas após a transferência embrionária. Por fim, o abortamento foi definido como perda espontânea da gestação antes da 24ª semana.

### Preparo das amostras seminais para a realização da ICSI

Seguidos de 3-5 dias de abstinência ejaculatória, as amostras seminais foram analisadas quanto ao volume, concentração, motilidade, aglutinação, presença de células redondas e morfologia espermática, segundo os critérios estritos de Kruger e da Organização Mundial da Saúde (OMS). As amostras foram preparadas por gradiente descontínuo de densidade ou por "swim up" sob meio, para serem utilizadas na ICSI. Para a seleção do método de processamento seminal foi levado em consideração o volume e a concentração seminal. Amostras com concentração  $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$  e motilidade  $\geq 50\%$  foram processadas pelo método de "swim up". Entretanto, as amostras com valores abaixo dos acima descritos foram processadas por gradiente descontínuo de densidade.

### Estimulação ovariana controlada

A estimulação ovariana controlada foi alcançada por bloqueio pituitário longo usando um agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH - Lupron Kit™, Abbott S.A Société Française des Laboratoires, Paris, France), seguido de estimulação ovariana com hormônio foliculo estimulante (r-FSH - Gonal-F®, Serono, Genève, Switzerland) recombinante. As doses de FSH administradas foram ajustadas conforme a resposta folicular de cada paciente. A dinâmica folicular foi acompanhada por dosagens séricas de  $E_2$  e USG. Quando observado um folículo com diâmetro superior a 18mm ou dois folículos com diâmetro superior a 16mm a gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG - Ovidrel™, Serono, Genève, Switzerland) foi administrada para maturação folicular final. Trinta e seis horas após a administração do r-hCG, os oócitos foram coletados por foliculo-aspiração transvaginal guiada por USG.

### Preparação dos oócitos, avaliação da fertilização e qualidade embrionária

Após a recuperação, os oócitos foram incubados em meio de cultura (HTF - Irvine Scientific, Santa Ana, USA) suplementado com 10% de albumina humana sintética (HSA, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) coberto por óleo mineral (Ovoil™ - Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) por 4-5

horas a 37°C e 6% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de CO<sub>2</sub> utilizada nas incubadoras foi regulada de acordo com o pH do meio de cultivo utilizado. Esta medição foi realizada uma vez por semana como controle de qualidade. As células do cómulus foram removidas por exposição durante 30s ao meio tamponado com HEPES contendo 80 IU/mL de hialuronidase (Irvine Scientific, Santa Ana, USA). Posteriormente, as células restantes do cómulus foram cuidadosamente removidas por denudação mecânica usando pipetas Pasteur de vidro afiladas manualmente.

Os oócitos denudados foram então avaliados quanto a sua maturação nuclear. Oócitos que apresentavam a extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II), observados em microscópio invertido (Eclipse TE 300, Nikon®, Tokyo, Japan), foram utilizados para ICSI. Os oócitos que apresentavam a vesícula germinativa (prófase I) ou que não apresentavam vesícula germinativa ou extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase I) permaneceram em cultura e não foram injetados.

A fertilização foi avaliada 16 a 20 horas após a ICSI, e esta foi considerada normal quando 2 pró-núcleos claramente distintos estavam presentes. Para avaliar a qualidade embrionária foram considerados os seguintes parâmetros: (i) número de blastômeros, (ii) porcentagem e localização de fragmentação, (iii) variação na simetria dos blastômeros, (iv) presença de multinucleação, e (v) defeitos na zona pelúcida e citoplasma.

Embriões de alta qualidade foram definidos como os que apresentavam 4 células no segundo dia ou oito células no terceiro dia de desenvolvimento, com menos de 10% de fragmentação, simetria entre os blastômeros, ausência de multinucleação, citoplasma com granulose moderada e sem inclusões, ausência de granulose no espaço perivitelínico, e ausência de dismorfismo de zona pelúcida.

#### Preparo endometrial

O preparo endometrial foi realizado com administração de E<sub>2</sub> para todas as pacientes que realizaram a transferência de embriões congelados-descongelados (200mg/dia a partir do 5º dia do ciclo menstrual; Estradot - Novartis, Daseil, Switzerland). Para o suporte da fase lútea foi utilizada rotineiramente progesterona micronizada (600mg/dia a partir do 14º dia do ciclo menstrual; Utrogestan® - FQM, Rio de Janeiro, Brasil) e/ou conjuntamente E<sub>2</sub> (Estradot - Novartis, Daseil, Switzerland) dependendo da idade e espessura endometrial de cada paciente. As transferências foram realizadas quando o endométrio apresenta-se espessura maior ou igual a 8,0 mm em ambos os grupos, e não houve manifestações clínicas de hiperestimulação nas pacientes do grupo de estudo.

De maneira geral, os embriões das pacientes com SHO foram transferidos cerca de 6 meses após o desaparecimento das manifestações clínicas.

#### Congelamento e descongelamento de embriões

A criopreservação foi realizada utilizando protocolo de congelamento lento em câmara de congelamento biológico programado (Cryochamber CL8800, Cryologic, Mulgrave, Victoria, Australia), utilizando propanodiol (PROH) como crioprotetor. Os meios para congelamento embrionário e descongelamento embrionário (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) foram utilizados conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os embriões foram congelados no dia+2 ou dia +3 de desenvolvimento, contendo de 6 a 12 blastômeros.

Após o procedimento de descongelamento, os embriões foram transferidos para o meio de cultivo onde a clivagem e a qualidade embrionária foram avaliadas em microscópio invertido. Os embriões foram cultivados em atmosfera umidificada à 6% de CO<sub>2</sub> e 37°C, por 2-4 horas até o momento da transferência embrionária. Imediatamente antes da transferência, os embriões foram submetidos a uma pequena abertura na zona pelúcida utilizando a técnica de "Assisted hatching" com laser diodo (OCTAX PolarAIDE™, Herborn, Germany).

Este procedimento foi realizado de maneira rotineira para todos os ciclos de descongelamento. Para cada casal, de um a quatro embriões foram transferidos dependendo da qualidade embrionária e da idade materna.

#### Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Para comparação das médias de variáveis numéricas, o teste t-Student's foi utilizado. Já para variáveis categóricas, os grupos foram comparados por teste de qui-quadrado. Foram considerados significantes os resultados com nível crítico de 5% ( $P \leq 0.05$ ). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Minitab (versão 14).

#### RESULTADOS

A média de idade das pacientes foi similar entre os grupos (SHO: 29.65 ± 3.05, Controle: 30.68 ± 3.64,  $p = 0.253$ ). Entretanto, a concentração de E<sub>2</sub> sérico alcançou, no dia da administração do hCG, 3720 ± 3502 pg/ml no grupo SHO e 2753 ± 1873 pg/ml no grupo controle ( $p = 0.214$ ). Não houve diferença em relação à taxa de fertilização entre os grupos (SHO: 71.89% ± 15.45, Controle: 79.75% ± 21.68,  $p = 0.234$ ). Em adição, a taxa de embriões sobreviventes e de embriões intactos foi similar entre os grupos (tabela 1).

Embora as pacientes do grupo SHO tivessem maior número de embriões, e por essa razão, maior número de embriões de alta qualidade no dia do congelamento, a taxa de embriões de alta qualidade não diferiu entre os grupos (tabela 1). As taxas de implantação, gestação e abortamento também não foram significativamente diferentes entre os grupos (tabela 2).

**Tabela 1:** Qualidade embrionária antes e após o descongelamento

Qualidade embrionária	SHO (n= 26)	Controle (n= 32)	Valor de P
<b>Antes do congelamento</b>			
Número de embriões	17.27 ± 10.16	4.75 ± 1.55	<0.0001
Número de embriões de alta qualidade	4.88 ± 6.73	1.38 ± 1.60	0.015
Taxa de embriões de alta qualidade (%)	25.20 ± 23.90	27.40 ± 30.30	0.760
<b>Após o descongelamento</b>			
Número de embriões viáveis	4.19 ± 2.30	2.38 ± 1.70	0.002
Taxa de embriões sobreviventes (%)	68.85 ± 21.10	59.53 ± 36.79	0.233
Taxa de embriões intactos (%)	26.83 ± 28.13	21.46 ± 28.53	0.475

SHO - Pacientes com síndrome do hiperestimulo ovariano

**Tabela 2:** Resultados clínicos de pacientes dos grupos SHO e Controle

	SHO (n= 26)	Controle (n= 32)	Valor de P
Taxa de implantação (%)	17.9 ± 26.9	12.5 ± 23.7	0.435
Taxa de gestação (%)	38.50	28.60	0.441
Taxa de abortamento (%)	40.00	25.00	0.332

SHO - Pacientes com síndrome do hiperestimulo ovariano

#### DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que oócitos de pacientes com SHO apresentam similar habilidade de fertilização e desenvolvimento embrionário que oócitos de doadoras. Além disso, não foi observado efeito prejudicial da criopreservação na sobrevivência embrionária após descongelamento, e nas taxas de implantação e gestação.

A implantação de embriões congelados-descongelados pode ser influenciada por vários fatores, como idade das pacientes, protocolo de congelamento e descongelamento, critério usado para criopreservação, e o estágio da clivagem do embrião no momento do congelamento (Lahav-Baratz et al, 2003; Gabrielsen et al, 2006).

Alguns autores sugerem que a qualidade e a maturidade dos oócitos de pacientes com SHO são significativamente piores (Aboulghar et al 1997; Akagbosu et al 1998). Esta pior qualidade oocitária pode influenciar os resultados pós-descongelamento. Entretanto, embora tenha sido discutido que a qualidade do oócito/embrião pode estar prejudicada em pacientes com SHO, estas pacientes apresentam maior número de oócitos a serem fertilizados e por consequência um maior número de embriões. Usualmente, os melhores embriões são selecionados para a transferência e somente os embriões de boa qualidade são selecionados para a criopreservação.

A viabilidade de cada embrião depende da qualidade biológica dos gametas. Embora esteja bem reconhecido que a qualidade do espermatozoide apresenta um importante papel durante a fertilização (Swann et al 2006, Saunders et al 2007), a expressão do genoma embrionário, que consiste da combinação do material genético do espermatozoide e do oócito, começa no segundo ciclo de divisão embrionária, no estágio de 4 a 8 células do desenvolvimento embrionário humano (Tesarik et al, 1986 e 1988). Os eventuais efeitos nos genes derivados dos espermatozoides estão de maneira pouco provável manifestados entre a fertilização e o estágio de 4 células. O estágio de 4 células é normalmente observado antes da 50ª hora de desenvolvimento, e o estágio de 8 células é usualmente notado antes da 72ª hora (Veeck, 1991). No presente estudo, o congelamento de embriões foi realizado no segundo dia (quando a ativação do genoma embrionário provavelmente não ocorreu) ou terceiro dia de desenvolvimento (de 48 a 72 horas após ICSI). Consequentemente, sugere-se que fatores derivados dos oócitos poderiam ser responsáveis pelo controle pré-implantacional até o congelamento.

No presente estudo, obtivemos, no protocolo de congelamento-descongelamento, a mesma sobrevivência embrionária e resultados clínicos similares em pacientes do grupo SHO, que em pacientes do grupo de controle. Apesar de não haver diferenças estatísticas, as pacientes com SHO apresentaram um aumento na taxa de abortamento. Raziel e cols (2002) mostraram que a taxa de abortamento em pacientes com SHO grave era significativamente maior quando comparada a pacientes sem o desenvolvimento da síndrome. Por outro lado, alguns estudos sugerem não haver influência da SHO nos resultados de RHA (Aboulghar et al, 1997; Fabregues et al, 2004; Urman et al, 2007). Portanto, nossos achados, juntamente com os estudos acima descritos, sugerem que embriões de alta qualidade provenientes de pacientes com SHO têm a mesma capacidade de sobrevivência após descongelamento e desenvolvimento que embriões de grupos controle.

#### CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que os resultados dos ciclos de congelamento-descongelamento não são afetados pela presença de SHO. Estes resultados indicam que embriões obtidos de ciclos de ICSI de pacientes com SHO sobrevivem à criopreservação de maneira similar aos gerados por outras pacientes submetidas ao mesmo tipo de tratamento.

#### Endereço para correspondência

Edson Borges Jr., M.D., Ph.D.  
Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545. CEP: 01401-002  
Fone/fax: 55-11-38859858  
e-mail: science@sapientiae.com.br

#### Referências bibliográficas

- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 1997; 68(6):1017-21.
- Akagbosu F, Marcus S, Abusheikha N, Avery S, Brinsden P. Does ovarian hyperstimulation syndrome affect the quality of oocytes? *Hum Reprod*. 1998; 13(9):2583-4.
- Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Hum Reprod*. 2008; 23(8):1778-85.
- Chan WS, Ginsberg JS. A review of upper extremity deep vein thrombosis in pregnancy: unmasking the 'ART' behind the clot. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(8):1673-7.
- Chen D, Burmeister L, Goldschlag D, Rosenwaks Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: strategies for prevention. 2003; *Reprod Biomed Online*. 7(1): 43-9.
- Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (SHO): a review. *Hum Reprod Update*. 2002; 8(6):559-77.
- Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod*; 2000; 15(1):175-9.
- Elchalal U, Schenker JG. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome--views and ideas. *Hum Reprod*. 1997; 12(6):1129-37.
- Fabregues F, Penarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril*. 2004; 82(4): 827-33.
- Gabrielsen A, Fedder J, Agerholm I. Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12(1): 70-6.
- Lahav-Baratz S, Kolman M, Shiloh H, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, Dirmfeld M. Analyzing factors affecting the success rate of frozen-thawed embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2003; 20(11): 444-8.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*. 2003;7(6):623-33.
- Orvieto R. Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome? *Hum Reprod*. 2005; 20(2): 320-2.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2006; 86(5 Suppl):S178-83.
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, Strassburger D, Mordechai E, Ron-El R. Increased early pregnancy loss in IVF patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. 2002; (17): 107-110.
- Saunders CM, Swann K, Lai FA. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp*. 2007; (74): 23-36.
- Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca2+ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol*. 2006; 17(2): 264-73.
- Tesarik J, Kopecky V, Plachot M, Mandelbaum J. Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro. *J Reprod Fertil*. 1986; 78(2): 463-70.
- Tesarik J, Kopecky V, Plachot M, Mandelbaum J. Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy. *Dev Biol*. 1988. 128(1): 15-20.
- Urman B, Balaban B, Yakin K. Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos. *Fertil Steril*. 2007; 87(2): 310-5.
- Veeck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Baltimore, William and Wilkins; 1991. 420p.
- Whelan JG 3<sup>rd</sup>, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2000; 73(5): 883-96.